

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Generación de distintas cepas de priones recombinantes como herramienta para el estudio del malplegamiento espontáneo en las enfermedades priónicas

MIGUEL ÁNGEL PÉREZ CASTRO

LEIOA, 2021



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

CICbioGUNE

MEMBER OF BASQUE RESEARCH
& TECHNOLOGY ALLIANCE

Tesis Doctoral:

**Generación de distintas cepas de priones
recombinantes como herramienta para el estudio
del malplegamiento espontáneo en las
enfermedades priónicas**

MIGUEL ÁNGEL PÉREZ CASTRO

LEIOA, 2021

DIRECTORES:

Dr. Joaquín Castilla Castrillón

Dr. Joseba M. Garrido Urkullu

TUTOR:

Dr. Pedro Rolando Grandes Moreno

**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**

IFZ /NIF: **16287336R**

y Zuzendariaren izen-abizenak /Nombre y apellidos del/la director/a: **Joseba M. Garrido Urkullu**

IFZ /NIF: **22735815Q**

Tesiaren izenburua / Título de la tesis: **Generación de distintas cepas de priones recombinantes como herramienta para el estudio del malplegamiento espontáneo en las enfermedades priónicas**

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

Doktoregaiaren izen-abizenak / Nombre y apellidos del/la doctorando/a: **Miguel Ángel Pérez Castro**

Unibertsitateak horretarako jartzen duen tresnak emandako ANTZEKOTASUN TXOSTENA ikusita, baimena ematen dut goian aipatzen den tesia aurkeztu 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 30 de junio de 2021**

Sin. / Fdo.: Tesiaren zuzendaria / Los directores de la tesis

Fdo.: **Joaquín Castilla Castrillón**

Fdo.: **Joseba M. Garrido Urkullu**

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS/GLOSARIO

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

A

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

B

- BSE: del inglés, *Bovine Spongiform Encephalopathy*

C

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

D

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

E

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

F

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

G

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

H

- h: hora, unidad de la propiedad Tiempo
- HC: del inglés, *hydrofobic core*
- HE: tinción hematoxilina-eosina
- HET-S: proteína fúngica que regula la incompatibilidad del heterocarión

- HSP: del inglés, *heat shock protein*
- HY: *Hyper*, cepa de prion de hámster

I

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

K

- kDa: kiloDalton, unidad de la propiedad Masa
- KO: animal transgénico que no expresa un determinado gen
- KO-PrP: animal transgénico que no expresa el gen que codifica la PrP

L

- LB: Luria Bertoni, medio de cultivo de bacterias

M

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

N

- ng: nanogramo, unidad de la propiedad Masa
- nm: nanómetro, unidad de la propiedad Longitud
- N-terminal: extremo amino terminal
- Nor98: cepa de prion ovino atípica
- N2a: línea celular de neuroblastoma de ratón

O

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

P

- p/v: peso/volumen
- pb: pares de bases
- PBS: del inglés, *phosphate buffered saline*
- PCR: del inglés, *polymerase chain reaction*
- PD: del inglés, *Parkinson disease*
- PIRIBS: modelo de lámina- β paralela en registro
- PK: proteinasa K
- PM: marcador de peso molecular
- PMCA: del inglés, *Protein Misfolding Cyclic Amplification*
- PMSA: del inglés, *Protein Misfolding Shaking Amplification*
- PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- *PRNP*: gen que codifica la proteína PrP
- *PRNP*^{-/-}: animal transgénico KO para el gen que codifica la proteína PrP
- *PRNP*^{+/-}: animal transgénico hemocigoto para el gen que codifica la proteína PrP
- *PRNP*^{+/+}: animal transgénico homocigoto para el gen que codifica la proteína PrP
- PrP: del inglés, *Prion Protein*
- PrP*: PrP en un estado conformacional transitorio, intermedio entre PrP^C y PrP^{Sc}
- PrP²⁷⁻³⁰: PrP resistente a PK de 27-30 kDa
- PrP^C: isoforma celular de PrP
- PrP^{res}: PrP resistente a la digestión con PK
- PrP^{Sc}: 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
- RER: retículo endoplasmático rugoso

- RL: del inglés, *Rigid Loop*
- RML: cepa de prion ovino adaptado a ratón en el *Rocky Mountain Laboratory*
- RMN: Resonancia Magnética Nuclear
- RNA: ácido ribonucleico
- RNAm: ácido ribonucleico mensajero
- rpm: revoluciones por minuto, unidad de la propiedad Frecuencia
- RT-QuIC: del inglés, *Real Time - Quaking Induced Conversion*

S

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

I

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

U

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

V

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

W

- WT: del inglés, *Wild-Type*

Tabla de los 20 aminoácidos, incluyendo su abreviatura y su código

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

ÍNDICE

Abreviaturas/Glosario	1
Índice	9
Resumen/Summary	15
Introducción	19
1. Introducción a las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles	21
1.1. Primeros estudios de las enfermedades priónicas	23
1.2. Controversia acerca de la naturaleza del agente infeccioso	27
1.3. Ataque al dogma central de la biología: hipótesis “solo proteína”	29
1.4. Hacia la aceptación de la Hipótesis “solo proteína”	32
1.4.1. Evidencias bioquímicas y biológicas	32
1.4.2. Evidencias sustentadas en modelos animales	35
1.4.3. Evidencias derivadas de modelos <i>in vitro</i>	36
2. Biología de los priones	40
2.1. PrP ^C	40
2.1.1. Genética de la PrP ^C	40
2.1.2. Biosíntesis y componentes de la PrP ^C	42
2.1.3. Posibles funciones de la PrP ^C	47
2.2. PrP ^{Sc}	49
2.2.1. Heterogeneidad de la PrP ^{Sc}	49
2.2.2. Modelos estructurales de la PrP ^{Sc}	51
2.2.3. Neurotoxicidad de la PrP ^{Sc}	57
3. Mecanismos de conversión	59
3.1. Primeras aproximaciones: modelos teóricos de conversión	60
3.1.1. Modelo de conversión inducida por molde	60
3.1.2. Modelo de nucleación-polimerización	61
3.2. Hacia nuevas aproximaciones: cinética y dinámica de la conversión	62
3.3. Enfermedades priónicas humanas	65
4. Transmisión de priones	67
4.1. Vías de entrada y diseminación por el organismo	67
4.2. Barrera de transmisión y fenómeno de cepa	70
5. Modelos experimentales para la propagación y el estudio de priones	78
5.1. Primeros métodos de propagación de priones <i>in vitro</i>	79
5.2. Amplificación cíclica de proteínas malplegadas: PMCA	80
5.3. Amplificación cíclica de proteínas malplegadas por agitación: PMSA	81
6. Malplegamiento espontáneo de la PrP y su relevancia en las enfermedades priónicas	83
Hipótesis y Objetivos	91
Materiales y Métodos	95
1. Construcción de los plásmidos de expresión de las PrP de ratón silvestre L108 T189 y F108 V189, de ratón con todos los polimorfismos posibles en posición 108 y de oveja VRQ	97
1.1. Generación de plásmidos con PrP murina L108 T189, F108 V189 y oveja VRQ mediante recombinación homóloga	97
1.2. Generación de plásmidos con PrP murina con todas las variantes aminoacídicas en la posición 108 utilizando mutagénesis dirigida	100
2. Obtención de proteínas del prion recombinantes	105
2.1. Transformación en bacterias <i>E. Coli</i> Rosetta (DE3) TM	105
2.2. Expresión y purificación de las PrP recombinantes para su posterior uso en sistemas de propagación <i>in vitro</i>	105
3. PMSA para la generación y propagación de priones <i>in vitro</i>	107
3.1. Preparación de sustratos para PMSA	107
3.2. PMSA para la propagación de priones recombinantes <i>in vitro</i>	108

3.3. PMSA para la generación espontánea de priones recombinantes <i>in vitro</i>	109
3.4. Generación de rec-PrP ^{res} mediante PMSA para ensayos cinéticos.....	110
4. PMSA para la propagación de priones recombinantes <i>in vitro</i> mediante el uso de partículas esféricas de zirconia – sílice como semillas	110
4.1. Adsorción de rec-PrP ^{res} a partículas esféricas de zirconia – sílice	110
4.2. Propagación de priones mediante PMSA en distintas condiciones utilizando partículas esféricas de zirconia – sílice con rec-PrP ^{res} adsorbida	111
5. PMCA para la propagación de priones <i>in vitro</i> en sustratos basados en homogeneizados de encéfalo	112
5.1. Preparación de sustratos para PMCA basados en homogeneizados de encéfalos de ratón.....	112
5.2. Propagación de priones recombinantes en PMCA para la determinación de la potencial infectividad <i>in vivo</i>	113
5.3. PMCA para la determinación de la potencial infectividad específica de las semillas recombinantes mediante diluciones seriadas de las semillas	114
6. Detección de PrP malplegada resistente a la digestión por proteasa o PrP^{res}	115
6.1. Digestión de PrP malplegada mediante tratamiento con proteinasa K	115
6.2. Detección de proteínas mediante electroforesis y tinción de proteína total.....	117
6.3. Detección de proteínas mediante electroforesis y <i>Western blot</i>	117
6.4. Detección de proteínas mediante electroforesis, tinción de proteína total y posterior mapeo epitópico.....	118
7. Estudios de infectividad <i>in vivo</i>	119
7.1. Modelos de experimentación y seguimiento	119
7.2. Entidades colaboradoras y cumplimiento de las normativas éticas.....	120
8. Estudios anatomopatológicos	122
8.1. Detección de PrP ^{res} y toma de imágenes	122
8.2. Evaluación y elaboración del perfil lesional.....	123
Resultados	125
1. Adaptación de la PMSA para la obtención de PrP recombinante murina malplegada espontáneamente	127
2. Análisis del rol del aminoácido situado en la posición 108 de la PrP en el malplegamiento espontáneo	130
2.1. Evaluación del efecto de distintos aminoácidos en la posición 108 sobre la capacidad de malplegamiento espontáneo de la PrP murina	130
2.2. Generación espontánea y conservación de potenciales confórmers de PrP ^{res} murina.....	134
3. Caracterización bioquímica de los potenciales confórmers seleccionados de rec-Ra L108I Dx	137
3.1. Determinación de las características bioquímicas básicas	137
3.1.1. Identificación de los fragmentos proteolíticos mediante mapeo epitópico	138
3.1.2. Ensayo de resistencia a PK	141
3.2. Caracterización de la capacidad de propagación de las semillas en sustrato con rec-PrP homóloga utilizando condiciones restrictivas	142
3.2.1. Capacidad de propagación mediante diluciones seriadas por PMSA	142
3.2.2. Determinación de la temperatura mínima de propagación.....	142
3.3. Caracterización de la capacidad de propagación de las semillas seleccionadas en sustratos con rec-PrP murinas no homólogas.....	144
3.3.1. Propagación en sustratos basados en PrP recombinante murina silvestre	144
3.3.2. Propagación en sustrato con rec-PrP homóloga en ausencia de cofactor	146
4. Caracterización biológica de los confórmers de rec-Ra L108I Dx	147
4.1. Infectividad en el modelo transgénico sobreexpresor de PrP ^C murina L108I	148
4.1.1. Determinación de la capacidad de propagación <i>in vitro</i> de las semillas recombinantes mediante PMCA	148

4.1.2.	Determinación de la infectividad <i>in vivo</i> utilizando un modelo transgénico sobreexpresor de PrP ^C murina L108I.....	149
4.2.	Infectividad en un modelo murino silvestre.....	153
4.2.1.	Inoculación en un modelo murino silvestre de homogeneizados de encéfalos de TgMoL108I previamente infectados con las semillas recombinantes.....	154
4.2.2.	Determinación de la capacidad de propagación <i>in vitro</i> de las semillas recombinantes mediante PMCA en modelo murino silvestre	156
4.2.3.	Determinación de la infectividad <i>in vivo</i> utilizando en modelo murino silvestre	157
5.	Papel del cofactor: ausencia y presencia de dextrano.....	160
5.1.	Análisis de las propiedades bioquímicas tras la propagación en ausencia de cofactor	160
5.1.1.	Mantenimiento de la propagación sin dextrano y adsorción a partículas esféricas de zirconia – sílice	160
5.1.2.	Identificación de los fragmentos proteolíticos de las rec-PrP ^{res} adaptadas a CB mediante mapeo epitópico	162
5.1.3.	Caracterización de la capacidad de propagación de las semillas adaptadas a CB en sustrato con rec-PrP no homóloga y ante condiciones restrictivas	164
5.2.	Estudio de las propiedades de las cepas recombinantes murinas ante variaciones de cofactor en el sustrato.....	166
5.3.	Infectividad en modelo transgénico sobreexpresor de PrP ^C murina.....	169
5.3.1.	Determinación de la capacidad de propagación <i>in vitro</i> de las semillas recombinantes mediante PMCA en modelo transgénico sobreexpresor de PrP ^C murina L108I.....	170
5.3.2.	Determinación de la infectividad <i>in vivo</i> utilizando distintos modelos murinos.....	171
6.	Generación espontánea de priones recombinantes murinos silvestres	172
6.1.	Adaptación de la PMSA para generar priones recombinantes murinos silvestres.....	173
6.2.	Determinación de la capacidad de propagación <i>in vitro</i> de las semillas recombinantes silvestres mediante PMCA en modelo murino silvestre.....	176
6.3.	Determinación de la infectividad <i>in vivo</i> en un modelo murino silvestre	177
7.	Estudio de la cinética del fenómeno de malplegamiento espontáneo utilizando la proteína recombinante murina silvestre como modelo	181
7.1.	Estudio de la formación de rec-PrP ^{res} murina a diferentes tiempos de PMSA	181
7.2.	Estudio de la potencial infectividad de las rec-PrP ^{res} espontáneas obtenidas a distintos tiempos de PMSA <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	184
7.2.1.	Determinación de la capacidad de propagación <i>in vitro</i> de las semillas recombinantes mediante PMCA en modelo murino silvestre	184
7.2.2.	Determinación de la infectividad específica <i>in vivo</i> en modelo murino silvestre	187
7.3.	Propagación <i>in vitro</i> de las rec-PrP ^{res} obtenidas a distintos tiempos de PMSA y posterior estudio <i>in vivo</i> en modelo murino silvestre	190
8.	Estudio de la cinética del fenómeno de malplegamiento espontáneo en otra especie	193
8.1.	Estudio de la formación de rec-PrP ^{res} ovina a diferentes tiempos de PMSA.....	194
8.2.	Estudio de la potencial infectividad de las semillas recombinantes ovinas obtenidas a distintos tiempos de PMSA <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	197
8.2.1.	Determinación de la capacidad de propagación <i>in vitro</i> de las semillas recombinantes mediante PMCA en modelo ovino transgénico.....	197
8.2.2.	Determinación de la infectividad <i>in vivo</i> en distintos modelos ovinos	201
	Discusión.....	203
	Conclusiones.....	251
	Referencias	255
	Publicaciones	282

RESUMEN/SUMMARY

La isoforma malplegada (PrP^{Sc}) de la proteína del prion celular (PrP^C), es el agente causal de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET) o enfermedades priónicas, un conjunto de desórdenes neurodegenerativos mortales que afectan a distintos mamíferos incluidos los humanos. Entre las distintas causas que desencadenan las enfermedades priónicas, la conversión espontánea de PrP^C a PrP^{Sc} es una de las menos comprendidas a nivel molecular a pesar de su relevancia, pues es responsable de la aparición de las EET esporádicas, que comprenden la mayoría de los casos en humanos. A pesar de ser las enfermedades priónicas más comunes, su baja incidencia entre la población (1 – 2 casos por millón de habitantes al año), sumada al rápido curso de la enfermedad y a la dificultad de replicarlas de forma consistente en modelos animales limita en gran medida su estudio. Por ello, el desarrollo de un sistema *in vitro* que mimetice fielmente el fenómeno de conversión espontáneo, podría arrojar algo de luz sobre los mecanismos moleculares que desencadenan este evento, ayudando a comprender la etiología de este tipo de EET.

Basándonos en la metodología de propagación priónica *in vitro* PMSA, y tras la modificación de los parámetros fundamentales, se han obtenido espontáneamente distintas isoformas de PrP recombinantes murinas malplegadas que presentan el comportamiento de un prion *bona fide*: siendo resistentes a la digestión con proteasas, con capacidad autopropagativa e infecciosas en distintos modelos animales. Durante el proceso de generación espontánea, se identificaron distintos potenciales confórmeros que primero fueron caracterizados bioquímicamente y, posteriormente *in vivo*, mediante bioensayos en modelos animales que confirmaron la obtención de diferentes cepas priónicas, modelando la heterogeneidad del evento de malplegamiento espontáneo. Utilizando también la PMSA, se estudió en detalle la cinética del proceso de malplegamiento espontáneo, que permitió analizar las características de diversas fracciones de PrP recombinante murina silvestre malplegada a distintos tiempos de formación. Este mismo estudio cinético se reprodujo también utilizando PrP recombinante ovina, sugiriendo el potencial de esta técnica *in vitro* para la formación de priones espontáneos de otras especies. De esta forma, se demuestra que esta técnica resulta idónea para la generación de priones recombinantes *in vitro* de forma espontánea, permitiendo estudiar el fenómeno de formación de cepas y proporcionando modelos de gran interés para la comprensión de las EET esporádicas.

The misfolded isoform (PrP^{Sc}) of the cellular prion protein (PrP) is the causative agent of Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE) or prion diseases, a group of fatal neurodegenerative disorders that affect different mammals including humans. Among the different causes that trigger prion diseases, spontaneous conversion of PrP^C to PrP^{Sc} is one of the most poorly understood at the molecular level despite its relevance, being the event underlying sporadic TSEs, the most common form in humans. However, their low incidence (1 - 2 cases per million inhabitants per year), together with the rapid course of the disease and the difficulty of mimicking them in animal models, hinders their study. Therefore, the development of an *in vitro* system that faithfully mimics the spontaneous prion misfolding could help us understand the molecular mechanisms that trigger this event, shedding some light on the etiology of sporadic TSE.

Based on the PMSA methodology for prion propagation *in vitro*, and after modifying some key parameters, different isoforms of spontaneously misfolded murine recombinant PrP were obtained. They present *bona fide* prion behavior: resistance to protease digestion, self-propagation capacity and infectivity in different animal models. During the spontaneous generation process, different potential conformers were identified. Firstly, we performed a biochemical characterization in order to find distinctive features among the misfolded proteins and then, *in vivo* assays for their biological characterization. We confirmed the arising of different prion strains, modeling the heterogeneity of the spontaneous misfolding event. Using PMSA again, we studied the kinetics of the spontaneous misfolding process, allowing the analysis of different fractions of wild-type murine recombinant PrP misfolded at different reaction times. This kinetic study could be reproduced using recombinant ovine PrP, suggesting the potential of this *in vitro* technique for the spontaneous generation of prions from other species. In this way, we demonstrate that PMSA is suitable for the spontaneous generation of recombinant prions *in vitro*, allowing the study of the strain phenomenon and providing models of great interest for a better understanding of sporadic TSE.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción a las Encefalopatías espongiformes transmisibles

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET), también conocidas como enfermedades priónicas o prionopatías, son un grupo de patologías neurodegenerativas que afectan a diversas especies de mamífero, incluyendo al ser humano. Estas enfermedades resultan fatales en todos los casos, ya que no existe ningún tratamiento actualmente. Las enfermedades priónicas que afectan al ser humano son la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD, del inglés, *Creutzfeldt-Jakob Disease*), el Insomnio familiar fatal (FFI, del inglés, *Fatal Familial Insomnia*), el Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), el kuru y la recientemente descrita Prionopatía con Sensibilidad Variable a Proteasas (VPSPr, del inglés, *Variable Proteases-Sensitive Prionopathy*) (Will and Ironside, 2017, Aguzzi and Calella, 2009). Algunas de las prionopatías que afectan a otros mamíferos son la tembladera o enfermedad de scrapie descrita en ovejas, cabras y muflones; la Encefalopatía Transmisible del Visón (TME, del inglés, *Transmissible Mink Encephalopathy*) detectada en visones en cautiverio; la Enfermedad Debilitante Crónica (CWD, del inglés *Chronic Wasting Disease*) que afecta a cérvidos tanto salvajes como en cautividad y que se ha expandido rápidamente en las últimas décadas; la Encefalopatía Espongiforme Felina (FSE, del inglés, *Feline Spongiform Encephalopathy*) observada en gatos domésticos a finales del siglo pasado; y la más destacada entre las enfermedades priónicas animales; la Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE, del inglés, *Bovine Spongiform Encephalopathy*), más conocida como “mal de las vacas locas” por la epidemia que causó entre los años 1980 y 1990 afectando a miles de bóvidos del Reino Unido y otros países y que dio lugar además a la nueva variante de Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD, del inglés, *variant CJD*), siendo la primera prionopatía zoonótica descrita (Hill et al., 1997).

Los individuos que padecen estas enfermedades suelen presentar síntomas y signos clínicos muy heterogéneos, aunque los más extendidos son una progresiva disfunción motora y cognitiva, acompañada de una ataxia cerebelar. A pesar de que estos síntomas no aparecen hasta pasado un largo periodo de incubación, cuando lo hacen, desencadenan una enfermedad devastadora, fatal en todos los casos y de progresión muy rápida, que deviene en el fallecimiento del paciente en un tiempo de entre seis meses y dos años (aunque algunas variantes presentan cursos más lentos de la enfermedad) (Hill et al., 2003, Ironside et al., 2017). En los estudios anatomopatológicos *post mortem*, los cerebros de los afectados por enfermedades priónicas presentan una marcada espongiosis de la materia gris, adoptando un aspecto de esponja a nivel microscópico. Otros signos neuropatológicos típicos de las enfermedades priónicas son una acusada gliosis reactiva, tanto de astrocitos como de microglía, y la acumulación de proteína malplegada en forma de agregados proteicos o depósitos más groseros como placas, que se distribuyen por el tejido cerebral (Figura 1). A pesar de que estos signos clínicos y características histopatológicas son comunes en la mayoría de las enfermedades priónicas,

su frecuencia, distribución y gravedad pueden variar de una enfermedad a otra. Este fenómeno, sumado al hecho de que las enfermedades priónicas presentan una gran semejanza en cuanto a signos clínicos con otras patologías neurodegenerativas, hace que el diagnóstico definitivo de las enfermedades priónicas requiera de un exhaustivo examen anatomopatológico *post mortem* (Ironsides et al., 2017, Budka et al., 1995).

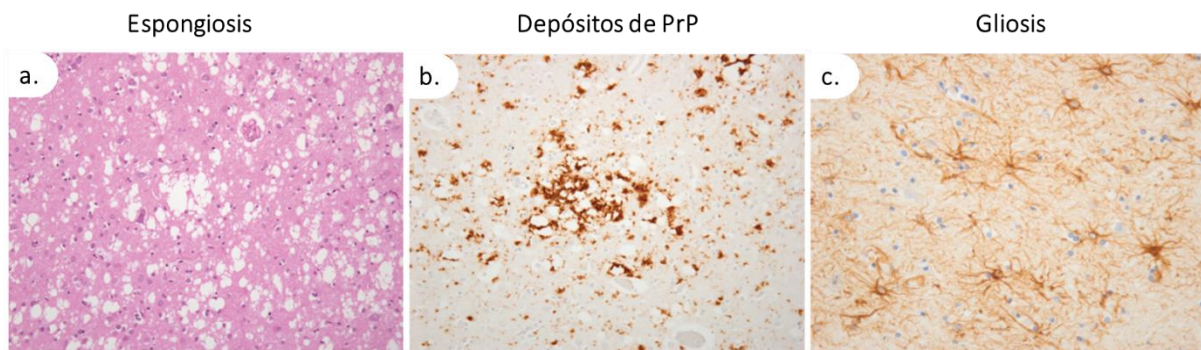


Figura 1. Anomalías neuropatológicas observadas en encéfalos de individuos afectados por una enfermedad priónica. a) Imagen del córtex frontal de un paciente con CJD donde se observa vacuolización o lesiones espongiiformes. Tinción con hematoxilina - eosina (H/E). 20x **b)** Imagen de depósito perivacuolar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

El evento central de la patogénesis de las enfermedades priónicas es la conversión conformacional o malplegamiento de la proteína celular del prion (PrP^{C}) en su isoforma patogénica (PrP^{Sc}). Estos dos conformeros de la misma proteína difieren únicamente en su estructura tridimensional, siendo la isoforma patogénica neurotóxica y capaz de inducir su conformación a otras moléculas de proteína priónica celular (Edgeworth et al., 2010). Este cambio conformacional trae consigo importantes modificaciones en las propiedades bioquímicas y biológicas de la proteína, destacando la insolubilidad de la PrP^{Sc} incluso en presencia de detergentes no iónicos, su estado agregado y una resistencia parcial al tratamiento con proteasas (Kocisko et al., 1994, Saborio et al., 2001). A lo largo de esta introducción, revisaremos los aspectos más importantes de las encefalopatías espongiiformes transmisibles. Partiendo del descubrimiento de estas intrigantes enfermedades, veremos la controversia surgida alrededor de su inusual agente causal y abordaremos lo que se conoce actualmente de los mecanismos moleculares que subyacen detrás de este grupo de patologías neurodegenerativas. Finalmente, trataremos algunos de los fenómenos que mayor interés suscitan en el campo, como la barrera de transmisión entre especies e individuos, la existencia de cepas con características distintivas o el malplegamiento espontáneo de priones, presentando los modelos que

se utilizan actualmente para su estudio y cómo se han aplicado a lo largo de esta tesis tratando de proporcionar nuevas herramientas para el estudio de tales fenómenos.

1.1. Primeros estudios de las enfermedades priónicas

La primera evidencia documentada de una enfermedad priónica se remonta a mitad del siglo XVIII en Lincolnshire (Inglaterra), donde unos ganaderos detectaron una enfermedad desconocida hasta el momento en ovejas merinas de raza española importadas al Reino Unido en 1732, y que sería conocida posteriormente como scrapie (Liberski, 2012). La evidencia en cuestión llevó a una petición por parte de estos granjeros al Parlamento para que modificara la regulación de la importación de óvidos al Reino Unido. En los años posteriores aparecieron otras menciones a esta enfermedad, como la publicada por Thomas Davies en una revista científica de Wiltshire en 1811 y donde, aparte de describir los signos clínicos que sufrían las ovejas afectadas, estableció una relación con lo acaecido en Lincolnshire con las ovejas merinas años atrás (Liberski, 2012). A finales del siglo XIX, la enfermedad ya se había detectado en otros países europeos, por lo que comenzaron a aparecer las primeras teorías que trataban de explicar la etiología de la enfermedad. El francés Besnoit propuso por primera vez un origen vírico para el “agente filtrable” causante de la enfermedad, mientras que otros científicos como M’Gowan apuntaban a un origen parasitario, pudiendo ser el protozoo *Sarcosporidium* el responsable de esta patología (Liberski, 2012). No fue hasta 1936 cuando Cuillé y Chelle demostrasen por primera vez la transmisibilidad del scrapie entre ovejas (Cuille and Chelle, 1936), confirmando su carácter transmisible o infeccioso y evidenciando por primera vez, el largo periodo de incubación de la enfermedad. El descubrimiento accidental de otra característica del agente causante del scrapie puso de nuevo el foco de atención en las inusuales propiedades del agente causal de las EET, cuando parte de un rebaño de ovejas escocesas sufrió scrapie tras ser vacunadas con homogeneizados cerebrales ovinos tratados con formalina al 0,5%, sugiriendo resistencia a este agente químico por parte del scrapie (Gordon, 1946, Giles et al., 2017). Estudios posteriores confirmaron la inusitada resistencia del scrapie a concentraciones mayores de formalina y a temperaturas extremas, nunca antes observada en los agentes víricos o parásitos conocidos en la época (Stamp et al., 1959, Pattison, 1965, Pattison and Millson, 1961b).

Al mismo tiempo que se sucedían las investigaciones sobre la enfermedad de scrapie en ovejas, se describió la que posteriormente se revelaría como la enfermedad priónica más frecuente en seres humanos. En la década de 1920, Hans-Gerhard Creutzfeldt y Alfons Maria Jakob, dos neurólogos de origen alemán describieron, sin establecer relación alguna con el scrapie, una nueva neuropatología fatal de origen desconocido y evolución rápida, denominada Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD)

(Creutzfeldt, 1920, Jakob, 1921) por Walther Spielmeyer en 1922 (Spielmeyer, 1922). Curiosamente, el primer caso descrito por Creutzfeldt en 1920 (Creutzfeldt, 1920) fue descartado como enfermedad priónica años después, tras efectuarse análisis histopatológicos más completos. Al menos dos de los otros cinco casos reportados sí son considerados enfermedades priónicas según la definición actual. Según el testimonio de Walter R. Kirschbaum, profesor asistente de Jakob, el propio Creutzfeldt se mostraba escéptico con la posibilidad de que este primer caso padeciese la misma enfermedad descrita por Jakob en otros pacientes. Dichas dudas no eran compartidas por Jakob que, pese a la ausencia de espongiosis en el examen *post mortem*, afirmó que ambos casos eran idénticos o al menos estaban estrechamente relacionados (Asher and Gregori, 2018). Esto ha conducido a que algunos investigadores, como el propio Kirschbaum, reclamaran una mayor importancia a la contribución realizada por Jakob a la descripción de los primeros casos de la enfermedad y prefirieran utilizar el término inglés *Jakob-Creutzfeldt disease*. A pesar de estas circunstancias, el epónimo *Creutzfeldt-Jakob disease* sigue siendo el más utilizado en la actualidad (Lanska, 2017). Esta pequeña controversia es solo una muestra del desconocimiento que aún rodeaba a las enfermedades priónicas y la dificultad que presenta su diagnóstico, dados los signos heterogéneos y similares a los de otras enfermedades neurodegenerativas.

A principios de los años 50 se describió la que muchos consideran como la primera enfermedad priónica en humanos, el kuru. Este término, que significa “temblar de frío o fiebre” en el idioma de la etnia fore de Papúa-Nueva Guinea, hace referencia a un desorden neurológico que afectaba de forma endémica a esta población y cuyo origen los nativos atribuían a prácticas de hechicería (Asher and Gregori, 2018, Liberski et al., 2019). El cuadro clínico del kuru comprendía síntomas heterogéneos entre los que se incluían la ataxia, una progresiva disfunción motora y finalmente, la muerte del paciente en un periodo de tiempo que no excedía el año de duración, similares a los signos clínicos característicos de la CJD. Su descripción se debe en parte, al médico lituano Vincent Zigas, que ejercía su labor en Papúa-Nueva Guinea y en 1955 reconoció el kuru como una enfermedad neurodegenerativa no descrita hasta la fecha. Pensando en un primer momento que se trataba de una infección con encefalitis, envió muestras de suero de pacientes con kuru al laboratorio australiano del respetado virólogo sir F. Macfarlane Burnet, donde causalmente se encontraba de visita Daniel Carleton Gajdusek (Liberski et al., 2019). Los casos de esta extraña enfermedad captaron la atención de Gajdusek hasta el punto de que decidió unirse en 1957 a la investigación de Zigas en Papúa-Nueva Guinea para estudiar la enfermedad detalladamente. Juntos, los dos científicos identificaron 114 casos de kuru (Gajdusek and Zigas, 1957, Zigas and Gajdusek, 1957) y recopilaron los testimonios de la población fore, que describían el kuru como un mal que les afectaba desde principios del siglo XX, hicieron posible trazar el origen geográfico de la enfermedad en el noroeste de la isla (Gajdusek and

Zigas, 1961). La patología, que afectaba principalmente a niños y mujeres condujo a que Gajdusek la asociara con el endocanibalismo que practicaban los fore durante sus ritos funerarios. En dichas prácticas era común que la esposa del familiar fallecido y sus hijos consumieran el cadáver (excepto la vesícula biliar), incluyendo tejidos nerviosos como el encéfalo y la médula espinal, provocando así la transmisión del agente infeccioso de forma horizontal en el caso de que el familiar fallecido hubiera padecido la enfermedad de kuru (Liberski et al., 2019). De esta manera, Gajdusek teorizó con que el agente causal fuera un “virus lento” que permanecía en el sistema nervioso de los fallecidos y se transmitía por la ingesta de tejidos durante la celebración de ritos funerarios, diseminándose así en la comunidad fore. Estos hallazgos resultaron fundamentales en la descripción y definición del kuru, haciendo que Gajdusek recibiera el Premio Nobel de Medicina en 1976.

Junto con Gajdusek y Zigas, el patólogo polaco Igor Klatzo fue el primero en realizar un examen neuropatológico de doce cerebros afectados por kuru. Durante su examen, detectó lesiones únicas que se distribuían por todo el encéfalo, además de una proliferación excesiva de la glía y una degradación mielínica. Sin embargo, no reparó especialmente en la significancia de las alteraciones vacuolares de estos cerebros que serían claves para establecer una relación entre las enfermedades priónicas humanas y de otros mamíferos (Klatzo et al., 1959). Este hecho se debe a un veterinario experto en el estudio del scrapie, William Hadlow, quien poco después de la descripción del kuru, visitó el *Welcome Medical Museum* de Londres y tuvo la oportunidad de observar las imágenes tomadas por Klatzo. Hadlow, al estar familiarizado con las lesiones espongiiformes observadas en cerebros afectados de scrapie, reconoció la similitud con las alteraciones de las fotografías de cerebros con kuru y se puso en contacto con Gajdusek (Hadlow, 1959, Hadlow, 2008). Esta comunicación supuso el inicio de una fructífera colaboración entre ambos investigadores que, junto con otros científicos como Gibbs y Alpers, trataron de demostrar la transmisibilidad del kuru en primates. De esta manera, consiguieron inducir de forma experimental la enfermedad de kuru a chimpancés, monos araña y monos tití utilizando tejido nervioso de individuos afectados (Gajdusek et al., 1966, Gajdusek et al., 1968, Torrey and Peterson, 1973), empezando así a relacionar entre sí no solo el kuru y el scrapie, también la CJD. Basándose en que se trataba de distintas manifestaciones de un mismo tipo de enfermedad, transmitieron con éxito otros aislados naturales como el scrapie a cabras o el CJD a chimpancés (Gibbs et al., 1968), demostrando definitivamente que las tres patologías pertenecían a un grupo de enfermedades neurológicas transmisibles tras su inoculación intracerebral.

A pesar de la relevancia que tuvo la definición de las EET como un conjunto de enfermedades transmisibles que afectaban a distintas especies, la naturaleza del agente infeccioso continuaba siendo desconocida. En ese contexto, siguieron describiéndose diferentes enfermedades priónicas en

humanos y otros mamíferos. Debido a otro hecho accidental, se descubrió una fuente alternativa de transmisión horizontal de enfermedades priónicas, la enfermedad CJD iatrogénica (iCJD, del inglés *iatrogenic Creutzfeldt-Jakob Disease*). Aunque en la década de 1960 se habían reportado algunos casos sospechosos de transmisión priónica a través de material quirúrgico contaminado (Nevin et al., 1960, Will and Matthews, 1982), el primer caso confirmado de iCJD no fue descrito hasta 1974, cuando un implante de córnea supuso el fallecimiento de una mujer por CJD dos años después (Duffy et al., 1974). Posteriormente se identificaron otras fuentes de transmisión como preparaciones de la hormona humana del crecimiento contaminadas con priones (Brown et al., 2012, Cali et al., 2015), trasplantes de duramadre cadavérica (Kobayashi et al., 2014) o la contaminación del propio instrumental médico (el Hachimi et al., 1997). Al descubrimiento de la iCJD le sucedió otro hecho relevante; en 1986, Lugaresi y colaboradores describieron una nueva enfermedad priónica a la que denominaron Insomnio Familiar Letal (FFI, del inglés *Fatal Familial Insomnia*) y que afectaba a varios miembros de una familia italiana (Lugaresi et al., 1986). Los afectados por este desorden neurológico presentan un cuadro clínico atípico caracterizado por lesiones en el tálamo que conducían a graves alteraciones del sueño, disautonomía y déficits motores asociados a una atrofia severa (Medori et al., 1992). Poco después de esta descripción, la enfermedad se relacionó con una mutación puntual en la secuencia de la proteína priónica, siendo considerada únicamente como una enfermedad priónica genética (Goldfarb et al., 1992). Esta idea se mantuvo hasta que posteriormente se reportó un caso con las características clínicas e histopatológicas típicas del FFI, pero sin la presencia de la mutación, sugiriendo que esta enfermedad puede manifestarse también de forma esporádica (sFI, del inglés *Sporadic Fatal Insomnia*) (Mastrianni et al., 1999). Estas nuevas enfermedades priónicas humanas se sumaron al Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), descrito previamente en 1936 tras la detección de una familia que acumulaba hasta siete casos de demencia progresiva y ataxia en el cerebelo (Zeidman et al., 2014, Boellaard and Schlote, 1980). Aunque la patología se describió en los albores del siglo XX, la tesis más defendida acerca de la etiología de esta enfermedad seguía apuntando a un virus como responsable (Masters et al., 1981). En el caso del GSS, no fue hasta 1989 cuando se descubrió la primera mutación patogénica asociada a esta enfermedad, otorgándole el carácter de enfermedad priónica genética y considerándola una enfermedad diferente de la CJD debido a sus peculiaridades fenotípicas y bioquímicas (Hsiao et al., 1989, Goldgaber et al., 1989). La última EET, descrita en 2008 y que afecta de forma natural al ser humano ha sido la Prionopatía con Sensibilidad Variable a Proteasas (VPSPr, del inglés, *Variable Proteases-Sensitive Prionopathy*) (Gambetti et al., 2008). Desde entonces, se han reportado 37 casos que han permitido una mejor definición de la patología, asociándola a una isoforma de la proteína priónica no resistente a proteasas, a unas características histopatológicas muy exclusivas y a unos signos clínicos muy heterogéneos, haciendo de la VPSPr una enfermedad muy distinta al resto de prionopatías descritas (Zou et al., 2010).

Aparte de estas enfermedades priónicas humanas, durante la segunda mitad del siglo XX se describió una serie de prionopatías que ocurrían en la naturaleza y afectaban a una amplia variedad de mamíferos. Una de ellas fue la Encefalopatía Transmisible del Visón (TME), que fue observada por primera vez en una granja de Wisconsin (Estados Unidos) en 1947. Desde entonces, se han detectado otros casos en el mismo país, pero también en Canadá, Finlandia, Alemania y en la extinta Unión Soviética (Marsh and Hadlow, 1992, Hartsough and Burger, 1965). También se describió en 1967 la Enfermedad Debilitante Crónica (CWD) en ciervos mula cautivos en unas instalaciones de Colorado (Estados Unidos) (Williams and Young, 1980). Desde aquella primera observación, la enfermedad se ha propagado rápidamente, afectado prácticamente a la totalidad de Norteamérica y detectándose casos recientemente en Noruega, Finlandia y Suecia (Benestad et al., 2016). Posiblemente, la enfermedad priónica en animales más conocida por el impacto social que tuvo, sea la Encefalopatía Espongiforme Bovina, responsable de la epidemia de las “vacas locas” a finales de la década de 1990 y de la variante o nueva variante de la CJD (vCJD, del inglés, *variant CJD*) surgida tras su transmisión al ser humano (Hill et al., 1997). La BSE fue responsable de otras enfermedades como la Encefalopatía Espongiforme de Ungulados Exóticos en rumiantes exóticos de la familia *Bovidae* (Kirkwood et al., 1990) y de los casos de Encefalopatía Espongiforme Felina (FSE, del inglés, *Feline Spongiform Encephalopathy*), que se describieron en el Reino Unido desde 1990 hasta el año 2000 (Pearson et al., 1992).

1.2. Controversia acerca de la naturaleza del agente infeccioso

El concepto de que el agente infeccioso responsable de las EET fuera un virus con un prolongado periodo de incubación o “virus lento” fue propuesto por primera vez para el scrapie por Stockman en 1913, de nuevo por Chelle y Cuillé en 1936 cuando demostraron la transmisibilidad del agente entre ovejas (Cuille and Chelle, 1936) y apoyada por Wilson en 1950, aunque no fue formalmente enunciada por el patólogo Björn Sigurdsson hasta 1954. Sigurdsson, que había estudiado ampliamente el scrapie en ovejas de distinta procedencia proponía que la existencia de numerosas enfermedades infecciosas de curso lento con un periodo de latencia anormalmente largo y que generalmente terminaban en una enfermedad grave o la muerte (Johnson, 1974). Sin embargo, casi al mismo tiempo que la teoría del “virus lento” ocurrieron diversos hechos que impidieron demostrar definitivamente este postulado. Un ejemplo lo encontramos en la vacunación a gran escala realizada en 1935 contra la encefalomiелitis ovina mencionada con anterioridad, donde inmunizaron a ovejas de todo el país con homogeneizados cerebrales de oveja tratados con formalina al 0,5% para inactivar el virus. Durante los siguientes dos años, ganaderos de todo el país comenzaron a detectar casos de scrapie entre sus ovejas. Todas las campañas de vacunación se realizaron a partir del mismo lote, sugiriendo que dicho material se

encontraba contaminado con scrapie y que el agente infeccioso presentaba resistencia a formalina (Gordon, 1946, Greig, 1950). Los estudios de Pattison utilizando concentraciones crecientes de formalina confirmaron la resistencia del scrapie a este agente químico (Pattison, 1965). De la misma manera, comenzaron a emerger investigaciones que otorgaban características inusuales al agente infeccioso causante del scrapie, como su alta resistencia a la ebullición (Stamp et al., 1959), a los ciclos de congelación y descongelación (Pattison and Millson, 1961b) y a la extracción con determinados alcoholes (Stamp et al., 1959).

A pesar de estas nuevas evidencias, la principal teoría seguía siendo la del origen vírico de Sigurdsson. Las investigaciones sobre el kuru que comenzaron Gajdusek y sus colaboradores resultaron claves a la hora de demostrar la transmisibilidad del agente infeccioso a otras especies (Gajdusek et al., 1966, Gibbs et al., 1968, Gajdusek et al., 1968). Estos autores consiguieron reproducir en los primates los signos clínicos característicos de la enfermedad en humanos, confirmando además la transmisión de la enfermedad ya establecida entre primates mediante un segundo pase y utilizando diluciones seriadas del material infeccioso filtrado. Los datos de estas transmisiones espolearon a Gajdusek y a Gibbs a proponer el término de Encefalopatía Viral Espongiforme Subaguda para enfermedades priónicas como la CJD, el kuru, el scrapie y la TME (Gibbs, 1967). La transmisibilidad entre especies más cercanas estaba ampliamente demostrada, pero fue un aislado natural de scrapie procedente del instituto Moredun (Reino Unido) el que sirvió para que Pattison y Millson pudieran transmitir el scrapie ovino a cabras observando por primera vez la aparición de cepas diferentes. Detectaron dos comportamientos claramente diferenciados en las cabras de experimentación, pudiendo distinguir como algunas de ellas presentaban una sintomatología de rascado (*scratching*, en inglés) mientras que otras se mostraban aletargadas (*drowsy*, en inglés) (Pattison and Millson, 1961b). Los experimentos de inoculación llevados a cabo por estos investigadores demostraron que el scrapie podía ser transmitido a cabras y a diferentes razas de ovejas con distintos grados de susceptibilidad, estableciendo el concepto de barrera de transmisión. Estos datos, lejos de esclarecer la etiología de las EET, contribuyeron a la hipótesis del “virus lento” ya que, la existencia de diferentes cepas capaces de variar características como su transmisibilidad, podía sugerir que el agente infeccioso sufría cambios en su material genético que le permitían adquirir nuevas propiedades (Lampert et al., 1972).

La transmisibilidad del agente infeccioso a especies taxonómicamente más alejadas que la de origen también se demostró durante estos años. Utilizando los aislados de cabra *drowsy* y *scratching* como inóculo se consiguió inducir una enfermedad priónica en ratones de tipo silvestre (también denominado WT, del inglés, *wild-type*) (Chandler, 1961), dando pie a otros estudios donde transmitieron directamente el scrapie originado en oveja a ratones WT (Zlotnik and Rennie, 1963) o

incluso a ratas (Chandler and Fisher, 1963). La inclusión de roedores como modelo experimental de la enfermedad permitió acelerar el estudio detallado del agente patogénico, a la vez que su controvertida clasificación inicial como “virus lento” fue perdiendo adeptos a medida que se sucedían las evidencias en contra. La menguante confianza en la hipótesis vírica se refleja en la gran cantidad de teorías alternativas surgidas en la época en relación con la identidad del agente infeccioso, y que lo consideraban viroide, elemento de tipo retrovirus o una membrana con capacidad autoreplicativa, aunque ninguna de ellas pudo ser probada (Liberski, 2012). A la imposibilidad de aislar la partícula vírica responsable, se le sumó la aparición de diversos estudios que comenzaron a hacer tambalear la teoría vírica, como los realizados por Tikvah Alper y su equipo durante esos años. Alper evidenció la inusual resistencia del patógeno a radiaciones ultravioleta de 254 μm y al tratamiento por nucleasas, ambas en dosis superiores a las comúnmente utilizadas para inactivar ácidos nucleicos (Alper et al., 1967, Latarjet et al., 1970). Por otro lado, estimaron que el tamaño del agente causante de las EET no podía ser superior a 2×10^5 Dalton (Da), siendo demasiado pequeño como para tratarse de un virus o un microorganismo y sugiriendo que posiblemente el agente carecía de ácidos nucleicos (Alper et al., 1966, Alper et al., 1978). Esta sugerencia fue rechazada en un primer momento por la comunidad científica, ya que contradecía el dogma central de la biología. Sin embargo, algunos investigadores sí fueron cautivados por esta idea, como fue el caso el John S. Griffith, que propuso una teoría basada en la posible existencia de una estructura proteica como agente causal de las prionopatías. Griffith basó su modelo de enfermedad en una proteína capaz de presentar dos estructuras diferentes; una estable o A' y otra estructura inestable o A. En condiciones normales, la formación de la estructura A es termodinámicamente desfavorable, por lo que se encuentra en minoría. A pesar de la escasez de unidades con la configuración A, estas serían capaces de agregar y formar dímeros, que irían sumando proteína estable de configuración A' y harían crecer la estructura en un proceso ahora sí, favorecido termodinámicamente (Griffith, 1967). Aunque se trataba de una aproximación puramente teórica, fue la más cercana a la hipótesis “solo proteína” que revolucionaría a la comunidad científica años después.

1.3. Ataque al dogma central de la biología: Hipótesis “solo proteína”

El modelo de Griffith impulsó a que cada vez más investigadores aportasen evidencias a favor de la naturaleza proteica del agente infeccioso. En este sentido, el avance más relevante del campo tuvo lugar a principios de la década de 1980 con las investigaciones de Stanley Prusiner, quien determinó la naturaleza del agente causal, por lo que recibió el Premio Nobel de Medicina en 1997. El interés de Prusiner por las EET comenzó cuando se encontraba realizando una residencia en Neurología en la Universidad de California, donde un paciente con CJD falleció en otoño de 1972. La explicación que

recibió de que un “virus lento” era capaz de provocar tal degeneración en el tejido neuronal sin afectar al resto de órganos no satisfizo a Prusiner, quien se dedicó a estudiar esta rara patología (Prusiner, 1998). Su fascinación por la CJD rápidamente incluyó también al scrapie, cuando supo acerca de las investigaciones de Alper sobre la extrema resistencia que presentaba el patógeno a la inactivación por UV y radiaciones iónicas. Prusiner se centró en dilucidar la naturaleza química del agente infeccioso, para lo cual sometió tejidos de animales infectados con scrapie a diferentes métodos de inactivación de proteínas, como fenol, hidrócloruro de guanidinio, urea y varios detergentes para observar que la infectividad de las muestras desaparecía (Prusiner et al., 1980a, Prusiner et al., 1980b, Prusiner et al., 1981). Estos resultados coincidían con el hecho de que el agente causante del scrapie mostraba una gran resistencia a variaciones del pH, modificaciones químicas (Stamp et al., 1959, McKinley et al., 1981) e incluso a la fotorreacción con psoralenos, métodos clásicamente aplicados para abolir la infectividad de agentes víricos (McKinley et al., 1983). Sin embargo, dicho agente resultaba sensible a métodos que afectaban a los aminoácidos en lugar de a los ácidos nucleicos, como la reducción de la cantidad de scrapie en tejidos tras el tratamiento con proteinasa K (PK) y tripsina (Hunter and Millson, 1967). Apoyándose en estos resultados y con los estudios teóricos de Griffith en mente, Prusiner propuso el término “prion” (del inglés *Proteinaceous Infectious Particle*), para denominar a la pequeña partícula infecciosa que, siendo resistente a la mayoría de los procedimientos convencionales de inactivación de ácidos nucleicos pero sensible a aquellos dirigidos a inactivar proteínas, era la causante de las EET (Prusiner, 1982).

Este hecho supuso un desafío a los principios básicos de la biología, puesto que dotaba de infectividad propia a una proteína y la diferenciaba así de otros patógenos como virus, bacterias u hongos, causando un gran revuelo entre la comunidad científica. De forma paralela, Bolton y sus colaboradores aislaron por primera vez, a partir de cerebros de hámster infectados con scrapie, una proteína que se encontraba de forma abundante en la fracción infecciosa de estos homogeneizados cerebrales. Observaron que la proteína en cuestión era resistente al tratamiento con proteasas y presentaba un tamaño de 27-30 kDa (Bolton et al., 1982). Los primeros en observar de forma directa esta peculiar proteína fueron Patricia Merz y sus colaboradores quienes, utilizando la técnica de tinción negativa, visualizaron al microscopio electrónico estructuras fibrilares anormales en cerebros de roedores infectados con scrapie (Merz et al., 1981). Al emplear el mismo protocolo utilizando muestras de pacientes afectados por CJD y kuru, observaron la misma clase de fibras, aunque las clasificaron de forma errónea como un tipo de “virus filamentoso” (Merz et al., 1984). Estas mismas estructuras fueron observadas por Prusiner, que las etiquetó como “varillas priónicas” (*prion rods* en inglés), proponiendo para ellas una naturaleza amiloidea relacionada con los agregados presentes en el cerebro de los pacientes y señalando la proteína del prion (PrP, del inglés, *Prion Protein*) y más

concretamente a esa fracción de entre 27 y 30 kDa (PrP²⁷⁻³⁰), como el único agente causal de las ETT (Figura 2) (Prusiner et al., 1983).

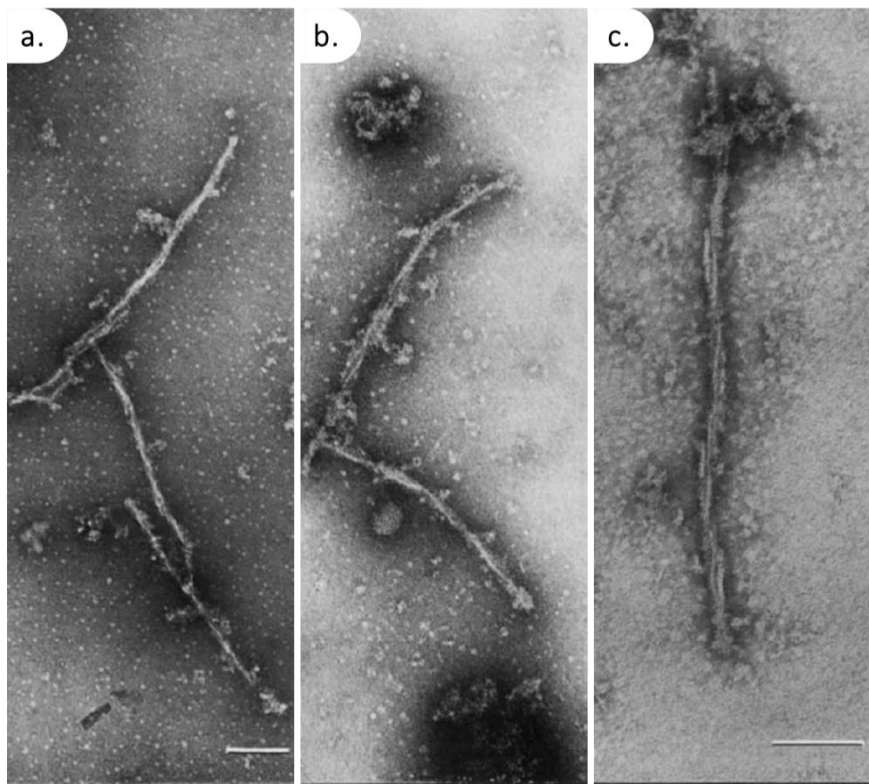


Figura 2. Imágenes de microscopía electrónica de fibras de PrP asociadas a EET. a) Microfotografía de campo oscuro teñida con ácido fosfotúngstico que muestra las denominadas “varillas priónicas” constituidas por PrP^{Sc} y purificadas a partir de un cerebro de hámster infectado con CJD; **b)** de un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

Tras ello, el grupo de Prusiner consiguió aislar la secuencia correspondiente a los 15 últimos aminoácidos del extremo amino terminal de la recién denominada PrP, valiéndose para ello de homogeneizados de hámster infectados con scrapie (Prusiner et al., 1984). Esto permitió a Chesebro y sus colaboradores a aislar y secuenciar el ARN mensajero (del inglés mRNA) que codificaba la PrP²⁷⁻³⁰. Estos transcritos se encontraron tanto en animales sanos como en aquellos infectados por EET, apuntando a que esta proteína podría ser un componente cuya presencia era habitual en el cerebro de los roedores (Chesebro et al., 1985). Con estas herramientas, el grupo de investigación de Oesch demostró que dicha proteína estaba codificada en un gen de copia única, cuyo producto inicial debía ser una proteína de unos 33-35 kDa, mayor que la PrP²⁷⁻³⁰ aislada en trabajos anteriores (Oesch et al., 1985). Estos estudios culminaron con la clonación del gen que codifica la PrP realizada en el laboratorio del prestigioso biólogo molecular Charles Weissmann en 1986. Dicho gen, bautizado por este grupo como *PRNP*, parecía expresarse constitutivamente en las neuronas de los animales sanos, además de en otros tipos celulares, sugiriendo una expresión ubicua (Basler et al., 1986, Carlson et al., 1986). Estas

investigaciones terminaron por definir que la isoforma de menor peso molecular de la proteína conocida como PrP²⁷⁻³⁰ o PrP^{Sc} (por su asociación clásica al scrapie), era la responsable de las EET y que la isoforma de mayor peso molecular, denominada PrP^C (PrP celular), se asociaba a individuos sanos, estando ambas isoformas codificadas en el mismo gen cromosómico.

Con la formulación de la hipótesis “solo proteína”, Prusiner consiguió aunar todas las observaciones realizadas hasta la fecha para las EET, surgiendo en esta década numerosas evidencias que apoyaban dicho postulado. De esta manera, el agente causante de las enfermedades priónicas propuesto es la PrP^{Sc}, la isoforma patogénica de la proteína celular del prion o PrP^C, una proteína no neurotóxica y que se encuentra de forma natural en la membrana de la mayoría de los tipos celulares de los mamíferos. La teoría de Prusiner, respaldada hoy en día por la totalidad de la comunidad científica, no tuvo una acogida fácil en sus inicios. A pesar de aportar evidencias de que el agente infeccioso causante de las prionopatías era la PrP, todavía quedaban muchas incógnitas acerca de sus propiedades y de su capacidad para transmitirse a otros individuos. Incógnitas, algunas de las cuales, se han ido resolviendo en los años posteriores y que trataremos en el siguiente apartado. En cuanto al mecanismo molecular que da lugar a que la PrP^C, isoforma sana y no patogénica, se convierta en PrP^{Sc} causando una enfermedad fatal, permanece aún desconocido. El hecho de que esta conversión ocurra en ocasiones de forma espontánea, sin contacto con la PrP^{Sc} exógena y sin la presencia de mutaciones en el gen *PRNP*, no deja de ser un suceso único cuyos mecanismos subyacentes se ignoran en gran medida y sobre el que se profundizará en apartados posteriores.

1.4. Hacia la aceptación de la Hipótesis “solo proteína”

A pesar de las innovadoras aproximaciones de Stanley Prusiner para probar la validez de la hipótesis “solo proteína”, lo cierto es que pasaron años antes de que fuera ampliamente aceptada por la comunidad científica. Aunque los experimentos realizados por Prusiner y colaboradores parecían indicar que el agente causal de las EET era de naturaleza exclusivamente proteica, fueron necesarias más investigaciones que apoyaran dicho estamento. Las pruebas que ayudaron a la aceptación de esta hipótesis estuvieron soportadas por exámenes bioquímicos, observaciones en modelos *in vivo* y, finalmente estudios *in vitro* que no dejaban lugar a dudas de la naturaleza proteica del prion.

1.4.1. Evidencias bioquímicas y biológicas

Las primeras evidencias surgieron antes del establecimiento de la biología molecular moderna, ya que desde la década de 1920 se recabaron datos relacionados con la herencia genética de enfermedades como la CJD. La observación por parte de Pattison y Millson a principios de la década

de 1960 de dos comportamientos claramente diferenciados en cabras de experimentación, les permitió distinguir por primera vez diferentes cepas capaces de reproducir dichos comportamientos a través de sucesivas inoculaciones en cabras y ovejas (Pattison and Millson, 1961b). Sin embargo, aunque en su momento este fenómeno se catalogó como una evidencia a favor de la naturaleza vírica del agente causante de scrapie, ahora sabemos que fue de las primeras pruebas biológicas que apoya la hipótesis “solo proteína”, ya que le otorga importancia tanto a la dotación genética del agente causal como a la del huésped, además de sentar las bases del concepto que luego se definiría como barrera de transmisión. La naturaleza genética de las EET fue estudiada con mayor profundidad por Dickinson y colaboradores en la década de 1960, cuando trataron de explicar el hecho de que ciertas cepas de scrapie presentaran distintos tiempos de incubación en ratones (Dickinson and Mackay, 1964). Este grupo de investigadores pudo demostrar que el período de incubación dependía de un *locus* cromosómico al que denominaron *Sinc* (del inglés, *scrapie incubation*), y que también localizaron en ovejas, denominándolo *SIP* (del inglés, *Shorter Incubation Period*) por su menor tiempo de incubación en esta especie (Dickinson et al., 1968). Continuando con los estudios de Dickinson, George Carlson y Prusiner aislaron el *locus* que contenía el gen que codifica la PrP^C y lo nombraron *Prn-p*. Estos investigadores se dieron cuenta de que este *locus* se encontraba estrechamente relacionado con el *locus sinc*, al que llamaron *Prn-i* (Carlson et al., 1986). Durante los años posteriores se realizaron experimentos con polimorfismos del gen *Prn-p* para demostrar el control del periodo de incubación en el ratón, proporcionando información suficiente como para considerar que los genes *Prn-p* y *Prn-i (sinc)* eran en realidad el mismo gen (Moore et al., 1998).

En paralelo a los estudios genéticos, se sucedieron durante esta época evidencias que respaldaban el origen proteico de este agente infeccioso. Los estudios de Alper sobre la imposibilidad de inactivar al agente infeccioso mediante radiaciones ultravioleta y la estimación de su tamaño aproximado, resultaron clave en el establecimiento de la teoría “solo proteína”, aunque tuvo detractores que defendían la presencia de ácidos nucleicos y seguían convencidos de que un virus era el responsable de las EET (Rohwer, 1986). En paralelo a la demostración de que los métodos convencionales para la inactivación de virus resultaban ineficaces para el scrapie, se describió por primera vez la sensibilidad de dicho agente a proteinasas (Hunter and Millson, 1967), aunque no fue hasta los estudios de Prusiner en el año 1982 cuando se le dio relevancia a este dato. Los resultados de este grupo demostraron que, tras la purificación de la fracción infecciosa resistente a PK, la concentración de proteína era proporcional a la infectividad de la muestra, pudiendo ser neutralizada por agentes desnaturalizantes de proteínas. Esta infectividad quedó totalmente demostrada con la generación de priones a partir de proteína recombinante utilizando técnicas *in vitro*, lo que supuso para muchos, el fin de la controversia acerca de la naturaleza del prion (Soto, 2011).

Hasta llegar a ese punto, tuvieron que pasar aún varias décadas de investigación y se requirió dar respuesta a preguntas como qué diferencia existe entre la PrP^C (isoforma sana) y la PrP^{Sc} (isoforma patogénica). Una de las primeras explicaciones que propusieron Prusiner y colaboradores fue la existencia entre ellas de modificaciones post-traduccionales, por lo que muchos investigadores comenzaron a estudiar esta posibilidad. Fue así como detectaron una modificación post-traducciona que ocurría tanto en PrP^C como en PrP^{Sc}; la presencia de un glicolípido (fosfatidil-inositol) que sirve de anclaje a la membrana celular, concluyendo que ambas isoformas partían de la misma secuencia aminoacídica y sufrían idéntica modificación (Stahl et al., 1987). Un estudio más fino realizado por este mismo grupo concluyó que ambas formas de la proteína no diferían a nivel aminoacídico ni de modificaciones post-traduccionales, sugiriendo por primera vez que las diferencias podrían radicar en el nivel estructural (Stahl et al., 1993). Los estudios estructurales de la PrP^{Sc} o PrP²⁷⁻³⁰ se habían realizado mediante estrategias como el dicroísmo circular (DC, del inglés, *Circular Dichroism*) o la cristalografía, que se veían limitadas por la naturaleza insoluble de esta isoforma y su incapacidad para dar lugar a cristales. Combinando la técnica del dicroísmo circular con la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR, del inglés, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), el grupo de Byron Caughey pudo realizar un estudio preliminar de la estructura secundaria de agregados de PrP resistentes a PK basándose en el algoritmo de Garnier, que asigna porcentajes estructurales en función de cómo se comportan otras proteínas conocidas (Caughey et al., 1991). Estas técnicas biofísicas permitieron un mejor modelaje de las estructuras secundarias que adoptaban ambas formas de la proteína, mostrando una disminución en el contenido de hélices- α en favor de un aumento en la proporción de láminas- β (Pan et al., 1993). La lámina- β (también conocida como hoja plegada β) es una de las estructuras secundarias posibles adoptada por las proteínas y caracterizada por su hidrofobicidad y su propensión a formar oligómeros, lo que explicó la tendencia a la agregación y acumulación de fibras en el cerebro de individuos afectados por EET (Fraser and Bruce, 1973). La mayor presencia de este motivo estructural en la PrP^{Sc} explicó algunas de las propiedades bioquímicas observadas en investigaciones anteriores, como la alta insolubilidad en detergentes no iónicos que presentaba el agente infeccioso o la resistencia parcial a la digestión por proteinasas. El aumento de láminas- β consiguió también explicar la diferencia de tamaño entre la PrP^C observada en individuos sanos y la isoforma patogénica PrP^{Sc}, señalando que el tratamiento con proteinasas como la PK era capaz de digerir únicamente los primeros 90 aminoácidos de la PrP^{Sc}, dando como producto final un núcleo resistente de 27-30 kDa que anteriormente había sido nombrado como PrP²⁷⁻³⁰ y que se distinguía de la PrP^C por su peso molecular (Cohen and Prusiner, 1998). Esta isoforma resistente a la digestión con proteasas (llamada también PrP^{res}) se organiza en forma de fibras en los cerebros de individuos afectados y, aunque hoy en día sigue siendo el marcador patognomónico de las

prionopatías, recientemente se ha descrito una variante de las enfermedades priónicas, la VPSPr, en la cual la PrP^{Sc} es sensible al tratamiento con PK (Zou et al., 2010).

Con todas estas evidencias bioquímicas que ponían el foco de atención sobre la PrP y el gen que la codificaba, las formas familiares de la enfermedad no tardaron en ser descubiertas. A medida que las herramientas genéticas se modernizaban, se describían cada vez más mutaciones asociadas a la enfermedad. Algunas de las más destacadas fueron la relación entre la mutación P102L y el GSS (Hsiao et al., 1989), el descubrimiento de que las inserciones de una zona de octa repeticiones causaban una forma familiar o hereditaria de CJD (fCJD, del inglés, *familial Creutzfeldt-Jakob Disease*) (Goldfarb et al., 1991) o la relación entre la mutación D178N y el FFI (Goldfarb et al., 1992). Desde entonces y hasta la fecha se han identificado más de 40 mutaciones en el gen de la PrP humana que causan enfermedades priónicas de origen genético y que suponen alrededor del 10-15% de las enfermedades priónicas humanas, siendo el resto de ellas enfermedades adquiridas (de origen infeccioso o iatrogénico) y las denominadas esporádicas, de etiología desconocida (Jeong and Kim, 2014).

1.4.2. Evidencias sustentadas en modelos animales

La demostración de la transmisibilidad de las enfermedades priónicas y la existencia de una barrera entre especies, fueron de capital importancia para demostrar la naturaleza del agente infeccioso. Los primeros estudios de transmisión se realizaron utilizando ovejas y primates (Cuille and Chelle, 1936, Gajdusek et al., 1966) y, aunque sirvieron para confirmar la naturaleza infecciosa de la enfermedad, no ayudaron a esclarecer el origen del agente. Sin embargo, la adaptación de diferentes aislados de scrapie a ratones WT supuso un salto cualitativo en la investigación de las EET. Además de ofrecer un modelo de estudio *in vivo* mucho más accesible que los utilizados hasta la fecha, la observación de períodos de incubación variables según el aislado utilizado y la existencia de una barrera de transmisión entre distintos tipos de roedores (Chandler, 1961), señalaron la importancia del huésped y concretamente, como se comprobaría años después, la relevancia que tiene la estructura primaria de su PrP.

La irrupción de los modelos transgénicos supuso una revolución para el campo de la genética y la biología molecular a principios de la década de 1980 (Palmiter et al., 1982), aunque el primer modelo murino transgénico en el campo de los priones no se obtuvo hasta finales de la década. Dicho modelo fue fruto de las investigaciones de DeArmond y colaboradores, quienes crearon un modelo de ratón que expresaba el transgén que codifica la PrP^C del hámster sirio dorado, uno de los roedores más utilizados históricamente en la investigación de las EET. Inocularon con cepas de scrapie a estos

ratones transgénicos y a ratones WT, observando diferencias claras en sus periodos de incubación y demostrando de forma incontestable la importancia de la PrP^C del huésped en la susceptibilidad a las cepas de priones (Scott et al., 1989). El siguiente modelo transgénico en el campo de los priones supuso una evidencia clave para la aceptación de la teoría “solo proteína”, ya que desarrollaba síntomas sin necesidad de inocular ningún agente infeccioso exógeno. Dicho modelo, generado por Hsiao y sus colaboradores, sobreexpresaba la PrP de ratón con la mutación equivalente a la P102L asociada al GSS en humanos, probando que únicamente se necesitaba una mutación puntual en el gen que codifica la PrP^C para provocar una EET similar al GSS humano (Hsiao et al., 1991). La generación de ratones a los cuales se les había suprimido el gen *PRNP* (*PRNP*^{-/-}) permitió demostrar que estos ratones *knock-out* (KO), al no presentar la PrP^C endógena, resultaban resistentes a la infección por scrapie, sin mostrar signos clínicos a lo largo de su vida, ni alteraciones histopatológicas tras el examen *post mortem* (Bueler et al., 1993). El siguiente paso fue la generación de ratones que solo expresaban una copia del gen, es decir eran hemicigotos para el gen de la *PRNP* (*PRNP*^{+/-}). Este modelo 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. Estos ratones mostraron tiempos de incubación más largos que los ratones WT, homocigotos para el gen *PRNP* (*PRNP*^{+/+}) (Bueler et al., 1994). Siguiendo esta línea, también se observó que los ratones transgénicos que sobreexpresaban la PrP^C murina, desarrollaban una enfermedad neurológica significativamente más rápida (Klohn et al., 2003). Los modelos transgénicos que expresaban secuencias de PrP de diferentes especies proliferaron durante los años siguientes, y siguen siendo una fuente de información muy valiosa hoy en día para el estudio de la barrera de transmisión, como es el caso del estudio de la diferente susceptibilidad a scrapie debida a polimorfismos en la PrP ovina (Laude et al., 2002).

1.4.3. Evidencias derivadas de modelos *in vitro*

Las investigaciones realizadas con modelos *in vivo* supusieron un importante respaldo a la teoría de la naturaleza proteica del agente infeccioso responsable de las EET. Sin embargo, algunos miembros de la comunidad científica aún se mostraban reticentes a aceptar la hipótesis “solo proteína” planteada por Prusiner en 1982. La aceptación mayoritaria de la teoría no tuvo lugar hasta la demostración de que proteínas priónicas recombinantes malplegadas espontáneamente *in vitro* reproducían una enfermedad priónica tras ser inoculadas en modelos animales de genotipo silvestre. El primer paso en esa dirección lo dio el grupo de Byron Caughey, que ideó un ensayo de conversión *in vitro* conocido como “ensayo libre de células” (del inglés, *cell-free assay*). Utilizando esta técnica pudieron convertir PrP^C purificada de encéfalos de animales sanos, en una PrP resistente a proteasas (PrP^{res}) tras ponerla en contacto con una pequeña cantidad de PrP^{Sc} purificada a partir de cerebros de

hámsteres sirios infectados con scrapie (Kocisko et al., 1994). Utilizando esta misma herramienta, mantuvieron las características de algunas cepas de priones ampliamente estudiadas *in vivo*, propagadas *in vitro* a expensas de PrP^C de hámster sirio (Bessen et al., 1995). El novedoso uso de un sistema *in vitro* para demostrar que la conversión de la PrP^C estaba mediada por la PrP^{Sc}, no fue suficiente prueba para los detractores de la teoría “solo proteína”, en gran parte debido al bajo rendimiento de la técnica, al uso de condiciones no fisiológicas y a la imposibilidad de evaluar correctamente la infectividad de la nueva PrP^{Sc} producida *in vitro*, debido a la enorme cantidad de PrP^{Sc} purificada necesaria para la conversión.

En el año 2001, se consiguió una conversión más eficiente y rápida de PrP^C partiendo de una cantidad mucho menor de PrP^{Sc}, sentando así las bases de la técnica que posteriormente cambiaría la manera de estudiar los priones *in vitro* (Saborio et al., 2001). Esta técnica, la amplificación cíclica de proteínas malplegadas o PMCA (del inglés, *Protein Misfolding Cyclic Amplification*), se basa en la aplicación de ciclos de sonicación e incubación para convertir grandes cantidades de PrP^C contenida en homogenizados de encéfalo de animales sanos, que actúa como sustrato de la reacción, en la isoforma malplegada de la proteína o PrP^{Sc}. Esta herramienta amplifica cantidades ínfimas de PrP^{Sc} que actúa como semilla iniciadora, mimetizando el proceso de malplegamiento con una cinética acelerada. Los priones resultantes tras la aplicación de esta técnica conservan las características biológicas, bioquímicas y estructurales de la semilla iniciadora de la conversión (Castilla et al., 2005). Estos estudios demostraron que la conversión de la PrP^C era dependiente de la presencia de PrP^{Sc} y que inducía el mismo malplegamiento en un proceso autocatalítico de conversión capaz de repetirse de forma indefinida, siempre y cuando existiese PrP^C en el medio. Estas conclusiones, que apoyaban firmemente la hipótesis de la teoría “solo proteína”, resultaron insuficientes para los que defendían un origen distinto al proteico. En esta ocasión, argumentaban que el uso de PrP^C y PrP^{Sc} procedente de encéfalos de animales no garantizaba la pureza de la PrP^{Sc} que presuntamente se formaba, y exigían la generación de PrP^{Sc} en un ambiente controlado utilizando únicamente proteína priónica sin ningún componente cerebral añadido. La obtención de priones *in vitro* en un ambiente controlado y libre de los componentes cerebrales ocurrió en 2004, cuando Legname y colaboradores generaron de forma espontánea fibras amiloides *de novo* sin utilizar PrP^{Sc} como semilla iniciadora del proceso. En este caso, utilizaron PrP recombinante producida en *Escherichia coli* (*E. coli*) en lugar de PrP^C de origen encefálico, eliminando así las posibles críticas sobre la presencia de factores encefálicos. Estos autores obtuvieron proteínas malplegadas tanto de forma espontánea como utilizando una semilla de PrP^{Sc} iniciadora, resultando ambos productos infecciosos *in vivo*. Sin embargo, dicha infectividad solo se consiguió en modelos animales que sobreexpresaban la PrP^C de ratón, presentando además periodos de incubación considerablemente más largos que los observados con priones de origen encefálico (Legname et al.,

2004). A este hecho se aferraron los detractores de la técnica, argumentando que los modelos animales con sobreexpresión de PrP^C acaban desarrollando una prionopatía y que, por lo tanto, las fibras producidas *de novo* no hacían más que acelerar la aparición de esta enfermedad que acabaría por desarrollarse espontáneamente.

La generación espontánea de priones capaces de causar enfermedad en modelos WT ocurrió tan solo cinco años después gracias a las investigaciones de Makarava y Baskakov. Partiendo únicamente de proteína recombinante de hámster sirio y aplicando una técnica de incubación y agitación, obtuvieron fibras de PrP^{res} que mostraban un núcleo resistente de 16 kDa tras su digestión con PK y que resultaron infecciosas tras pases de inoculación en hámsteres. Probablemente como consecuencia de su baja infectividad, las fibras de PrP^{res} generadas *in vitro* no indujeron una enfermedad en los animales tras su inoculación directa. Por ello, se requirió de un segundo pase a partir de encéfalos de los hámsteres inoculados para inducir una enfermedad que además de presentar un largo periodo de incubación, se caracterizaba por mostrar signos clínicos muy leves en comparación con otras cepas clásicas de priones en este tipo de roedores (Makarava et al., 2010). En el mismo año, Kim y colaboradores obtuvieron priones utilizando la técnica de PMCA con PrP purificada de *E. coli* como sustrato, pero añadiendo PrP^{Sc} de encéfalos como semilla, por lo que tampoco se consideró una demostración suficiente para la teoría “solo proteína” (Kim et al., 2010). Sin embargo, y casi de forma paralela, se consiguió la evidencia definitiva que demostraba la veracidad de esta teoría. El grupo de Ma reportó la obtención del primer prion recombinante que, obtenido de forma espontánea tras 17 rondas de PMCA, causaba una enfermedad priónica clásica tras su inoculación en ratones WT, y mostrando un periodo de incubación similar a los obtenidos con priones obtenidos a partir de animales infectados. En este caso, se utilizó únicamente PrP de ratón producida en *E. coli* a la que se le añadieron RNA y lípidos como cofactores, evitando así el uso de PrP^{Sc} como semilla o de otros componentes de origen encefálico (Wang et al., 2010). Estos priones generados *de novo* fueron considerados como el hito que conseguía cerrar casi 30 años de controversia sobre la aceptación de la hipótesis enunciada por Prusiner en el año 1982, donde postuló el carácter exclusivamente proteico del agente causal de las EET (Soto, 2011).

Todas estas evidencias han contribuido a la aceptación generalizada de la teoría “solo proteína” en la actualidad. Sin embargo, cabe destacar uno de los puntos más problemáticos para su aceptación, la existencia reconocida de cepas en un agente exclusivamente proteico. Esta diversidad de cepas, sobre la que profundizaremos en apartados posteriores, se observa a través de la presentación de distintas propiedades biológicas y bioquímicas en distintos aislados naturales de priones. En otras enfermedades infecciosas como las víricas o las bacterianas, el concepto de cepa está asociado a

mutaciones o polimorfismos en el material genético del agente responsable que se traducen en la adquisición de nuevas propiedades. Sin embargo, las cepas priónicas, a pesar de compartir el nombre y el significado, no comparten definición. En los priones, esta variabilidad sería fruto de ligeras diferencias en el estado de agregación o conformación de la PrP^{Sc} (Bessen et al., 1995). Esta afirmación viene respaldada por varios hechos, como la capacidad de la PMCA para reproducir las características de cepa de la semilla original (Castilla et al., 2005), la diferente interacción que presentan ciertos compuestos ante variaciones estructurales de cepa (Magnusson et al., 2014) o la existencia de diferencias estructurales entre cepas detectadas utilizando diferentes técnicas biofísicas (Noble et al., 2015).

Por último, un respaldo inesperado a la teoría “solo proteína”, basado en la noción de que las proteínas pueden transmitir información mediante inducción de un cambio conformacional autocatalítico, deriva de la descripción de nuevas entidades biológicas que presentan comportamientos similares a los priones, como es el caso del descubrimiento en la década de 1990 de dos proteínas fúngicas. En 1994, Wicker y colaboradores reportaron la Ure2 y Sup35 como elementos proteicos de transmisión de información biológica durante la división celular fúngica. Estas dos proteínas forman parte de un grupo más extenso conocido como priones de levadura y que, mediante un mecanismo solo parcialmente descrito, son capaces de adquirir una conformación específica diferente a la nativa e inducir la misma en otras proteínas del mismo tipo. A diferencia de los priones humanos, esta conversión no se traduce en efectos patogénicos, sino que forma parte de mecanismos de regulación metabólica en levaduras (Wickner et al., 2015) y en hongos, como es el caso del prion fúngico HET-s (Sabate et al., 2009). Otro ejemplo se describió en 2003, cuando se observó que una babosa marina (*Aplysia californica*) presentaba una proteína capaz de sufrir un cambio conformacional e inducir el mismo en las proteínas cercanas a ella. Esta proteína, llamada CPEB (del inglés, *Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein*) se encontraba estrechamente relacionada con procesos de traducción de ARNm durante procesos de plasticidad sináptica y formación de memoria (Si et al., 2003). En 2011 se encontró una proteína en cultivos celulares de origen humano denominada MAVS (del inglés, *Mitochondrial AntiViral Signaling*) e implicada en la respuesta inmunológica innata. Su activación frente a ataques víricos viene mediada por un cambio conformacional autocatalítico que se asemeja al que ocurre en los priones, demostrando que el cambio conformacional que se da en las EET no es tan exclusivo como se creía y que, además de las consecuencias patológicas, también supone un importante mecanismo de regulación para funciones proteicas y fenotipos celulares (Sun et al., 2011). Por otra parte, el notable crecimiento de los trastornos neurodegenerativos a causa de la edad, coincidente con el aumento de la esperanza de vida a nivel mundial en las últimas décadas, ha atraído el interés de numerosas investigaciones que tratan de esclarecer su etiología. Algunas de estas

enfermedades son la enfermedad de Alzheimer (AD), la enfermedad de Parkinson (PD) o la demencia frontotemporal (FTD, del inglés *Frontotemporal Dementia*), que han acaparado mucha atención y que han mostrado presentar como característica común la presencia de agregados de proteína malplegada en el sistema nervioso. Sin embargo, lejos de poder considerarlas enfermedades priónicas únicamente por compartir algunas características representativas de las EET, se utilizan otros términos que las consideran enfermedades cuasi-priónicas (del inglés, *prion-like*) (Erana, 2019).

El conocimiento que se ha generado en el campo de los priones durante las últimas décadas ha hecho posible que la hipótesis “solo proteína” esté hoy en día totalmente demostrada y aceptada. Sin embargo, aunque la naturaleza del agente causal haya sido revelada, muchos de los procesos moleculares implicados en este tipo de enfermedades siguen siendo desconocidos. Algunos de los aspectos más importantes son la determinación de la estructura tridimensional de la PrP^{Sc} o la relación de dicha estructura con el fenómeno de cepas y de barrera de transmisión. Otra de las principales incógnitas es el mecanismo molecular que rige conversión de la PrP^C en PrP^{Sc} de forma espontánea, responsable de las EET esporádicas que suponen la mayoría de los casos en la especie humana.

2. Biología de los priones

Los avances realizados en el conocimiento de las EET o prionopatías desde su descripción inicial hasta la formulación de la hipótesis “solo proteína”, establecieron el indiscutible protagonismo de la proteína del prion o PrP y la conversión que sufre a su forma neurotóxica, como evento central de estas patologías, siendo por tanto la PrP^C y la PrP^{Sc}, dos caras de una misma moneda.

2.1. PrP^C

2.1.1. Genética de la PrP^C

El gen que codifica la proteína del prion o PrP fue clonado en 1986, demostrando que tanto la isoforma celular no patogénica o PrP^C como la isoforma neurotóxica o PrP^{Sc}, estaban codificadas en el mismo gen (Basler et al., 1986). En el caso de los humanos, el gen *PRNP* se localiza en el brazo corto del cromosoma 20 o en la región homóloga del cromosoma 2 en ratones. Este gen se encuentra altamente conservado dentro de los mamíferos, siendo la similitud menor entre estos y las aves, pero existiendo también patrones similares pese a que les separan más de 130 millones de años de evolución (Wopfner et al., 1999). Así, se han descrito genes homólogos en otros vertebrados que presentan considerables variaciones en la secuencia aminoacídica pero que presentan motivos estructurales semejantes, como es el caso de la tortuga (*Trachemys scripta*) o la rana (*Xenopus laevis*),

cuya similitud de secuencia con la PrP de mamíferos es aproximadamente del 30%. La alta conservación de este gen sugiere que algunas de las funciones que desempeña la PrP^C podrían ser cruciales para la vida (Calzolari et al., 2005).

Este gen de copia única que se denomina *PRNP* contiene su marco de lectura abierto (ORF, del inglés *Open Reading Frame*) en un único exón en todas las especies de mamíferos y aves en las que se ha estudiado. Sin embargo, el gen *PRNP* contiene uno o dos exones más que contienen regiones no codificantes, incluyendo un promotor y los sitios de terminación. En algunas especies como el hámster, es el exón 2 el que contiene el ORF, mientras que en otras especies como la oveja, el ratón o el humano, esta función la cumple el exón 3 (Lee et al., 1998). La ORF del gen *PRNP* presenta un tamaño similar en todas las especies de mamífero de aproximadamente 760 pares de bases (pb), encontrándose su codón de inicio diez pares de bases después del comienzo del exón. Dicho codón está seguido de una región que codifica un péptido señalizador responsable del transporte de la proteína a la membrana celular. La ORF de 255 codones aproximadamente, es mayor que la media para los genes eucariotas, lo que sugiere su evolución como unidad completa, explicando así la gran similitud entre las PrP de distintas especies de mamífero. La primera parte de la región codificante presenta un alto contenido en nucleótidos de guanina (G) y citosina (C), traducándose posteriormente en una zona de aminoácidos repetidos rica en glicina y que resulta prácticamente idéntica en todas las especies, variando únicamente en el número de repeticiones y estando asociada a variantes genéticas de la enfermedad (Goldmann, 1993).

El gen *PRNP* se expresa de forma constitutiva y ubicua en todo el organismo y presenta una serie de características comunes a los genes constitutivos o *housekeeping*. Una de ellas es precisamente la presencia de la región de repeticiones de guanina y citosina, que constituye un motivo conocido como caja GC y que es considerado como sitio de unión canónico para los factores de transcripción humanos Sp1, AP-1 y AP-2 que, entre otros muchos, controlan la expresión génica en diversos tejidos (Prusiner and Scott, 1997). Los factores de transcripción relacionados con el gen *PRNP* permiten modular además la expresión de la PrP^C ante situaciones determinadas, como, por ejemplo, la señalización por factores de crecimiento o por elementos de estrés, como el estrés oxidativo o el estrés genotóxico (Gill and Castle, 2018). Aunque la expresión de la PrP^C tiene lugar de forma constitutiva en el cerebro de animales adultos, se encuentra altamente regulada durante el desarrollo, aumentando en algunas regiones de forma proporcional a enzimas como la acetiltransferasa (Mobley et al., 1988) o en función de la edad, ya que la expresión de PrP^C se ve incrementada a lo largo del desarrollo embrionario, siendo apenas detectable al inicio de este e incrementando de forma destacada justo después del nacimiento (Moser et al., 1995). Aunque la PrP^C se expresa mayormente en el sistema nervioso central, también

se encuentra en el sistema nervioso periférico, donde se puede detectar a niveles más bajos a lo largo de nervios periféricos, ganglios, membrana olfativa y retina. Además del sistema nervioso, hay otros tejidos en los que destaca la expresión de PrP^C, como la médula ósea, los órganos linfoides, el corazón, el músculo esquelético y el pulmón (Thellung et al., 2019).

A pesar de ser un gen muy conservado evolutivamente, hay regiones variables en la *secuencia primaria de la PrP* que resultan en una enorme diversidad de polimorfismos observables en la naturaleza. A algunos de estos polimorfismos se les responsabiliza de determinadas diferencias en la susceptibilidad frente a las enfermedades priónicas, como es el caso del scrapie y algunas de las variantes polimórficas de la PrP de oveja (Goldmann et al., 1994), o el polimorfismo del residuo 129 en humanos, que parece tener un papel fundamental en la incidencia de CJD, tanto en su forma esporádica como en su variante adquirida (Collinge, 2001). Existen también mutaciones autosómicas dominantes en el gen *PRNP* que se relacionan de forma directa con la aparición de enfermedades priónicas. Aunque profundizaremos más adelante en las variantes genéticas de la enfermedad, hay que destacar que se han descrito más de 40 mutaciones patológicas diferentes en este gen, entre las que encontramos mutaciones puntuales, codones de terminación prematuros o inserciones y deleciones en la zona de octa-repeticiones (Kim et al., 2018).

2.1.2. Biosíntesis y componentes de la PrP^C

La proteína del prion es una glicoproteína sintetizada inicialmente como un polipéptido precursor de aproximadamente 250 aminoácidos según la especie que se considere. Esta proteína, presenta un péptido señal en la zona amino-terminal (N-terminal), una región de octa-repeticiones, un dominio globular que presenta dos sitios de glicosilación y un puente disulfuro y, por último, una señal de anclaje a la membrana situada en la región hidrofóbica carboxi-terminal (C-terminal) (Figura 3). La biosíntesis comienza con la generación del péptido señal de la proteína precursora, compuesto de 22 aminoácidos, y que es reconocido por partículas de reconocimiento de señal (SRP, del inglés, *Signal Recognition Particle*), que lo transportan al retículo endoplásmico rugoso (RER), donde gracias a la acción de una enzima translocasa, tiene lugar la translocación al lumen del polipéptido de manera cotranslacional. La integridad de este péptido señal es fundamental para la importación correcta del polipéptido, ya que un transporte ineficaz causaría la acumulación anormal de PrP^C en el citosol, interfiriendo con la viabilidad celular (Heller et al., 2003). El procesamiento continúa en el retículo, donde dos residuos de cisteína situados en las posiciones 179 y 214, quedan unidos por la formación de un puente disulfuro que aporta estabilidad a la proteína. En este punto también tiene lugar la glicosilación de hasta dos asparaginas, situadas en las posiciones 181 y 197 para el caso de la PrP

humana y que se pierden cuando se añaden tratamientos inhibidores de la glicosilación en el retículo, como es el caso de la tunicamicina (Caughey et al., 1989). Las dos cadenas de oligosacáridos añadidas en este punto presentan un alto contenido en manosa y no son resistentes a la digestión con endoglicosidasa H, propiedad que adquirirán más adelante con la adición de cadenas más complejas de hidratos de carbono (Caughey et al., 1989). La PrP^C presenta en su extremo C-terminal un péptido señal para glicosilfosfatidilinositol (GPI), que media el anclaje de la PrP^C a membrana celular, y se agrega al polipéptido en el lumen del RER gracias a la acción de una transamidasa multimérica (Stahl et al., 1987). Durante el proceso, se elimina el péptido señal de 22 aminoácidos del extremo C-terminal, que se sustituye por un GPI preformado, mediante un proceso complejo en el que intervienen varias enzimas. La transamidasa multimérica únicamente cataliza la reacción final de unión del GPI a la proteína. Este GPI está formado por una etanolamina fosfato unida al carboxilo terminal de la proteína mediante un enlace amida, un núcleo glicano altamente conservado de tres residuos de manosa, glucosamina, un grupo fosfatidilinositol y colas fosfolipídicas que anclan el GPI a la membrana (Puig et al., 2014). Con su posterior llegada al aparato de Golgi, se añaden a la cadena polipeptídica oligosacáridos más complejos que contienen ácido siálico, siendo la PrP^C una de las tres únicas proteínas de membrana plasmática que presentan ácido siálico a nivel estructural (Stahl et al., 1992). Además de ácido siálico, se han descrito una gran variedad de glicanos que pueden unirse a la PrP^C o a su forma truncada, lo que produce distintos patrones de distribución en el cerebro. Sin embargo, el significado biológico de las glicosilaciones de la PrP^C sigue siendo desconocido (DeArmond et al., 1999). A continuación, la PrP^C madura es transportada a la membrana plasmática a través del aparato de Golgi, donde se orienta hacia el compartimento extracelular y aparece localizada en balsas lipídicas, conjuntos dinámicos ricos en colesterol y esfingolípidos (Taylor et al., 2005).

La ruta y los mecanismos de internalización y endocitosis de la PrP^C son controvertidos ya que podrían involucrar vías tanto dependientes como independientes de clatrina. La PrP^C ha sido localizada en vesículas recubiertas de clatrina por microscopía electrónica (Shyng et al., 1993), pero también asociada a unas estructuras membranosas denominadas caveolas o a dominios morfológicamente similares las mismas. Estas dos vías, aparentemente contradictorias, quedan reconciliadas por el papel que algunas regiones de la PrP^C parecen desempeñar uniendo cationes, como la endocitosis mediada por clatrina inducida por cobre, señalando que la PrP^C se encuentra sometida a procesos de reciclado y degradación constitutivos (Taylor et al., 2005).

La traducción y el posterior procesamiento, en el que se eliminan ambos péptidos señal, dan como resultado una PrP^C madura, de aproximadamente 210 aminoácidos y un peso molecular de 26-37 kDa según su estado de glicosilación (Figura 3 a). En esta PrP^C se distinguen claramente dos dominios

de similar tamaño estructuralmente diferenciados entre sí; el dominio flexible N-terminal y el dominio globular C-terminal (Aguzzi and Calella, 2009). El dominio N-terminal de la PrP^C comprende desde el aminoácido 23 al 124 en el caso de la PrP humana, siendo una región desestructurada y flexible según los datos que hasta la fecha se han recopilado con la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) e incluyendo varias regiones características (Riek et al., 1996). En primer lugar, se encuentran dos pequeñas regiones polibásicas (de aminoácidos cargados positivamente) que se denominan CC1 y CC2 (CC, del inglés, *Charged Cluster*) y que se encuentran en los aminoácidos 23-27 y 95-110 respectivamente. Estas zonas parecen estar involucradas en la actividad antioxidante de la PrP^C y en la interacción de esta con tubulina o glicosaminoglicanos (Taubner et al., 2010, Haigh et al., 2015). Justo en mitad de estas dos regiones polibásicas encontramos la zona de octa-repeticiones (OR), fruto de la traducción de la zona rica en C/G del gen *PRNP* mencionada en un punto anterior. Esta región se sitúa aproximadamente entre los aminoácidos 54 y 94, según la especie, y está compuesta por varias repeticiones de una secuencia variable de ocho aminoácidos, siendo la más común la secuencia PHGGGWGQ, que está altamente conservada en todos los mamíferos (Martin et al., 2009). El número de repeticiones de esta secuencia varía según la especie, aunque mayoritariamente suele ser de cinco. La presencia de inserciones o deleciones en la región de las octa-repeticiones (OPRI o OPRD, del inglés, *Octapeptide Repeat Insertions* y *Octapeptide Repeat Deletions*) está asociada a enfermedades genéticas (Goldmann, 1993). Aparte de por su relación con variantes genéticas de la enfermedad, muchas investigaciones de las últimas décadas se han centrado en la zona de OR intentando encontrar una función biológica a este peculiar motivo aminoacídico, al que se le suele asignar un papel en la neuroprotección. Ratones transgénicos que expresaban el gen de la PrP murina con una deleción de las cinco octa-repeticiones, mostraron una menor activación de la 3-fosfatidilinositol quinasa, una enzima reguladora de la supervivencia celular, lo que se traducía en una actividad neuroprotectora disminuida (Mitteregger et al., 2007). Una de las funciones más ampliamente estudiadas de la región de OR es su capacidad para unir cationes bivalentes, concretamente el Cu²⁺ y el Zn²⁺ (Stockel et al., 1998, Perera and Hooper, 2001). Además, también se ha demostrado que esta zona de OR tiene tendencia a la agregación y, por tanto, podría jugar un papel importante en la patología (Zahn, 2003).

La siguiente región de la PrP^C es el dominio globular C-terminal, que se encuentra conectado al dominio flexible N-terminal mediante una región hidrofóbica que comprende los aminoácidos que van del 111 al 134 y que se conoce como HC (del inglés, *Hydrofobic Core*). Gracias a los datos de RMN y tomando como referencia la PrP murina, se pueden identificar distintos motivos estructurales; dos pequeñas regiones de lámina-β antiparalelas (β1 y β2) flanqueando una primera hélice-α (α1) y otras dos hélices-α (α2 y α3) tras la segunda lámina-β (Riek et al., 1996). Estos motivos estructurales están conectados por giros, entre los que destaca la región β2-α2, una zona de alta diversidad estructural y

polimórfica que puede formar un giro rígido (RL, del inglés *Rigid Loop*) bien definido o puede ser estructuralmente flexible. Esta característica explica el hecho de que a varias posiciones de esta región se les haya asociado con distintas susceptibilidades frente a EET y del fenómeno de barrera de transmisión entre especies (Figura 3 b) (Lysek et al., 2005, Erana et al., 2017). En el dominio globular se localizan algunos de los aminoácidos clave en el procesamiento de la PrP^C; dos residuos de cisteína (posiciones 179 y 214 en la PrP humana), responsables del puente disulfuro que se forma en el RER y que aporta estabilidad a la proteína y dos residuos de asparagina (posiciones 181 y 197 en la PrP humana), susceptibles de ser N-glicosilados. En función del número de N-glicanos que se unan a la PrP^C, esta puede encontrarse en su forma di-glicosilada, mono-glicosilada o no glicosilada. El estado de glicosilación de la PrP^C y la proporción de las tres formas varía entre las diferentes especies y se ha utilizado para la caracterización de esta. Sin embargo, hoy en día no se conoce la implicación de los N-glicanos en la función biológica de la proteína ni el mecanismo que pueden desempeñar en el malplegamiento de la misma (Aguzzi and Calella, 2009, DeArmond et al., 1999). Aunque existen mutaciones puntuales asociadas a enfermedades priónicas de origen genético en la región N-terminal y en la zona del GPI, es en el dominio globular donde se localizan la mayoría de las mutaciones puntuales asociadas a las EET genéticas, entre las que destacan la sustitución D178N, asociada a FFI junto al polimorfismo del codón 129 y la E200K, la mutación más común a nivel mundial causante de la variante genética del CJD (Lloyd et al., 2011).

En la última parte del dominio globular de la PrP^C, encontramos la región de anclaje a través de GPI, unido a un residuo de serina situado en la posición 230 para el caso de la PrP murina. El anclaje de un grupo GPI a una proteína es una modificación post-traducciona muy común en eucariotas, estando presente en más de 150 proteínas de mamíferos. Está formado por un grupo de fosfoetanolamina que sirve de unión con la proteína mediante un enlace covalente y un glicano compuesto por tres moléculas de manosa y una cola de inositol-fosfolípido, aunque los tres núcleos de manosa pueden variar sus cadenas laterales según la proteína a la que se encuentren unidas (Nosjean et al., 1997). Estas proteínas que presentan unión a GPI son funcionalmente diversas y están involucradas en diferentes rutas biológicas, entre las que se encuentran la respuesta inmunológica, la traducción de señales, el mantenimiento de la morfología celular y, en el caso de la PrP, un posible papel en la aparición de enfermedades priónicas (Puig et al., 2014). Una de las capacidades más desconcertantes de este grupo de proteínas con GPI es su habilidad para insertarse en las membranas, tanto *in vitro* como *in vivo*, de forma aparentemente espontánea en un proceso que también ha sido observado en la PrP^C (Liu et al., 2002). Centrándonos en su implicación en el desarrollo de la enfermedad, en primer lugar, se ha observado que la localización de la PrP^C en balsas lipídicas gracias al GPI es importante para la conversión, hecho respaldado por la proteína Sup35, un prion de

levaduras, que puede ser propagado a células vecinas únicamente cuando está unido a un GPI (Speare et al., 2010). Sin embargo, existen modelos transgénicos de ratón que, expresando PrP^C sin GPI, sufren la enfermedad tras ser inoculados con priones. Estos ratones, debido a la ausencia de GPI, presentan una PrP^C que no se localiza en la membrana plasmática, sugiriendo que esta localización podría no ser necesaria para el malplegamiento de la PrP^C. Sin embargo, estos ratones infectados con priones murinos mostraron un retraso en la aparición de los signos de enfermedad, presentando además alteraciones neuropatológicas, como la distribución atípica de las placas de PrP^{Sc} y la ausencia de lesiones espongióticas (Chesebro et al., 2010).

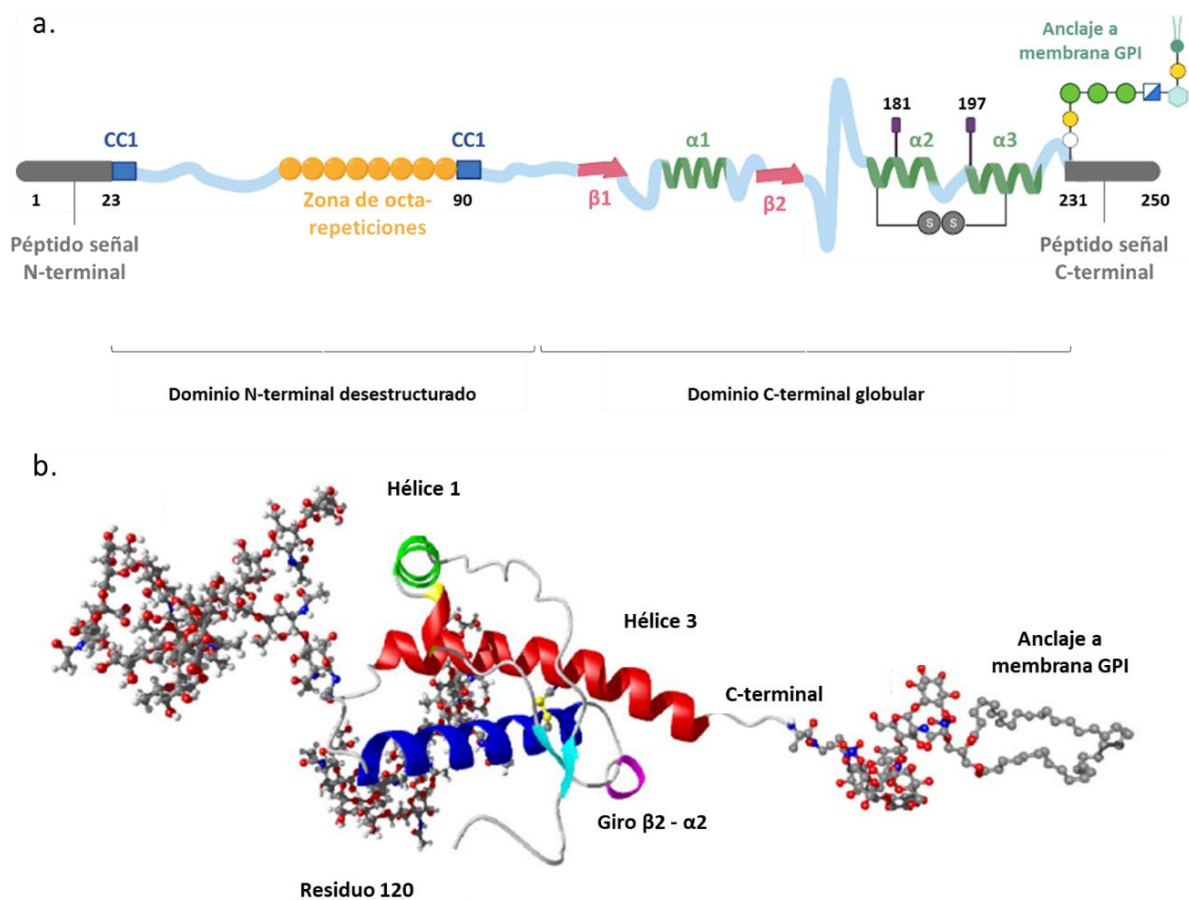


Figura 3. Representación esquemática de la PrP^C y estructura tridimensional de la PrP^C resuelta mediante difracción de rayos X. **a)** Representación esquemática de los diferentes motivos y dominios de interés de la PrP^C. La numeración hace referencia a la posición de los aminoácidos en la PrP^C humana. Péptido señal de 23 aminoácidos del dominio N-terminal que dirige la PrP^C hacia la membrana plasmática y es eliminado durante el procesamiento. Flanqueando a la zona de octa-repeticiones (OR, del inglés, *octapeptide repeats*), constituida por una secuencia de 8 aminoácidos repetida 5 veces en humanos, se localizan las regiones cargadas positivamente CC1 y CC2 (del inglés, *Charged Cluster*), tras las que existe una zona rica en aminoácidos con carácter hidrofóbico. En el dominio globular aparecen las dos regiones estructuradas en forma de láminas-β antiparalelas (β1 y β2) y las tres regiones estructuradas en forma de hélices-α (α1, α2 y 3). Dentro de la zona globular también aparecen esquematizados el puente disulfuro entre las posiciones 179 y 214, las asparaginas que pueden ser modificadas por la adición de glicanos y el glicofosfatidilinositol (GPI) para su anclaje a membrana, determinado por el péptido señal C-terminal que se elimina tras su adición en el aminoácido 231. **b)** Estructura tridimensional de la PrP^C ovina determinada mediante difracción de rayos X (*Protein Data Bank code 1UW3*) y en la que se ha omitido la región N terminal no estructurada formada por los aminoácidos comprendidos entre las posiciones 23 y 120 y se incluyen los dos glicanos, el GPI y se señalan algunos de los principales motivos estructurales (hélices-α 1 y 3 y giro β2-α2 situado entre la lámina-β 2 y la hélice-α 2). Modificada de (Gill and Castle, 2018).

Cabe destacar también, que se han descrito tres mutaciones puntuales (M232R, M232T y P238S) localizadas en la zona de unión al GPI de la PrP^C y que desencadenan variantes genéticas de la enfermedad priónica (Wadsworth et al., 2003). Estos datos parecen indicar que el GPI juega un papel fundamental en la neurotoxicidad, pero no en el malplegamiento y la propagación de priones, tal y como apoyan los experimentos llevados a cabo por Lewis y colaboradores, que eliminaron químicamente el GPI de priones preformados y demostraron que su ausencia no disminuía su capacidad de infectar a otros modelos que sí expresan la PrP^C anclada a membrana por GPI (Lewis et al., 2006). Por tanto, en conjunto, todos estos hallazgos sugieren que el GPI no tiene un papel clave en la capacidad de inducir el malplegamiento de la PrP^C, pero sí en los efectos neurotóxicos derivados de dicho malplegamiento.

2.1.3. Posibles funciones de la PrP^C

Pese a la gran cantidad de información recopilada en las últimas décadas acerca de la genética, biosíntesis y estructura de la PrP^C, la función biológica que desempeña esta proteína no ha sido dilucidada aún. Su amplia distribución en prácticamente todos los tejidos del organismo y su alto grado de conservación entre mamíferos y gran parte de vertebrados sugieren que esta proteína desempeña una función esencial. Concretamente, su localización en la superficie de la membrana celular indica que podría desempeñar algún rol en procesos ligados al reconocimiento y adhesión celular, a la absorción de ligandos externos o como mediador de señalización transmembrana, aunque ninguna de estas funciones ha sido inequívocamente demostrada como cometido fisiológico de la PrP^C. Una de las primeras aproximaciones para estudiar las posibles funciones de la PrP^C, fue la generación de modelos animales que no expresaban PrP^C (*PRNP*^{-/-} o KO, del inglés, *knockout*) (Bueler et al., 1992) en ratones e incluso terneros (Richt et al., 2007) y cabras, estas últimas encontradas sin manipulación alguna en la Naturaleza (Yu et al., 2006). Estos modelos transgénicos mostraron resistencia a la infección por priones, pero no exhibieron alteraciones fenotípicas obvias, lo que indica que la función de la PrP^C no resulta esencial para la supervivencia del organismo a pesar de la ubicuidad de su expresión, o bien puede compensarse por la acción de otras proteínas o es redundante (Wulf et al., 2017). Sin embargo, hay que tener en cuenta que desde la aparición del primer modelo KO para la PrP^C (*PRNP*^{-/-}), se ha generado una miríada de modelos murinos transgénicos deficientes en PrP siguiendo diversas estrategias (Weissmann and Flechsig, 2003). Esto ha llevado a que, en algunos casos, se hayan observado ligeras alteraciones fenotípicas que difieren entre los distintos modelos transgénicos deficientes de PrP^C. Algunos ejemplos son las alteraciones en el sueño y los ritmos circadianos observados en ratones KO para la PrP^C y la relación sugerida entre este hecho y las mutaciones en el gen *PRNP* causantes del FFI (Lugaresi et al., 1998, Tobler et al., 1996), un posible papel en la

excitabilidad neuronal y el aprendizaje (Collinge et al., 1994) y la actividad antioxidante de la PrP^C, consecuencia de su capacidad para unir cationes de Cu⁺² por la región de OR (Stockel et al., 1998, Wong et al., 2001). Sin embargo, estos fenotipos no fueron encontrados en todos los modelos de ratones KO para la PrP^C diseñados con distintas estrategias, llegando a variar los resultados incluso en modelos similares, siendo el único fenotipo claro para todos ellos la resistencia de los ratones KO a la infección por priones (Steele et al., 2007). Esta afirmación quedó respaldada por los estudios de Chesebro y colaboradores mencionados anteriormente, en los que demostraron la necesidad de una PrP^C funcional para el desarrollo de la enfermedad (Chesebro et al., 2010), y los experimentos de implantación de tejido con PrP^C en ratones KO-PrP que posteriormente mostraron niveles de PrP^{Sc} homogéneos en todo el SNC pero neurotoxicidad únicamente en el tejido injertado (Brandner et al., 1996). Por lo tanto, una de las pocas funciones demostradas de la PrP^C sería como mediadora de la neurotoxicidad en las enfermedades priónicas, pudiendo incluso interactuar con proteínas responsables de otras enfermedades neurodegenerativas, como el péptido A β de la enfermedad de Alzheimer (Biasini et al., 2012).

Estos hechos respaldan un posible papel de la PrP^C en la neurotoxicidad de ciertas patologías, pero no es posible concluir que esa sea su única función, ya que parece poco probable que una proteína tan conservada a lo largo de la evolución en diferentes especies presente únicamente una función patológica. Con el objetivo de dilucidar nuevas funciones fisiológicas de la PrP^C no relacionadas con las EET pero que nos ayuden a comprender mejor el origen de estas y los mecanismos de toxicidad, en las últimas décadas se han desarrollado nuevos modelos de estudio y técnicas *in vitro*. Algunos ejemplos son las investigaciones en pez cebra (*Danio rerio*) relacionadas con la adhesión celular mediada por PrP^C (Malaga-Trillo et al., 2009) o los estudios sobre su posible función en la conservación de la integridad de la mielina periférica (Bremer et al., 2010). Estos y otros nuevos enfoques han dado lugar a la atribución de posibles y diversas funciones a la PrP^C, pudiendo estar implicada en procesos que van desde el desarrollo de neuritas hasta la adhesión celular, pasando por excitabilidad neuronal, citoprotección y actividad de canal iónico (Nicolas et al., 2009). Sin embargo, tal y como ocurría en las funciones observadas en modelos transgénicos KO-PrP (Steele et al., 2007), muchas de ellas necesitan ser validadas.

2.2. PrP^{Sc}

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

2.2.1. Heterogeneidad de la PrP^{Sc}

Tras el postulado de la teoría “solo proteína” por parte de Prusiner en 1982, numerosas investigaciones se orientaron a describir de forma detallada y diferenciar las propiedades adquiridas por la isoforma PrP^{Sc}, tras la conversión de la PrP^C. El resultado es una proteína rica en láminas- β (40% de láminas- β frente al 3% de láminas- β para la PrP^C) que le hace presentar importantes diferencias bioquímicas y biológicas. Esta isoforma resulta insoluble, forma agregados, presenta una resistencia parcial al tratamiento con proteinasas, y es neurotóxica (Safar et al., 1993a). Estas propiedades, principalmente la insolubilidad y la capacidad de agregar y formar amiloides, dificultan el estudio estructural de esta nueva isoforma hasta el punto de que, al contrario que para la PrP^C, no se ha podido determinar su estructura tridimensional, hasta la fecha. Conocer la estructura del agente infeccioso es una condición indispensable para comprender los mecanismos de propagación, la neurotoxicidad y las bases moleculares que definen la barrera de transmisión interespecies y la existencia de diferentes cepas priónicas, así como para diseñar nuevas aproximaciones terapéuticas (Baskakov et al., 2019). Este problema no es exclusivo de las EET, ya que el fenómeno de agregación de proteínas y péptidos en una variedad de agregados insolubles juega un papel central en otras enfermedades. En todas ellas, las proteínas adoptan conformaciones estructurales anómalas que dificultan el correcto estudio y resolución de la estructura atómica que forman (van der Wel, 2017). Estas nuevas conformaciones que se originan no siempre son homogéneas, lo que da lugar al concepto de amiloides polimórficos. Las proteínas que presentan tendencia a formar distintos amiloides reflejan que estas no han sufrido constricciones evolutivas que les hicieran retener una única conformación activa. El plegamiento amiloide es consecuencia de un equilibrio delicado entre diversos estados conformacionales y de la interconversión entre ellos mismos, por lo que está ampliamente aceptado que una misma proteína amiloidogénica puede contener varias estructuras con diferentes núcleos ricos en láminas- β debido a rutas de formación de amiloides alternativas (Kelly, 1998). El principal motivo estructural de los agregados amiloides es el motivo lámina- β , lo que sumado al hecho de que los amiloides polimórficos también pueden presentar diferencias macroscópicas, provoca que los espectros obtenidos a través de técnicas como la RMN sean de baja resolución (Espargaro et al., 2015). Este concepto de amiloides

polimórficos explicaría el fenómeno de cepa en las enfermedades priónicas, ya que está establecida la existencia de agregados de PrP^{Sc} con diferentes características que dan lugar a distintas manifestaciones clínicas. Sin embargo, la heterogeneidad de estas cepas cuestiona en cierta manera la existencia de un único núcleo estructural definido y conservado en todas las PrP^{Sc}, sugiriendo más bien un compendio de variaciones estructurales en la organización de la PrP^{Sc} (Tycko, 2006). La posibilidad de que la isoforma patogénica de la proteína priónica no adopte una única conformación, ha hecho que la comunidad científica se replantee la forma de abordar el problema, teniendo en cuenta esta heterogeneidad a la hora de intentar resolver su estructura tridimensional, valiéndose para ello de técnicas de propagación *in vitro* que podrían ayudar a superar estas limitaciones.

A finales del siglo pasado se produjo por primera vez PrP recombinante purificada a partir de *E. coli* (Zahn et al., 1997), abriendo paso a una de las herramientas más importantes en el campo de las EET, ya que se ha utilizado en prácticamente todas las áreas de conocimiento, desde la investigación básica para tratar de dilucidar los mecanismos moleculares de conversión hasta de forma aplicada para evaluar métodos de diagnóstico o detectar compuestos terapéuticos (Charco et al., 2017). Utilizando técnicas *in vitro* se reprodujo con proteína recombinante las características biológicas de una PrP^{Sc} determinada y, de la misma manera, se generaron espontáneamente los primeros priones recombinantes que resultaron infecciosos *in vivo* (Makarava et al., 2010, Wang et al., 2010). Sin embargo, a pesar de reproducirse *in vitro* las características bioquímicas de cepa o de generar nuevos priones infecciosos, estos acababan por presentar propiedades biológicas dispares al ser inoculados *in vivo*, difiriendo mucho en su capacidad infecciosa (Wang et al., 2017). Esta heterogeneidad en los conformeros de PrP^{Sc} observada en los resultados *in vitro* derivaría de la propiedad que presentan los amiloides de adoptar diversas estructuras conocidas como amiloides polimórficos. Además, hay que tener en cuenta que los propios sistemas *in vitro* utilizados para el estudio de priones recombinantes pueden ser responsables de esta variabilidad, ya que algunos métodos obtienen productos finales diferentes en función de parámetros como la agitación (Makarava and Baskakov, 2008), la presencia de cofactores (Deleault et al., 2007), la temperatura, el pH y otras variables.

En este punto, es necesario matizar que no cualquier tipo de amiloide de PrP puede ser considerado un prion *sensu stricto*, pese a que compartan ciertas características con estos. Para diferenciar ambos conceptos, utilizaremos el término prion *bona fide* haciendo referencia a aquellos priones (recombinantes o de origen encefálico) que presenten las propiedades fundamentales de un prion: características bioquímicas determinadas como la resistencia a proteasas, capacidad para propagar de forma autocatalítica y la inducción de enfermedad *in vivo*. Estos priones *bona fide* son siempre amiloides, pero debemos distinguirlos de aquellos otros amiloides de PrP que presentan

únicamente algunas de estas propiedades (como por ejemplo la resistencia a proteasas) y a los que nos referiremos tan solo como PrP^{res}, ya que no podremos considerarlos priones *bona fide* hasta que demuestren su transmisibilidad e infectividad *in vivo*.

2.2.2. Modelos estructurales de la PrP^{Sc}

Uno de los mayores interrogantes que queda por resolver en el campo de los priones es, sin lugar a duda, la estructura tridimensional de la PrP^{Sc}. Mientras que la estructura de la PrP^C está disponible desde finales del siglo pasado (Riek et al., 1996), la conformación de la isoforma patogénica sigue siendo desconocida, lo que supone un impedimento a la hora de dilucidar los mecanismos moleculares que rigen la conversión entre ambas isoformas. Como se ha descrito en el apartado anterior, uno de los principales problemas al que se enfrenta la biología estructural en el estudio de los priones, es la heterogeneidad de los agregados de PrP, que supone un escenario dinámico de conversión a polímeros de diferente tamaño y no una única estructura (Tycko, 2006). Estos agregados además de ser de alto peso molecular son mayoritariamente hidrófobos, lo que supone la formación de agregados no cristalinos insolubles en detergentes, necesarios para la caracterización estructural a partir de determinadas técnicas biofísicas (Diaz-Espinoza and Soto, 2012). Debido a que los primeros intentos por resolver la estructura de la PrP^{Sc} se realizaron a partir de muestras encefálicas, se encontraron con problemas como la copurificación de otras proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Gabizon et al., 1987) o la heterogeneidad en los perfiles de glicosilación. A pesar de la revolución que ha supuesto el uso de proteína recombinante para este tipo de estudios (Charco et al., 2017), muchos de los priones generados *in vitro* no mimetizan de forma exacta el comportamiento de los priones en la naturaleza, a pesar de compartir determinadas características. Hoy en día, superar este inconveniente y encontrar las condiciones ideales para obtener un prion recombinante *bona fide* susceptible de ser estudiado mediante técnicas biofísicas como la cristalografía de rayos X o RMN, sigue siendo uno de los mayores retos en el campo de las EET.

A pesar de estas limitaciones, se han recopilado numerosos datos estructurales durante las últimas décadas principalmente utilizando técnicas de baja resolución y que se han utilizado para proponer modelos teóricos de la estructura de la PrP^{Sc}. Una de las primeras estrategias utilizadas en el estudio de la estructura de la PrP^{Sc} fue la combinación de dicroísmo circular (DC) y FTIR, que reveló una predominancia de motivos de lámina- β en la estructura de la PrP^{Sc}, en comparación con el contenido mayoritario de hélices- α observado en la isoforma no patogénica (Pan et al., 1993). Una de las propiedades bioquímicas de la PrP^{Sc}, la resistencia al tratamiento con proteasas (Hunter and Millson, 1967), fue aprovechada para realizar estudios de proteólisis limitada que proporcionaron también

información estructural de gran relevancia. Al observar que tras el tratamiento con PK, únicamente se digerían los primeros 90 aminoácidos del extremo N-terminal, y que el producto de la digestión retenía sus propiedades infecciosas (Cronier et al., 2008), se concluyó que el inicio del extremo N-terminal no era esencial para la propagación priónica. Esta afirmación se confirmó mediante el uso de ratones transgénicos que expresaban una PrP^C carente de los primeros 90 aminoácidos (Supattapone et al., 1999). No obstante, la heterogeneidad de la PrP^{Sc} supone una importante limitación para el estudio de la estructura mediante proteólisis limitada, ya que distintas cepas priónicas muestran una resistencia variable ante el tratamiento con proteasas (Bessen and Marsh, 1992a). Sin embargo, el hecho de que el sitio de corte de la PK sea diferente según el tipo de cepa que se maneje, aporta también información estructural relevante, sugiriendo que el plegamiento de cada cepa puede variar ligeramente, pudiendo ser útil a la hora de distinguir cepas bioquímicamente (Sevillano et al., 2018). Otra de las aproximaciones realizadas fue el mapeo de epítomos mediante el uso de anticuerpos monoclonales, que aportó información sobre la distinta accesibilidad que presentaban las regiones de la fibra de PrP^{Sc}. Estos estudios revelaron una región comprendida entre la posición 90 y la 120 que no era accesible a anticuerpos, mientras que los residuos situados en la región C-terminal mostraron una accesibilidad mucho mayor (Peretz et al., 1997, Williamson et al., 1998). Las técnicas microscópicas han sido ampliamente utilizadas para el estudio de la ultraestructura de los priones, siendo las primeras en permitir la observación directa de fibras priónicas mediante la combinación de TEM con técnicas de tinción negativa (Merz et al., 1981). Estas fibras de priones, que en un principio se denominaron “varillas priónicas”, se encuentran en el rango de 10-100 nm de largo y 5 nm de ancho. La microscopía de fuerza atómica (AFM, del inglés *Atomic Force Microscopy*) y el reciente desarrollo de la criomicroscopía electrónica (cryoEM, del inglés, *cryogenic Electron Microscopy*) han supuesto una revolución también para los estudios estructurales de la PrP^{Sc}, ya que permiten una resolución sin precedentes de los agregados de PrP^{Sc}, pudiendo extraerse datos más precisos acerca de motivos estructurales repetitivos (Sim and Caughey, 2009, Vazquez-Fernandez et al., 2016). Las técnicas de difracción también han sido utilizadas con el objetivo de extraer información estructural de las fibras de PrP^{Sc}. La difracción de rayos X (Eanes and Glenner, 1968), basándose en la dispersión cuasi-simétrica de fibras similares a agregados macromoleculares, ha permitido obtener algunos patrones de difracción de baja resolución, mientras que la cristalografía de rayos X exige la formación de cristales tridimensionales bien ordenados de pequeño tamaño, lo que no ha sido posible hasta la fecha con los agregados de PrP^{Sc}. Por último, la dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS, del inglés *Small Angle X ray Scattering*), puede llegar a proporcionar una medida aproximada del tamaño del agregado (Zweckstetter et al., 2017). Actualmente, junto con la cryoEM, una de las técnicas con mayor potencial en el campo es la RMN, capaz de identificar la ubicación de elementos de la estructura secundaria de agregados de priones cuando se encuentran en solución (Skora et al., 2013) y su variante, la

espectroscopia de RMN de estado sólido (ssNMR, del inglés *solid-state Nuclear Magnetic Resonance*), capaz de determinar de forma fiable la estructura tridimensional de moléculas individuales pertenecientes a fibras de amiloide infecciosas (Muller et al., 2014). 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} (Aucoin et al., 2018, Smirnovas et al., 2011).

El uso de todas estas técnicas ha permitido compilar suficientes datos como para que, sobre todo en las últimas décadas, se hayan propuesto varios modelos teóricos acerca de la estructura de la PrP^{Sc}. Sin embargo, la mayoría han ido descartándose casi por completo a medida que se acumulaban evidencias en contra. Uno de los más populares fue el modelo de hélice- β (Downing and Lazo, 1999), propuesto a partir de datos de microscopía electrónica en 2D que sugerían una estructura de hélice- β levógira y que quedó descartado por los resultados obtenidos con la técnica de difracción de rayos X (Wille et al., 2009). Otro modelo fue el de espiral- β (DeMarco and Daggett, 2004), propuesto por Daggett y colaboradores en 2004 basándose en simulaciones de dinámica molecular de la PrP. A pesar de que esta propuesta coincidía con algunos datos experimentales observados con técnicas de baja resolución, no cumplía con las evidencias obtenidas en experimentos de proteólisis limitada e intercambio hidrógeno-deuterio (Diaz-Espinoza and Soto, 2012). Aunque dichos modelos no llegaron a definir la estructura tridimensional de la PrP^{Sc}, resultaron útiles para que se propusieran otros modelos teóricos, potencialmente más cercanos a la realidad por coincidentes con los datos experimentales. En el momento en el que esta tesis doctoral se escribe, los dos modelos estructurales más robustos son el modelo de láminas- β paralela en registro (PIRIBS, del inglés *Paralell In-Register Intermolecular β -Sheet*) y el modelo de láminas- β en solenoide de cuatro pisos (4R β S, del inglés *4-Rung β -Solenoid*).

Modelo de láminas- β paralela en registro

Este modelo conocido como láminas- β paralela en registro (PIRIBS), fue propuesto por Surewicz y colaboradores en 2007 (Cobb et al., 2007) y presenta una situación en la que las láminas- β se acumulan dispuestas en registro, lo que permite un crecimiento infinito de las fibras. Este modelo se basó en los experimentos de intercambio de hidrógeno-deuterio acoplado a espectrometría de masas y de resonancia paramagnética electrónica (EPR, del inglés *Electronic Paramagnetic Resonance*), utilizando proteína recombinante humana y también PrP^{Sc} procedente de cerebro (Smirnovas et al., 2011). Según este modelo, cada monómero de PrP tiene 4.8 Å de tamaño y se apila sobre la anterior en registro, estando cada monómero compuesto únicamente por láminas- β plegadas sobre sí mismas.

Este modelo, viene respaldado por datos obtenidos a través de estudios de RMN de estado sólido utilizando proteínas recombinantes o estudios *in silico* de dinámica molecular. Para estos estudios, se utilizaron amiloides de PrP formados espontáneamente o generados a partir de una semilla, lo que sugiere que amiloides de PrP de diferente origen pueden adoptar una conformación similar a este modelo (Grovetman et al., 2014, Tycko et al., 2010). Para evitar las posibles interferencias por parte de algunas de las modificaciones post-traduccionales que sufre la PrP en los estudios de intercambio de hidrógeno-deuterio acoplados a espectrometría de masas, se realizaron experimentos utilizando PrP²⁷⁻³⁰ directamente purificada a partir de encéfalos de ratones sin GPI (Chesebro et al., 2005). 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 *in vitro* y que había mostrado infectividad previamente (Theint et al., 2017). Una de las características en las que se apoya este modelo es la existencia de únicamente de láminas- β y giros cortos que las separan, sin presencia de hélices- α , lo que supone la pérdida total de los motivos estructurales de la PrP^C durante la conversión a PrP^{Sc} (Caughey et al., 1991). Sin embargo, la conformación PIRIBS presenta incongruencias, como la imposibilidad de explicar la presencia natural de hasta dos N-glicanos en la PrP^{Sc}, ya que el alto grado de empaquetamiento que requiere esta estructura no deja espacio libre para estas cadenas laterales de gran tamaño (Baskakov and Katorcha, 2016). Además, datos obtenidos en experimentos de cryoEM y difracción por rayos X, no respaldan el modelo PIRIBS, ya que apuntan a que los monómeros de PrP^{Sc} tendrían una altura de 19.2 Å, justo cuatro veces más que las que este modelo presenta (Vazquez-Fernandez et al., 2016, Wille et al., 2009). Por otra parte, sí observan una señal más débil de 10 Å característica del apilamiento de láminas- β (Eanes and Glenner, 1968) y que ha sido detectada en el prion fúngico HET-s bajo determinadas condiciones (Wan et al., 2012), lo que podría corresponderse con una estructura similar al modelo PIRIBS y que ha sido descrita en otros amiloides. En el momento en el que se redacta esta tesis doctoral, resulta de especial relevancia la reciente publicación por parte del laboratorio del Dr. Byron Caughey en la que se presenta la estructura tridimensional a nivel atómico de un prion mamífero infeccioso de hámster, resuelta mediante técnicas de cryoEM. Dicha estructura está compuesta por once regiones de láminas β en cada monómero de PrP^{Sc} y cuyos agregados se encuentran formando una estructura de tipo PIRIBS, confirmando sorprendentemente la presencia de este modelo estructural al menos en la cepa de hámster que utilizan para la resolución de la estructura tridimensional (Figura 4 a) (Kraus et al., 2021).

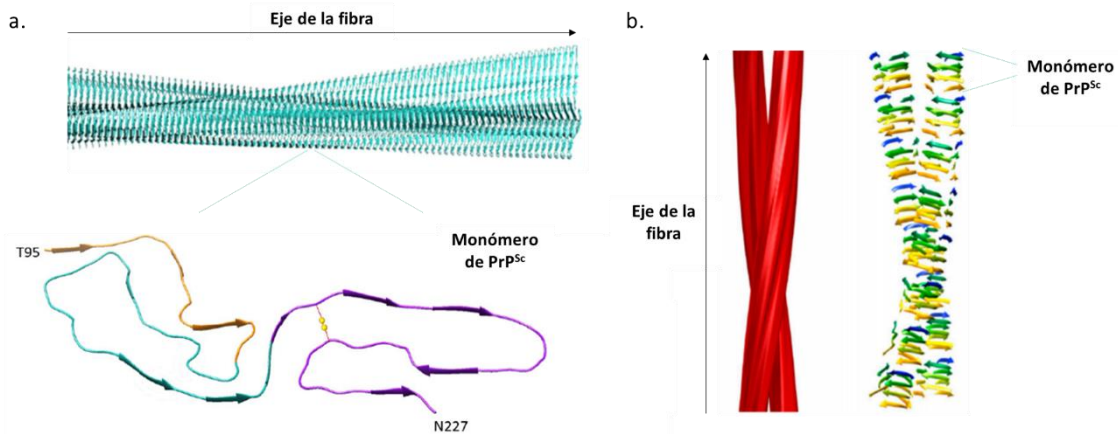


Figura 4. Representación de los dos modelos estructurales con mayor respaldo experimental de las fibras de PrP^{Sc} y los monómeros que los conforman. a) Modelo de lámina- β paralela en registro (PIRIBS). (Modificado de (Kraus et al., 2021). **b)** Modelo de láminas- β en solenoide de cuatro pisos (4RBS). Modificado de (Wille and Requena, 2018).

Modelo de láminas- β en solenoide

El modelo de láminas- β en solenoide de cuatro pisos (4RBS, del inglés *4-Rung β -Solenoid*), presenta una estructura tridimensional en la que la PrP^{Sc} está formada por láminas- β enrolladas sobre sí mismas formando un solenoide de cuatro pisos (Figura 4 b). Fue propuesto basándose en los datos obtenidos por cryoEM y la reconstrucción tridimensional (3D) realizada utilizando PrP^{Sc} purificada de ratones transgénicos que expresaban una PrP^C sin GPI y que habían sido infectados con priones murinos obtenidos de animales infectados (Vazquez-Fernandez et al., 2016). Cada monómero de PrP^{Sc} se dispondría según este modelo, en forma solenoide formado por cuatro niveles o pisos, cada uno de ellos con una altura de 4.8 Å, correspondiente a cada una de las cuatro vueltas que daría este solenoide formado por láminas- β , dando lugar a una altura teórica de 19.2 Å (4.8 Å \times 4 pisos). Estas evidencias se apoyan a su vez, en datos previos de difracción de rayos X y FTIR, donde se dedujeron unidades repetitivas con valores de 9.6, 6.4 y 4.8 Å, correspondientes con las alturas de los niveles del solenoide (Wille et al., 2009). Las imágenes obtenidas por cryoEM mostraron fibras de 10 nm de grosor, compuestas a su vez por dos protofilamentos que presentan una torsión hacia izquierda o derecha dejando un espacio entre ambos. En cuanto a la altura de las fibras, obtuvieron valores de 20 Å y 40 Å, que concuerdan con las medidas de una fibra individual (~19.2 Å) y con un ensamblaje mayor de dos monómeros a medida que el protofilamento se extiende en longitud. Esta unión teórica entre monómeros de PrP^{Sc} dentro de una misma fibra podría ocurrir siguiendo la misma orientación (cabeza-cola) o la contraria (cabeza-cabeza y/o cola-cola), siendo imposible de predecir actualmente con los datos experimentales disponibles (Wille and Requena, 2018). La señal de 10 Å característica del empaquetamiento de láminas- β y que se observaba en experimentos que condujeron a proponer el modelo PIRIBS, no se detectó en estos experimentos, lo que respalda la conformación de solenoide. Sin embargo, los datos de difracción obtenidos para priones de origen recombinante sí confirmaron la

presencia de la señal características de 10 Å relacionada con el modelo PIRIBS, aunque puede deberse a la diferencia entre el origen encefálico y recombinante de los priones (Wille et al., 2009). La estructura de β -solenoides ya ha sido confirmada mediante RMN de estado sólido para un prion fúngico, el amiloide HET-s que presenta una estructura de β -solenoides de dos pisos y una ausencia de la señal de 10 Å en condiciones normales, además de un contenido aproximado de 53% de láminas- β y un 47% de giros y bucles (Wasmer et al., 2008). Este hecho encajaría con los datos históricamente obtenidos a través de FTIR, que mostraban como la PrP^{Sc} seguía presentando un pequeño porcentaje de hélices- α a pesar de su contenido mayoritario de láminas- β en la PrP^{Sc} (Caughey et al., 1991, Pan et al., 1993). Debido a que esa señal en la técnica de FTIR asociada a hélices- α solapa parcialmente con la señal característica de giros y bucles, este modelo aboga por una reinterpretación de los resultados, defendiendo la presencia de giros y láminas- β en el solenoides y descartando la existencia de hélices- α (Requena and Wille, 2014). De esta manera, el modelo estaría compuesto por láminas- β enrolladas y que abarcan la región globular del extremo C-terminal de la PrP^{Sc}, proyectando la región flexible del N-terminal hacia el exterior de la estructura. Esta disposición viene asociada con un alto grado de compactación, lo que sería compatible con la elevada resistencia al tratamiento con proteasas, evitándose la degradación de la mayor parte de fibrillas de PrP^{Sc}, pero a su vez, concordando con la pérdida de los primeros 90 aminoácidos de extremo N-terminal. Este modelo se ha utilizado para simulaciones de dinámica molecular (MD, del inglés *Molecular Dynamics*) que presenta la resolución atómica de la PrP^{Sc} murina basándose en la conformación 4R β S. Este modelaje ha confirmado que el modelo de β -solenoides permite acomodar las glicosilaciones de la PrP^{Sc} sin impedimentos estéricos, además de presentar una estabilidad teórica similar a la del prion HET-s. Además de suponer un respaldo adicional al modelo, esta nueva aproximación ha permitido simular computacionalmente por primera vez el mecanismo de propagación de los priones basados en el modelo de β -solenoides (Spagnolli et al., 2019).

Los modelos de PIRIBS y 4R β S a pesar de sus diferencias, vienen respaldadas por distintos datos experimentales y se consideran actualmente como las opciones más cercanas a la realidad estructural de la PrP^{Sc}. Aunque la gran mayoría de la comunidad científica ha señalado el modelo 4R β S como el más correcto en los últimos años, algunos datos experimentales parecen sugerir que la estructura PIRIBS podría actuar como molde sobre el que más tarde polimerizarían los monómeros de PrP^{Sc} adoptando la configuración 4R β S. Esta posibilidad, sumada a la reciente publicación de Caughey y colaboradores en la que confirman la presencia de una estructura de tipo PIRIBS al menos en un prion mamífero, podrían incluso llevar a pensar en la coexistencia de ambos modelos según la cepa priónica analizada (Baskakov et al., 2019).

2.2.3. Neurotoxicidad de la PrP^{Sc}

La presencia de depósitos proteicos en el cerebro de pacientes y animales que habían sufrido una enfermedad priónica hizo que se considerasen estas fibras amiloideas como las responsables de la degeneración neuronal. Sin embargo, hoy en día existen evidencias que sugieren una disociación entre el fenómeno de formación de agregados proteicos y la neurotoxicidad, no estando del todo claro el papel de los depósitos de PrP^{Sc} en la muerte neuronal (Halliday et al., 2014). Los primeros estudios que permitieron empezar a explorar la neurotoxicidad en las enfermedades priónicas son los realizados con ratones KO-PrP (Chesebro et al., 2010), que llevaron a la conclusión de que la presencia de PrP^C era necesaria para que ocurriera la neurodegeneración, ya que incluso su eliminación condicional de forma postnatal o en modelos previamente inoculados con PrP^{Sc}, fue suficiente para revertir los signos clínicos iniciales y prevenir el curso de la enfermedad en ratones (Mallucci et al., 2003, Mallucci et al., 2007). Además, demostraron que la PrP^{Sc} no ejercía ningún efecto patológico en los ratones sin PrP^C, aparte de ser resistentes a la infección (Bueller et al., 1993). De la misma manera, los experimentos de trasplantes de tejido con PrP^C funcional en ratones KO-PrP, demostraron que, tras la infección con priones, la neurotoxicidad quedaba limitada al tejido que expresaba PrP^C, mientras que la PrP^{Sc} se extendía por todo el cerebro (Brandner et al., 1996). Estos datos apuntaban a que la PrP^{Sc} no era el agente directamente responsable de la neurodegeneración, y que dicho proceso era dependiente de PrP^C. Estudios posteriores precisaron que la neurodegeneración depende no solo de la disponibilidad de PrP^C funcional, sino de su localización en membrana celular, ya que al utilizar ratones transgénicos que expresaban PrP^C sin GPI, se observaba una neurodegeneración más leve, a pesar de acumular grandes depósitos de PrP^{Sc} (Chesebro et al., 2005). Por otra parte, la eliminación química del GPI en priones ya formados no disminuyó su capacidad de infección (Lewis et al., 2006), lo que sugiere que este grupo no es esencial para la propagación priónica y la transmisión de la enfermedad, pero sí para los procesos neurotóxicos asociados a ella. La unión del grupo GPI a las proteínas está asociada a diversas funciones, entre las que destaca su papel como transductor de señales debido a su presencia en la membrana plasmática (Puig et al., 2014). Algunos de los posibles mecanismos de toxicidad propuestos se apoyan en esta hipotética función, ya que se ha observado que la unión entre PrP^{Sc} y PrP^C puede causar daño neuronal en el hipocampo de ratones (Solfrosi et al., 2004), mientras que otras investigaciones defienden que una interacción entre la PrP^{Sc} y el sistema ubiquitín-proteosoma (UPS, del inglés, *Ubiquitin-proteasome system*) (Kristiansen et al., 2005) o incluso una respuesta por parte del RER ante el estrés causado por la acumulación de PrP^C en el citoplasma (Ma et al., 2002) podrían ser los principales mediadores de neurotoxicidad. Debido a que ninguna de estas propuestas ha podido ser demostrada, sigue siendo necesario conocer la función

biológica de la PrP^C y la de su grupo GPI en concreto, ya que podrían conducir a un entendimiento más completo de los mecanismos que rigen la neurodegeneración en las EET.

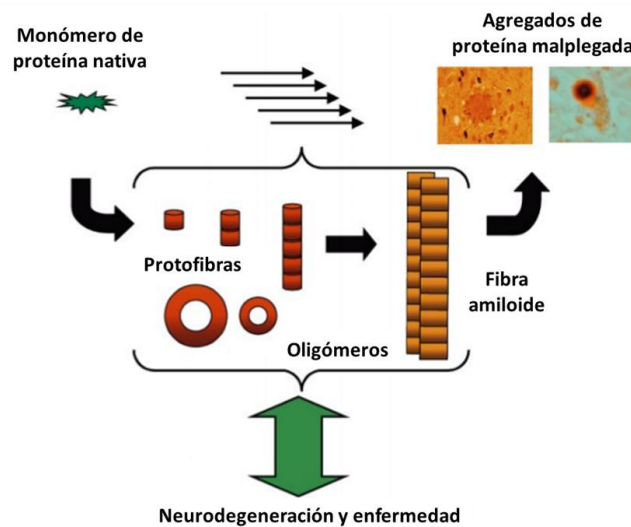


Figura 5. Representación esquemática de la formación de agregados proteicos a partir de proteína en conformación nativa. Ilustración de la formación de grandes agregados proteicos en las enfermedades neurodegenerativas a partir de monómeros de proteína en conformación nativa que malpliegan formando oligómeros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

A pesar de desconocer los mecanismos que desencadenan la toxicidad, cada vez se cuestiona más el papel de los grandes agregados de PrP^{Sc} como agentes neurotóxicos, presentando un escenario alternativo en el que las formas oligoméricas de menor peso molecular son, no solo las mejores inductoras del malplegamiento priónico (Silveira et al., 2005), sino también las especies que presentan propiedades neurotóxicas directamente (Figura 5) (Simoneau et al., 2007). Estas evidencias, han hecho que recientemente se consideren estas formas como las responsables de la toxicidad neuronal. Además, mientras que las técnicas de microscopía no son capaces de apreciar diferencias entre diferentes cepas priónicas, los experimentos de velocidad de sedimentación permiten distinguirlas por sus patrones de distribución de tamaño, correlacionando una mayor infectividad y neurotoxicidad con un menor tamaño de los polímeros (Tixador et al., 2010). La posible disociación entre los grandes agregados de PrP^{Sc} y la neurotoxicidad, presenta cierta semejanza a las situaciones que han sido descritas en otras enfermedades neurodegenerativas como la AD o la PD, donde los procesos neurotóxicos siguen sin comprenderse. En el caso de estas patologías, los oligómeros del péptido A β (β -amiloide) para la AD o de la α -sinucleína para la PD parecen desempeñar un papel clave en la neurotoxicidad, como también podría ocurrir en las EET con los oligómeros de PrP^{Sc}. Sin embargo, la manera en la que estos oligómeros de proteína malplegada se generan y polimerizan continúa sin esclarecerse, existiendo distintos mecanismos de propagación teóricos que se discutirán en el siguiente apartado.

3. Mecanismos de conversión

Los mecanismos moleculares que rigen el proceso de conversión de PrP^C a PrP^{Sc} en las enfermedades priónicas siguen siendo desconocidos. Independientemente de la enorme cantidad de información acumulada acerca de la PrP^C y aunque cada vez tenemos más datos sobre la PrP^{Sc}, el evento central de estas patologías, la interconversión entre las dos isoformas, sigue siendo un misterio (Gill and Castle, 2018). Una vez se inicia esta conversión y la isoforma patogénica o PrP^{Sc} se encuentra presente, es capaz de inducir ese mismo cambio estructural, a otras moléculas de PrP^C. Este proceso es autocatalítico y culmina con la acumulación de PrP^{Sc} en forma de agregados oligoméricos que a su vez componen fibras amiloides y que, a su vez, pueden organizarse y formar placas en el cerebro de individuos afectados. Estos grandes agregados proteicos, históricamente señalados como responsables de la toxicidad y la patología, podrían desempeñar una función protectora al secuestrar las formas subfibrilares más pequeñas de proteína amiloide, que podrían ser las principales mediadoras de la enfermedad (Caughey and Lansbury, 2003). Aunque se desconoce el papel que desempeñan los agregados de PrP^{Sc} de distinto tamaño, sí se sabe que todos ellos presentan diferencias estructurales y bioquímicas respecto a la PrP^C tras el proceso de conversión. A nivel de estructura secundaria, la PrP^{Sc} presenta un mayor contenido de láminas- β en comparación con la PrP^C, cuyo principal motivo estructural es la hélice- α (Pan et al., 1993). El cambio estructural conduce a características bioquímicas distintivas entre ambas isoformas, comentadas en apartados anteriores (Stamp et al., 1959, McKinley et al., 1981). Entre todas ellas, una de las propiedades más explotadas ha sido la resistencia parcial al tratamiento con proteasas que presenta la PrP^{Sc}, lo que permite distinguirla de la PrP^C por su peso molecular (Hunter and Millson, 1967, Bolton et al., 1982).

La adquisición de estas nuevas propiedades son fruto de un proceso de conversión del que se desconocen tanto sus mecanismos moleculares como dónde tienen lugar. Debido a que la PrP^C se encuentra anclada a la membrana mediante GPI, algunas investigaciones señalaron que la conversión podría tener lugar en las balsas lipídicas (Caughey et al., 1991). Sin embargo, otros resultados apuntan a que el malplegamiento podría ocurrir en otros compartimentos celulares como las vesículas endosomales u otras localizaciones, que involucrarían diferentes rutas y que implicarían una interacción entre la PrP^C y la PrP^{Sc} (Caughey et al., 2009). Precisamente, se han dedicado muchos esfuerzos a estudiar dicha unión, para caracterizarla y determinar su importancia en el proceso de conversión. Siguiendo esta línea, algunos estudios realizados con ratones transgénicos han proporcionado evidencias de que la conversión de la PrP^C a PrP^{Sc} ocurre a través de la formación de un complejo entre ambas, aunque dicho complejo no ha podido ser aislado (Prusiner et al., 1990, Meier et al., 2003). A pesar de ello, sí se demostró que la hipotética interacción entre la PrP^C y la PrP^{Sc} se

encontraba favorecida cuando las secuencias aminoacídicas de ambas especies eran idénticas y que dicha diferencia era más importante en el proceso de malplegamiento que en la formación del complejo inicial (Horiuchi et al., 2000). En este apartado se presentan los dos modelos teóricos de conversión más ampliamente discutidos en el campo, además de otras nuevas hipótesis emergentes que se centran en el paisaje energético y cinético del malplegamiento proteico. Estos modelos deben ser capaces de explicar los tres orígenes distintos de las enfermedades priónicas, esporádicas, genéticas o familiares y adquiridas.

3.1. Primeras aproximaciones: modelos teóricos de conversión

3.1.1. Modelo de conversión inducida por molde

Este modelo se basa en la existencia de una interacción directa entre la PrP^C y la PrP^{Sc}, donde la isoforma patogénica actúa como molde induciendo su malplegamiento en la isoforma celular (Prusiner, 1991). En un estado basal, ambas isoformas se encontrarían separadas por una barrera energética, por lo que la transformación directa y espontánea de la PrP^C a PrP^{Sc} estaría termodinámicamente desfavorecida según este modelo (Figura 6 a). Sin embargo, la existencia de diferentes orígenes en las enfermedades priónicas no podría ser fácilmente explicada por este modelo. Por ese motivo, el modelo propone la existencia de un estado transitorio entre ambas isoformas, que se conoce como PrP^{*} y que explicaría los tres orígenes de la enfermedad. En el caso de la variante adquirida, el estado transitorio formaría un complejo con la PrP^{Sc} de origen exógeno, dando lugar a un heterodímero PrP^{*}-PrP^{Sc} que posteriormente induciría ese estado en otras moléculas de PrP^C. Los casos de enfermedad priónica espontánea (de origen esporádico y/o genético) quedarían explicados por la aparición de un evento muy poco frecuente como sería la aparición de un homodímero PrP^{*}-PrP^{*}. Este complejo podría aparecer de manera espontánea o debido a una mutación somática, evolucionando en ambos casos a un homodímero PrP^{Sc}-PrP^{Sc} y originando la enfermedad. La enfermedad de origen genético estaría explicada además por una inestabilidad de la PrP^C debido a las mutaciones en el gen *PRNP* que conducirían a una mayor concentración de PrP^{*} y a la formación del homodímero PrP^{*}-PrP^{*}, lo que aumentaría la frecuencia de aparición del homodímero PrP^{Sc}-PrP^{Sc} (Cohen and Prusiner, 1998). Este modelo está respaldado por algunos resultados *in vitro* que confirman la existencia de un estado intermedio entre la PrP^C y la PrP^{Sc}, que podría coincidir con el denominado PrP^{*} (Zukas et al., 2008). Sin embargo, la explicación de que el estado PrP^{*} se origina como un evento aleatorio e infrecuente, no ha convencido a parte de la comunidad científica, que defiende la existencia de un catalizador para este proceso. En un inicio, se le llamó proteína X, pues se defendía que debía tener un origen proteico,

pero pronto esta teoría dejó de apoyarse con la generación de priones *in vitro* utilizando componentes purificados y PrP recombinante (Wang et al., 2010).

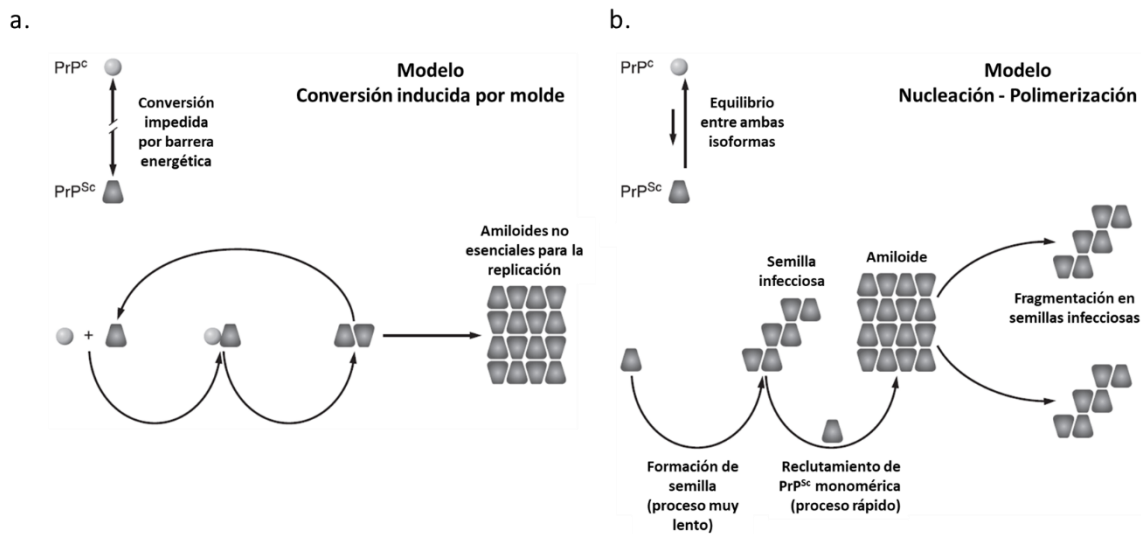


Figura 6. Representación esquemática de dos de los modelos clásicos de posibles mecanismos de conversión de priones. a) Modelo de conversión inducida por molde. b) Modelo de nucleación-polimerización. Modificado de (Aguzzi and Calella, 2009).

3.1.2. MODELO DE NUCLEACIÓN-POLIMERIZACIÓN

Este modelo propone que ambas formas de la proteína priónica (PrP^C y PrP^{Sc}) coexisten manteniendo un equilibrio termodinámico reversible donde se favorece la presencia de PrP^C bajo condiciones fisiológicas. La inestabilidad de la PrP^{Sc} monomérica provocaría una lenta formación de agregados más grandes, desplazando poco a poco el equilibrio hacia la formación de PrP^{Sc} a medida que se van añadiendo más unidades de esta isoforma (Jarrett and Lansbury, 1993). Según esta hipótesis de nucleación-polimerización, el agente infeccioso consiste en un agregado altamente ordenado de moléculas de PrP^{Sc} formado tras desplazar el equilibrio que originalmente favorecía la presencia de PrP^C. De esta manera, el proceso de conversión tendría una primera fase o fase latente en la que se forma un núcleo de PrP^{Sc} de manera lenta, y una segunda fase o fase exponencial donde nuevos monómeros de PrP^{Sc} se sumarían al núcleo inicial, permitiendo un rápido crecimiento del polímero. Este crecimiento descontrolado se traduciría en la formación de grandes agregados de tipo amiloide que a su vez podrían sufrir fragmentaciones puntuales generando nuevos núcleos de PrP^{Sc} susceptibles de sumar monómeros y aumentar el número de agregados amiloides, acelerando así el proceso (Figura 6 b). Este modelo teórico explicaría las enfermedades priónicas adquiridas con la entrada de agregados de PrP^{Sc} exógenos al organismo que actuarían como núcleos iniciadores de la propagación. En el caso de las EET de origen esporádico, la formación de los primeros núcleos sería un

proceso lento e infrecuente, que se vería acelerado por la presencia de mutaciones que aumentarían la tendencia de la PrP^C al malplegamiento en el caso de las formas genéticas. Si este modelo fuera correcto, la PrP^{Sc} sería la especie minoritaria del equilibrio entre ambas isoformas, pero al ser de expresión ubicua, estaría presente en todo el organismo y difícilmente podría ser considerada como el agente causante de la enfermedad. Esta propiedad quedaría relegada a los agregados de PrP^{Sc}, considerando la PrP^{Sc} monomérica como inofensiva *per se*, pero con el peligro potencial de actuar o bien como iniciador del proceso o bien como unidad agregada a las fibras crecientes de PrP^{Sc}. Algunos modelos matemáticos apoyan el modelo de nucleación-polimerización (Masel and Jansen, 2001), al igual que determinados estudios *in vitro* que demuestran que los oligómeros compuestos por menos de seis unidades de PrP^{Sc} no son infecciosos en hámster sirio, por lo que refuta la idea de que los dímeros de PrP^{Sc} que postula el modelo de conversión inducida por molde son los responsables de propagar la enfermedad (Silveira et al., 2005). En contra de este modelo existen algunas evidencias detectadas en otras enfermedades neurodegenerativas, como la observación en la AD de que los grandes agregados podrían desempeñar una función protectora en lugar de patogénica (Castellani et al., 2009).

3.2. Hacia nuevas aproximaciones: cinética y dinámica de la conversión

Tras casi 30 años desde su descripción, ninguno de los dos modelos de conversión clásicos ha sido ratificado, debido principalmente a la falta de pruebas bioquímicas y fisicoquímicas concluyentes. Ya en la década de 1990, aparecieron los primeros análisis cinéticos del proceso de conversión desde el punto de vista de cada modelo. Los estudios teóricos de Eigel revelaron que ambos modelos carecían de evidencias fisicoquímicas que los respaldasen, atendiendo sobre todo al evento de polimerización de la PrP^{Sc} (Eigen, 1996). De ambos modelos teóricos podía extraerse que la polimerización (o dimerización en el caso de la conversión inducida por molde) juega un papel crucial en el desarrollo de las EET y en la manera en la que un prion es capaz de replicarse e inducir su conformación en moléculas de PrP^C. De esta manera, los primeros estudios cinéticos atendían a la despolimerización de la PrP^{Sc} en hámsteres infectados (Safar et al., 1993b), revelando que los confórmeros de PrP^{Sc} eran más estables que la forma nativa y dando lugar a modelos que proponían una cinética lineal para la polimerización, otorgando importancia por primera vez al tamaño de los confórmeros iniciales de PrP^{Sc} (Masel and Jansen, 1999). Se han propuesto modelos híbridos que combinan ambos mecanismos de conversión, ya que los dos pueden ser cinéticamente similares a nivel teórico. Es el caso de la simulación numérica de Rezaei basada en el modelo Finke-Watzky (Watzky and Finke, 1997) para la polimerización autocatalítica de fibras amiloides (Rezaei, 2008). El proceso cinético de conversión se estudió atendiendo a perturbaciones que conducían a un incremento en láminas- β , bien en forma de

oligómeros o de fibras amiloides. Algunas de estas modificaciones fueron examinadas en los estudios de desplegamiento inducido por hidrocloreuro de guanidinio a pH ácido (Zhang et al., 1997) o los relacionados con la conversión de PrP inducida por dodecil sulfato sódico (SDS) (Stohr et al., 2008), que condujeron a que por primera vez se sugiriera que podían coexistir múltiples vías de plegamiento dentro del paisaje cinético de conversión de la PrP (Baskakov et al., 2002). Estas aproximaciones fueron importantes para poder estudiar el efecto de algunas mutaciones patogénicas en el malplegamiento y detectar regiones que podrían estar involucradas. Algunos ejemplos son el dominio comprendido por las hélices- $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de la PrP^C, que resulta clave en la obtención de oligómeros iniciadores del proceso (Prigent and Rezaei, 2011) o el puente disulfuro formado entre las cisteínas de las posiciones 179 y 214, cuyo estado de oxidación altera la estabilidad térmica de la PrP^C y favorece su conversión y posterior agregación (Sang et al., 2012).

Todas estas aproximaciones cinéticas que daban lugar a modelos de agregación se constituían basándose en los procesos canónicos de nucleación-elongación-fragmentación enunciados a principios de la década de 1980 (Bishop and Ferrone, 1984). Estos postulados se basan en la existencia de un único tipo de ensamblaje estructural, que podría diferenciarse por la distribución de tamaño que presentaban sus moléculas, en función de en qué punto de la cinética lineal de polimerización se encontrasen. Sin embargo, en las últimas décadas se han sucedido una plétora de evidencias que apoyan la heterogeneidad y diversidad estructural de la PrP^{Sc} que da lugar a la existencia de diferentes cepas de priones con propiedades variables que han sido ampliamente descritas en estudios de transmisión (Le Dur et al., 2005), cinéticos (Sandberg et al., 2011) y bioquímicos (Igel-Egalon et al., 2019). Sin embargo, muy pocos modelos matemáticos han tenido en cuenta la coexistencia de múltiples tipos de fibras y diversos tipos de malplegamiento por parte de la PrP, tal y como propusieron Collinge y colaboradores con el concepto de las cuasi-especies o sub-cepas (Collinge and Clarke, 2007). La caracterización de estos tipos de ensamblajes variables de la PrP^{Sc}, que presentan distintos grados de agregación, despolimerización e intercambio cinético, requieren de nuevos modelos y análisis matemáticos (Torrent et al., 2016). Los estudios realizados con la técnica de dispersión estática de luz (SLS, del inglés, *Static light Scattering*) reflejan la aparición de oscilaciones puntuales durante el evento de agregación de fibras amiloides de la PrP recombinante, que pueden explicarse por una variación en la capacidad de polarización de la muestra, propiedad que depende directamente del tamaño de dichas moléculas. Con el objetivo de describir las reacciones cinéticas que pueden ocurrir en el evento de polimerización/despolimerización, se propuso un modelo matemático aplicando una variante al sistema de Becker-Döring. Este sistema es el punto de partida natural para el proceso de polimerización/despolimerización, ya que considera dos reacciones opuestas: la polimerización a través de adición de monómeros y la despolimerización debido a la pérdida de estos. Sin embargo,

este modelo no contempla oscilaciones, ni tiene en cuenta las restricciones estéricas de los grandes polímeros a medida que se forman y no contempla ratios de despolimerización no lineales. En un modelo Becker-Döring no lineal y bi-monomérico, una especie de monómero está implicado en la polimerización y otro en la despolimerización, explicando así las oscilaciones en los experimentos de despolimerización y presentando la posibilidad de un evento no lineal e inducido por monómeros, que serían los únicos agentes que interaccionarían entre las fibras de gran tamaño (Doumic et al., 2019). Este tipo de aproximaciones se basan en datos experimentales extraídos a partir de fibras amiloides de PrP que no siempre tienen las propiedades de un prion *bona fide*, lo que hace que el proceso de conversión modelado pudiera ser muy diferente del que ocurre en la naturaleza. Por otro lado, ninguno de estos modelos tiene en cuenta la propagación de PrP^{Sc} en presencia de una semilla priónica, lo que ha llevado a la aparición de algunas aproximaciones que modelen la cinética de crecimiento fibrilar que podrían ocurrir en técnicas como la PMCA, cuyo producto final (PrP^{Sc}) tiene las características de un prion *bona fide* (Joseph et al., 2020).

Sin embargo, la necesidad de técnicas *in vitro* capaces de generar eficientemente priones *bona fide* sin la necesidad de la adición de una semilla de PrP^{Sc} externa, sería una fuente ideal de datos que podrían ser utilizados para generar nuevos modelos matemáticos. Los datos experimentales y los modelos teóricos deben combinarse con técnicas de simulación computacional que, partiendo de estructuras experimentales de PrP, pueden ofrecer información de alta resolución, simular cambios conformacionales y estudiar el efecto de mutaciones patogénicas (Hirschberger et al., 2006). Las primeras simulaciones de dinámica molecular (MD, del inglés, *Molecular Dynamics*) realizadas en el campo de los priones, modelaron la conversión conformacional de la PrP^C partiendo de la estructura de proteína recombinante de hámster sirio (Alonso et al., 2002). Desde entonces, se han utilizado cada vez más este tipo de técnicas, a pesar de las limitaciones que también presentan. Las simulaciones de MD actuales son capaces de predecir el movimiento de un sistema molecular a través del tiempo, aunque están limitadas a una escala de tiempo de nanosegundos, por lo que procesos biológicos que ocurran en escalas de tiempo superiores, no podrían ser modelados correctamente (van der Kamp and Daggett, 2011). Al no poder proporcionar modelos para descifrar el mecanismo del cambio conformacional, estas técnicas se utilizan para muestrear dos estados; el inicial y el final tras el proceso de conversión, lo que ha conducido a la aportación de más información acerca del mecanismo de conversión que desencadena las EET y la estructura final que podría adoptar la PrP^{Sc} (Spagnolli et al., 2020).

3.3. Enfermedades priónicas humanas

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles humanas son un grupo de enfermedades que comparten características clínicas y anatomopatológicas. Todas ellas resultan fatales, son transmisibles y provocan neurodegeneración en el paciente. En los exámenes *post mortem*, suelen presentar espongiosis, gliosis reactiva y acumulación de agregados proteicos en el SNC. A pesar de estas similitudes, presentan una gran variabilidad en sus rasgos clínicos, patrones de lesión, propiedades bioquímicas del agente causal y etiología, ya que las prionopatías pueden originarse de tres maneras distintas (Tabla 1). Los modelos anteriormente detallados, aunque teóricos, deben ser capaces de explicar los tres orígenes distintos de las enfermedades priónicas en humanos. Teniendo en cuenta la hipótesis “solo proteína”, la isoforma sana de la proteína priónica (PrP^C) sufre un cambio conformacional que la transforma en una isoforma patogénica (PrP^{Sc}). Este evento de conversión se puede iniciar de tres formas distintas: en presencia de mutaciones en el gen *PRNP* para el caso de las variantes genéticas de la enfermedad (también conocidas como hereditarias o familiares), por la presencia de PrP^{Sc} exógena como ocurre en el caso de las formas adquiridas o por un fenómeno espontáneo de malplegamiento, dando lugar a formas esporádicas de la enfermedad (Aguzzi and Calella, 2009).

Aproximadamente el 15% de las enfermedades priónicas humanas son heredadas y entre ellas se encuentran las formas genéticas de CJD (gCJD), el FFI y el GSS, estando todas ellas asociadas a mutaciones en el gen *PRNP*. Aunque es un gen muy conservado a nivel evolutivo, ofrece a su vez una amplia diversidad de polimorfismos, tanto en humanos como en otras especies. En el caso de los humanos, destaca el polimorfismo del aminoácido 129, donde la PrP puede presentar un residuo de metionina (M) o de valina (V). Esto da lugar a que la dotación alélica de un individuo para la posición 129 de su PrP, pueda ser homocigótica para metionina (M129M), homocigótica para valina (V129V) o heterocigótica (M129V) (Collinge, 2001). Este polimorfismo ha demostrado ser clave en la susceptibilidad a enfermedades priónicas adquiridas y esporádicas, ocurriendo la mayoría de ellas en individuos homocigotos para esta posición (Palmer et al., 1991, Windl et al., 1996). Además del polimorfismo natural en la posición 129 de la PrP humana, existen numerosas mutaciones autosómicas dominantes en el gen *PRNP* que causan enfermedades priónicas. Entre ellas destacan la mutación P102L que desencadena GSS en el paciente, la mutación D178N, detectada por primera vez en una familia italiana que padecía de FFI, únicamente en presencia del polimorfismo M129M o M129V (Cracco et al., 2018) y las mutaciones E200K, V210I y V180I en el caso de las gCJD. Estas cinco mutaciones son responsables del 85% de los casos de EET genéticas en humanos, aunque

recientemente se están identificando otras muchas variantes sospechosas de ser patogénicas (Minikel et al., 2016).

Tabla 1. Enfermedades priónicas humanas clasificadas 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)

En el caso de las EET humanas adquiridas, siempre se encuentran relacionados con una fuente exógena de agente infeccioso, que puede entrar al organismo por vía oral, como es el caso del kuru o la vCJD, o a través de prácticas médicas que impliquen elementos contaminados y dan lugar a la CJD iatrogénica (iCJD) (Bonda et al., 2016). Entre los casos debidos a la ingestión de material contaminado, encontramos el kuru, del que se ha detallado su etiología previamente (Liberski et al., 2019) y la vCJD, diagnosticada por primera vez en 1995 y relacionada con el consumo de carne o derivados contaminados con SNC de bóvidos que padecían BSE (Scott et al., 1999). La variante iatrogénica de la CJD (iCJD) hace referencia a la transmisión accidental de priones a través de un procedimiento médico. En la década de 1960 se sugirieron varios casos de transmisión mediante instrumentos quirúrgicos (Nevin et al., 1960), pero no fue hasta 1974 cuando se describió el primer caso confirmado de iCJD debido a un trasplante de córnea (Duffy et al., 1974). Desde entonces, se han reportado otras fuentes de transmisión iatrogénica, como la inyección de hormona del crecimiento humana (Cali et al., 2015) o el injerto de duramadre cadavérica, que supuso la aparición de varios casos de iCJD en Japón durante esta década (Kobayashi et al., 2014). Otras vías de contaminación descritas relacionadas con procedimientos médicos han sido las transfusiones de sangre (Peden et al., 2005) o la instrumentación neuroquirúrgica contaminada (Will and Matthews, 1982), aunque con evidencias menos sólidas que las anteriores.

El grupo más común dentro de las EET humanas son las enfermedades priónicas de origen esporádico, que pueden manifestarse en forma de sFI, VPSPr o CJD esporádica (sCJD), siendo esta la más frecuente, ya que engloba el 85% de los casos de EET esporádicas en humanos, con una incidencia

de entre 1 y 2 casos por millón de habitantes al año (Ironsides et al., 2017). Además de ser la EET esporádica más común en humanos, es también la más heterogénea a nivel clínico, lo que ha supuesto todo un reto a la hora de establecer un consenso sobre su clasificación en distintos subtipos (Parchi et al., 2012). Algunas de estas clasificaciones se basan en aspectos moleculares de la sCJD, atendiendo a propiedades como el tamaño del núcleo resistente a proteasa de la PrP^{Sc} acumulada en el cerebro de estos pacientes, los diferentes patrones de glicosilación que presenta esta PrP^{Sc} y la presencia de metionina o valina en la posición 129 de la PrP. Esta heterogeneidad a nivel sintomático y bioquímico podría explicarse con la existencia de diversas cepas (Hill et al., 2003). La aparición de la enfermedad en todos estos casos no ha podido relacionarse con alteraciones genéticas ni con el contacto con fuentes exógenas de priones, por lo que se piensa que su origen es puramente espontáneo. El evento de malplegamiento y la formación de PrP^{Sc} podría ser consecuencia de mutaciones somáticas en el gen de *PRNP* o debido a un cambio conformacional de la PrP^C que ocurriría *de novo*, sin la presencia de alteraciones genéticas. Estos dos escenarios supondrían que la PrP^{Sc} generada de forma espontánea debe ser capaz de reclutar monómeros de PrP^C sanos e inducir el malplegamiento en ellos, dando lugar a la aparición de los síntomas tras un largo período de incubación, lo que coincide con la explicación que ofrece el modelo de conversión inducida por molde. Otra explicación puede ser que pequeñas cantidades de PrP^{Sc} se encuentren presentes en el cerebro, posiblemente como productos minoritarios de un equilibrio entre esta isoforma y la PrP^C, tal y como postula el modelo de nucleación-polimerización. Algunos autores sugieren que estas moléculas minoritarias de PrP^{Sc} podrían encontrarse unidas a otras proteínas, como por ejemplo a proteínas de choque térmico (HSP, del inglés, *Heat Shock Protein*), que controlan su efecto patogénico hasta que dicho mecanismo comienza a fallar con la edad, perdiendo este efecto protector y desencadenando una EET esporádica (Kelly, 1998, Safar, 2012).

4. Transmisión de priones

4.1. Vías de entrada y diseminación por el organismo

Uno de los aspectos más importantes en la transmisión de priones, clave en las variantes adquiridas de la enfermedad, es la manera en la que los priones entran al organismo y cómo colonizan determinadas áreas, siguiendo un tropismo selectivo que finaliza con su llegada al SNC. Ha sido ampliamente demostrado que el método más eficaz y rápido de inducir una EET en un modelo animal es mediante la inoculación intracerebral (ic) de priones, pero este evento no representa fielmente lo que ocurre en la naturaleza. Una vía de infección natural es a través de la ruta oral, como se ha demostrado tanto a nivel experimental (Fox et al., 2006) como históricamente, con la aparición de enfermedades adquiridas como el scrapie (Cuille and Chelle, 1936), el kuru (Liberski et al., 2019), la

BSE (Anderson et al., 1996) o la vCJD (Hilton, 2006). Otras de las rutas de infección más estudiadas en el laboratorio han sido las inoculaciones intravenosas (iv), intraperitoneales (ip) y subcutáneas, que han mostrado diferente tasa de éxito cuando han sido utilizadas en modelos *in vivo* (Kimberlin and Walker, 1979). Sin embargo, los priones pueden ser transmitidos a través de vías menos comunes, como son la inyección intraocular (Fraser, 1982), intralingual (Bartz et al., 2003), los trasplantes de córnea (Duffy et al., 1974) e incluso las escarificaciones en la piel (Taylor et al., 1996).

Independientemente de la vía por la que penetren los priones al organismo, exceptuando la inoculación intracerebral, estos deben ser capaces de replicarse en los tejidos periféricos donde se encuentren y diseminarse por el organismo hasta alcanzar el SNC. Los procesos que tienen lugar tras la administración por vía oral han sido ampliamente estudiados debido a que esta ruta es la más frecuente y ha originado las principales formas adquiridas de las EET a lo largo de la historia. Por tanto, tras una infección oral, se observa un rápido incremento de la infectividad priónica en la parte terminal del intestino delgado y tan solo en las primeras dos semanas, la infección se extiende a través de los nervios periféricos hasta invadir el núcleo motor del nervio vago, tal y como se ha descrito en ratones y hámsteres infectados con scrapie (McBride et al., 2001). La manera en la que el agente infeccioso pasa del tracto gastrointestinal al tejido nervioso periférico, sigue siendo tema de estudio en el campo de los priones, aunque se ha observado que algunas de las células del sistema inmunitario del organismo receptor pueden participar en la diseminación de los priones (Aguzzi et al., 2013). Concretamente, hace cincuenta años se observó a través de bioensayos, que los órganos linfoides acumulaban priones tras una infección por vía intracerebral o intraperitoneal (Fraser and Dickinson, 1970), y que la expresión de PrP^C era constante en los linfocitos cercanos a estos tejidos (Cashman et al., 1990). Posteriormente, la realización de bioensayos con ratones inmunodeficientes demostró que la deficiencia de linfocitos afecta a la patogénesis de priones periféricos, pero no altera la transmisión de estos al SNC (Lasmézas et al., 1996). Sin embargo, es indudable que, en el caso de una administración oral de priones, parte de ellos son capaces de llegar a los nervios periféricos tras su paso por el tracto digestivo, fenómeno en el que parecen estar implicadas las placas de Peyer. Estas placas son cúmulos de tejido linfático formados en su mayoría por linfocitos B que recubren el intestino delgado, concretamente en la región terminal donde se acumulan los priones en un primer momento (Kimberlin and Walker, 1978). Los linfocitos B presentes en las placas de Peyer median la maduración de otro tipo de células presentes en este tejido, las células M (del inglés, *Microfold Cells*) que, debido a que no secretan enzimas digestivas ni están cubiertas de glicocálix, son una vía de entrada ideal para muchos microorganismos. Este hecho condujo a la propuesta de que las células M podrían ser un sitio de entrada de priones, donde tendría lugar el transporte transepitelial a través del intestino (Heppner et al., 2001), escenario que se confirmó con posteriores estudios en los que las células M eran

suprimidas, inhibiendo así la infección por vía oral (Donaldson et al., 2012). Sin embargo, es posible que este transporte no esté mediado únicamente por las células M, ya que hay estudios que señalan a los enterocitos del intestino delgado como responsables de esta función (Kujala et al., 2011), utilizando mecanismos dependientes de ferritina o a través de endocitosis mediada por la unión al receptor de laminina (Mishra et al., 2004, Morel et al., 2005). Tras la captación de la PrP^{Sc} por parte de las placas de Peyer, comienza una segunda fase de replicación y propagación que involucra nervios periféricos y células dendríticas foliculares. Estas células dendríticas se localizan en el interior de las placas de Peyer, contactan con las células M y adquieren antígenos procedentes de la luz intestinal para transportarlos a los nervios periféricos, lo que podría facilitar el proceso de neuroinvasión (Huang et al., 2002), tal y como sugiere la acumulación de este tipo de células tras la infección con scrapie en ratones (Kitamoto et al., 1991). Para completar el proceso de neuroinvasión, la PrP^{Sc} debe alcanzar el SNC diseminándose en dirección retrógrada a través de las fibras nerviosas del sistema simpático y parasimpático (Mabbott and MacPherson, 2006). La ablación química de ciertos nervios conduce a un retraso o prevención del transporte de priones desde los órganos linfáticos a la médula espinal, sitio de acceso al SNC. Por el contrario, ratones transgénicos con una inervación aumentada en sus bazos, mostraron una gran acumulación de priones en este órgano y un periodo de incubación más corto tras ser inoculados con scrapie (Glatzel et al., 2001). De la misma manera, además de la cantidad de tejido nervioso periférico disponible, la distancia existente entre las terminaciones nerviosas y las células dendríticas es un factor condicionante de la neuroinvasión (Prinz et al., 2003). El mecanismo por el cual la PrP^{Sc} es capaz de abandonar las células dendríticas para dirigirse a las terminaciones nerviosas se desconoce, si bien no existen evidencias que sostienen varias hipótesis diferentes. La primera de ellas es mediante un contacto directo entre células (Flechsigg et al., 2001), aunque resulta poco probable que el agente infeccioso se transmita de esta manera, ya que estas dos células ocupan distintos sitios anatómicos, encontrándose bastante separados y haciendo que los contactos entre ellas sean muy puntuales (Defaweux et al., 2005). Este hecho conduce a la hipótesis de que existe una transferencia intercelular mediada por exosomas, ya sea directamente desde las células dendríticas o a través de intermediarios como los macrófagos (Fevrier et al., 2004). Otra posibilidad es la difusión de las formas oligoméricas o protofibrilares de la PrP^{Sc} de forma libre a través del medio extracelular (Heikenwalder et al., 2007). Independientemente del mecanismo que los priones utilizan para alcanzar las terminaciones nerviosas, la forma en la que son transportados desde los nervios periféricos hasta las neuronas del SNC también se desconoce. Teniendo en cuenta la lentitud de la propagación neuronal observada en ciertos estudios (Kimberlin et al., 1983), una de las hipótesis defiende el transporte secuencial de PrP^{Sc} a través de los nervios, induciendo el malplegamiento de forma sucesiva en las moléculas de PrP^C de la superficie de las células nerviosas. Otras hipótesis apuntan al tránsito de

priones por los axones nerviosos periféricos siguiendo un transporte de tipo retrógrado que podría involucrar mecanismos asociados a microtúbulos (Aguzzi and Calella, 2009).

A lo largo de estas décadas se ha demostrado que el sistema inmunitario tiene un papel indispensable en la adquisición y diseminación de priones, aunque los mecanismos que la PrP^{Sc} utiliza para evitar su vigilancia, siguen sin conocerse. La expresión ubicua de la PrP^C es un factor para tener en cuenta, ya que podría ayudar a evadir la acción del sistema inmunitario, aunque no se encuentre en su conformación patogénica. Por otra parte, se cree que el alto nivel de empaquetamiento que presentan los oligómeros de PrP^{Sc} puede enmascarar los epítomos conformacionales que la distinguen de la PrP^C y que deben ser reconocidos por las células inmunitarias (Kraus et al., 2013). Además de la heterogeneidad que la PrP^{Sc} puede presentar en cuanto al tamaño de sus conformómeros, la existencia de múltiples cepas dificulta aún más el entendimiento del transporte neuronal, pero a su vez proporciona una herramienta con la que poder distinguirlas, ya que muchas de estas cepas utilizan mecanismos diferentes para llegar al SNC (Bartz et al., 2005). Un ejemplo de este fenómeno se encuentra en las cepas HY y DY que, pese a tener un origen común, presentan distintas propiedades de neuroinvasión (Ayers et al., 2009). La adquisición de más información acerca de la manera en la que los priones se diseminan por el organismo y colonizan ciertos órganos de manera selectiva, proporcionaría un mejor conocimiento sobre el fenómeno de cepa, uno de los aspectos más relevantes de las EET y en el que profundizaremos a continuación.

4.2. Barrera de transmisión y fenómeno de cepa

En el campo de la investigación priónica, el término cepa corresponde a una población de priones definida y aislada de un animal específico, con respecto a una serie de características distintivas básicas y a parámetros bioquímicos cada vez más precisos que permiten la discriminación de cuasi-especies dentro de un grupo de conformómeros (Igel-Egalon et al., 2018). Por tanto, las distintas cepas priónicas pueden definirse como aislados infecciosos que, al ser transmitidos a hospedadores singénicos en condiciones fijas y controladas, induce en ellos fenotipos distintos de la enfermedad (Rossi et al., 2019). Este concepto resultó en un argumento en contra de la teoría “solo proteína”, ya que la existencia de diferentes cepas capaces de variar las características biológicas de un agente infeccioso no se concebía sin la existencia de cambios en su material genético (Lampert et al., 1972). Sin embargo, evidencias experimentales posteriores comenzaron a arrojar algo de luz al fenómeno de cepa priónica, apuntando a la existencia de distintos conformómeros estructurales de PrP^{Sc} que compartían una misma secuencia aminoacídica (Caughey et al., 1998a). Así, las diferentes cepas de priones pueden clasificarse atendiendo a las características que presentan *in vivo*, como los signos clínicos que producen, el tiempo

de incubación o el perfil histopatológico de lesiones (propiedades biológicas) (Lowenstein et al., 1990); pero también en función de sus propiedades bioquímicas, como son la resistencia a la digestión por PK, la velocidad de sedimentación, el patrón de glicosilación de la PrP^{Sc} y la resistencia a la desnaturalización por agentes caotrópicos (propiedades bioquímicas), que derivan indudablemente de diferencias conformacionales (Scialo et al., 2019). Una de las características distintivas más relevantes de las cepas priónicas, es su capacidad de superar la barrera de transmisión entre especies y provocar la enfermedad en un huésped distinto al de origen. Este fenómeno conduce a que el concepto de cepa priónica y el de barrera de transmisión hayan sido estudiados conjuntamente a lo largo de la historia. Englobamos bajo el nombre de barrera de transmisión a todo fenómeno o característica de los priones que resulte en una transmisión restringida de los mismos. Actualmente, este concepto no se limita únicamente a la capacidad de transmisión entre especies, sino que incluye toda propiedad distintiva de las cepas que dificulte la propagación de un prion entre individuos. Esta barrera hace referencia a la dificultad que presentan algunas cepas de priones para transmitirse a una especie diferente de la que proceden, traducándose en una prolongación del tiempo de incubación y/o una tasa de ataque incompleta, es decir, que no todos los animales inoculados desarrollan la enfermedad (Dickinson, 1976). La obtención de una tasa de ataque incompleta es habitual en una primera infección de priones que incluye dos especies diferentes, obteniendo periodos de incubación más largos que cuando la transmisión tiene lugar en individuos pertenecientes a la misma especie. En inoculaciones posteriores dentro de la misma especie, se observa una reducción del periodo de incubación, hasta que finalmente la cepa priónica en cuestión se adapta a la nueva especie, fenómeno que se confirma mediante el análisis de propiedades biológicas y anatomopatológicas (Bruce, 2003).

Este amplio concepto de barrera de transmisión es fruto de un largo recorrido histórico, paralelo al descubrimiento del origen proteico del agente infeccioso, que comienza con el uso del término barrera de especie. Desde que Cuillé y Chelle hicieran referencia a la transmisibilidad del scrapie entre ovejas (Cuille and Chelle, 1936), el siguiente punto de estudio fue la capacidad de ciertos priones para transmitirse a individuos de otras especies distintas de la originaria, siendo Gajdusek y colaboradores los pioneros con sus investigaciones a lo largo de la década de 1960 (Gajdusek et al., 1966, Gibbs et al., 1968). Durante los años posteriores, la comunidad científica se dedicó a estudiar el fenómeno de barrera de transmisión de forma experimental atendiendo a su comportamiento en otras especies, principalmente primates, donde se realizaron experimentos para transmitir la CJD a monos de cola cortada, monos ardilla y monos rojos entre otros, relacionándola con otras EET humanas como el kuru, pero sin detectar la presencia de distintas cepas de priones (Zlotnik et al., 1974, Espana et al., 1975). Gracias a estos primeros estudios que perseguían desentrañar los mecanismos que regían la barrera entre especies, se describió por primera vez la existencia de distintas cepas priónicas, observando dos

comportamientos distintivos (*drowsy* y *scratching*) en cabras que habían sido inoculadas con aislados de scrapie (Pattison and Millson, 1961b). Aunque estos estudios demostraron que la barrera existente entre ciertas especies podía ser superada al menos en condiciones de laboratorio, la naturaleza no tardó en demostrar que también podía darse sin intervención humana, con la aparición de enfermedades priónicas animales que podían afectar a especies distintas de las originarias. Un ejemplo de ello fue la TME (Hartsough and Burger, 1965), cuyo origen sigue siendo tema de debate entre la comunidad científica, aunque todo apunta a que los brotes ocurridos en Wisconsin fueron debidos a la alimentación de visones con piensos y carnes contaminadas con proteínas animales. En aquel caso, los animales nunca fueron alimentados con piensos de origen ovino, pero sí con alimentos que contenían proteínas de vaca y caballo (Marsh et al., 1991). Otro ejemplo de origen incierto es la CWD, que apareció en ciervos mula cautivos en unas instalaciones de Colorado (Estados Unidos) en las que existían casos de scrapie en ovejas en el momento de la detección de los primeros casos (Williams and Young, 1980). Aunque ninguna de estas enfermedades ha demostrado la capacidad de cruzar la barrera de especie a humanos hasta la fecha, la EET popularmente llamada “mal de las vacas locas”, supuso la demostración definitiva de la capacidad zoonótica de los priones causando una grave crisis epidemiológica a finales del siglo pasado. La Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE), fue descrita por primera vez en una granja del sur de Inglaterra en 1985, cuando nueve vacas mostraron los mismos signos clínicos en tan solo un año. El análisis histopatológico de los cerebros de estos animales mostró una gran similitud con los afectados por scrapie, sugiriendo un origen común que ha sido recientemente respaldado por investigaciones que apuntan a una cepa atípica de scrapie (Nor98) como responsable de la aparición de BSE, ejemplificando la estrecha relación entre los conceptos de cepa y barrera de transmisión (Pattison, 1998, Huor et al., 2019). Independientemente de su origen, la razón de que dicha enfermedad se detectase a partir de 1985 en Reino Unido fue consecuencia de los cambios producidos en los piensos para alimentar al ganado bovino (MBM, del inglés, *meat-bone-meal*). En primer lugar, el uso de estos piensos fabricados a partir de harinas cárnicas pasó del 0% en 1972 al 75% en 1988. Este cambio, aunque gradual, fue sumado a la abrupta disminución del uso de solventes en el proceso de extracción para abaratar los costes de producción, pasando de un 100% a un 50% entre 1980 y 1983 (Schreuder, 1994). Como consecuencia de la irrupción de esta enfermedad bovina y con intención de proteger la salud pública, en 1989 se prohibió tanto el uso de harinas cárnicas procedentes de rumiantes para alimentar a rumiantes como la inclusión de tejidos de ganado bovino con alta carga del agente causal. Estas medidas resultaron tardías ya que poco después, alrededor de 1995, se diagnosticó el primer caso de vCJD en un adolescente británico y al año siguiente, aparecieron cuatro casos en pacientes más en jóvenes que mostraban una patología atípica. La juventud de los individuos afectados, junto al largo periodo de incubación y las diferencias histopatológicas con la CJD clásica, llevaron a que esta nueva versión se denominase variante de la enfermedad de Creutzfeldt-

Jakob (vCJD) y pudiese ser relacionada etiológicamente con la BSE (Scott et al., 1999). Esta cepa priónica bovina superó otras barreras de especie aparte de la humana, destacando la aparición de la Encefalopatía Espongiforme de Ungulados Exóticos en rumiantes exóticos de la familia *Bovidae* en zoológicos británicos durante el periodo de actividad de la BSE (Kirkwood et al., 1990). En esa misma época se reportaron, además, los primeros casos de FSE, que se distribuyeron en el Reino Unido desde 1990 hasta 2000, coincidiendo con la disminución de casos de BSE. Las similitudes bioquímicas e histopatológicas apoyaron a que pudo ser otro caso de superación de la barrera entre especies, y que la BSE se transmitió a los gatos domésticos a través de productos alimenticios contaminados, tal y como apoya la detección de casos en otras especies de la familia *Felidae* que consumieron carne de origen bovino en el Reino Unido (Imran and Mahmood, 2011, Ryder et al., 2001).

Aunque los fenómenos de barrera de transmisión y cepa comenzaron a estudiarse en primates, ovejas y cabras, muy pronto se intentó transmitir estos aislados naturales de priones a animales de experimentación más manejables. Ejemplo de ello fue la adaptación a ratones, de forma casi paralela, tanto de un aislado natural de scrapie de oveja Suffolk como el aislado de cabra *drowsy*, dando lugar dos de las cepas murinas más utilizadas en la actualidad, las cepas ME7 (Zlotnik and Rennie, 1963) y RML respectivamente (Chandler and Fisher, 1963). Estas cepas murinas comenzaron a utilizarse para evaluar de forma empírica las barreras existentes en otros animales, incluyendo ratas, cobayas, conejos y hámsteres sirios. Fue de esta manera como se generó en hámster sirio otra de las cepas más utilizadas en el campo de los priones, el scrapie 263K, previa adaptación mediante pases seriados en rata (Barlow and Rennie, 1976, Kimberlin and Walker, 1977). El hámster sirio pasó a ser un modelo muy utilizado, como demuestra también la adaptación en dicho roedor de dos cepas originadas en el brote de TME de Wisconsin de 1985 mencionado anteriormente. Tras su inoculación se observó cómo algunos hámsteres mostraban una sintomatología nerviosa y de alta excitabilidad, mientras que otros adoptaban un comportamiento letárgico y de baja actividad. Estos dos comportamientos, muy similares en su descripción a los observados por Pattison y Millson en ovejas, fueron mantenidos mediante inoculaciones seriadas en hámsteres hasta dar lugar a dos de las cepas más estudiadas en el campo de los priones (denominadas en inglés *Hyper* y *Drowsy*), que mostraron diferentes comportamientos atendiendo a su coeficiente de sedimentación y a su resistencia al tratamiento con agentes desnaturizantes (Bessen and Marsh, 1992a, Bessen and Marsh, 1992b). Hasta este momento, las cepas priónicas se habían distinguido únicamente por sus propiedades biológicas, por lo que la utilización de técnicas biofísicas y bioquímicas que permitían diferencias dichas cepas gracias a características bioquímicas como su movilidad electroforética y su resistencia al tratamiento con PK supuso un gran avance (Bessen and Marsh, 1994). A pesar de su origen común y de su secuencia aminoacídica idéntica, estos dos aislados eran claramente distintos, fenómeno que los autores

atribuyeron por primera vez a posibles diferencias estructurales entre ambas cepas. Sin embargo, en esos momentos el campo de los priones centraba sus esfuerzos en demostrar que la barrera de especie residía principalmente en las diferencias existentes en la estructura primaria de la PrP de dos especies. La presencia de polimorfismos naturales en la PrP de una misma especie fue utilizada por los investigadores para señalar la importancia de la secuencia en la transmisibilidad entre especies. Este es el caso de la distinta susceptibilidad que presentan los ratones de genotipo *a* y genotipo *b*, cuyas PrP difieren en dos residuos aminoacídicos y muestran tiempos de incubación dispares en función de la cepa priónica inoculada (Carlson et al., 1988), o los diversos polimorfismos que aparecen en las secuencias de PrP ovina y que suponen una mayor o menor susceptibilidad a la infección por scrapie clásico, siendo los ejemplares con el polimorfismo VRQ (Val136 – Arg154 – Gln171) más susceptibles a la enfermedad y los que expresan el ARR más resistente (Ala136 – Arg154 – Arg171) (Goldmann et al., 1994). Este tipo de variaciones polimórficas se han descrito en una amplia variedad de mamíferos (Goldmann, 2008), siendo de especial interés la diferente susceptibilidad en humanos a padecer CJD, tanto en su forma esporádica como en su variante adquirida, en función del polimorfismo del residuo 129 de la PrP (Palmer et al., 1991, Collinge, 2001).

La generación de ratones transgénicos que expresaban una PrP exógena sirvió para desarrollar numerosas investigaciones que apoyaban la existencia de una barrera polimórfica que regía la transmisión entre ciertas especies. Algunos de estos estudios confirmaron barreras polimórficas previamente descritas, como la relación entre la diferente susceptibilidad a scrapie ovino y ciertas posiciones de la PrP de oveja (Laude et al., 2002) o para comprender otras como la existente entre hámster y ratón (Lowenstein et al., 1990). Estos enfoques fueron más versátiles, como los experimentos realizados con ratones que expresaban la PrP de hámster manteniendo la expresión de la PrP endógena murina. Estos estudios de coexpresión demostraron que se formaban agregados de PrP^{Sc} de ratón cuando se inoculaban priones murinos y agregados de PrP^{Sc} de hámster cuando los ratones recibían priones de hámster (Prusiner et al., 1990). Esta observación llevó a la generación de animales transgénicos que expresaban distintas PrP quiméricas, compuestas de partes concretas de la PrP de ratón y de hámster. Gracias a estos animales observaron que los ratones que diferían más en su secuencia respecto a la original de ratón eran más susceptibles a los priones de hámster, pudiendo señalar incluso posiciones concretas de posible interés dentro de la estructura primaria (Scott et al., 1993). Estas observaciones llevaron a establecer la importancia que la secuencia de la PrP hospedadora tenía en la susceptibilidad a EET, pero también que la adquisición de nuevas propiedades por parte de la cepa puede ocurrir tras superar ciertas barreras de transmisión. Un ejemplo de alteración de propiedades se encontró durante la adaptación a través de inoculaciones seriadas de la CWD de cérvidos en hurones. Los priones de cérvido no son capaces de infectar de forma directa a los

hámsteres, pero sí tras su adaptación en hurón mediante pases seriados, donde los períodos de incubación van acortándose hasta alcanzar una estabilización (Bartz et al., 1998). El estudio *in vivo* de estos fenómenos de adaptación se ha visto facilitado desde que la PrP^C del topillo rojo (*Myodes glareolus* o en inglés, *Bank vole*) fue propuesta como la proteína aceptora universal de priones, lo que hace que ratones transgénicos que sobreexpresan la PrP^C de esta especie sean susceptibles a una amplia variedad de aislados priónicos procedentes de diferentes especies (Figura 7 b) (Watts et al., 2014).

Con el objetivo de estudiar el fenómeno de barrera de transmisión de forma más rápida que mediante el uso de animales transgénicos, algunos laboratorios desarrollaron sistemas basados en células. Aunque estos resultaron ser difíciles de implementar como modelos persistentemente infectados por priones y, además, no permitían la propagación de todo tipo de priones, sirvieron para adaptar algunas cepas priónicas y seleccionarlas *in vitro* (Mahal et al., 2007). Finalmente, se pudieron estabilizar las características de priones adaptados a células y diferenciarlas de las características de priones adaptados a cerebro, observando la aparición de una "selección darwiniana" que parecía regir la transición de una cepa a otra. Aplicando el concepto de cuasi-especies propuesto por Collinge (Collinge and Clarke, 2007), determinaron que un cambio de condiciones puede dar como resultado a la selección de una nueva variante que adquiriera diferentes características y cuyo comportamiento ante la barrera de transmisión sea completamente distinto (Figura 7 a) (Li et al., 2010).

Por tanto, aunque sigan utilizándose, los modelos celulares presentan ciertas dificultades para su uso en el estudio de la barrera de transmisión. Posteriormente comenzaron a utilizarse ensayos libres de células para estudiar el fenómeno de barrera de transmisión, adaptando inicialmente dos cepas clásicas de hámster con distintas propiedades a proteína recombinante de hámster y distinguiendo mediante pruebas bioquímicas la cepa HY (del inglés *Hyper*) de la DY (del inglés *Drowsy*) (Bessen et al., 1995). A medida que este tipo de modelos *in vitro* fueron desarrollándose, muchas investigaciones se centraron en la barrera existente entre ratones y hámsteres, previamente estudiada *in vivo* y donde encontraron tres aminoácidos candidatos a ser críticos para la barrera entre estas dos especies (Kocisko et al., 1995). La aparición de la PMCA, otra técnica que supuso una gran mejora en la propagación de priones *in vitro*, permitió mantener *in vitro* las propiedades de las cepas adaptadas, resultando una herramienta muy útil para el estudio de la barrera de transmisión (Fernandez-Borges et al., 2009). Esta metodología permitió ampliar el conocimiento de barreras previamente testadas, como la existente entre hámster y ratón (Castilla et al., 2008) o estudiar otras nuevas, como fue el caso de la adaptación cepas murinas a PrP de cérvido (Green et al., 2008).

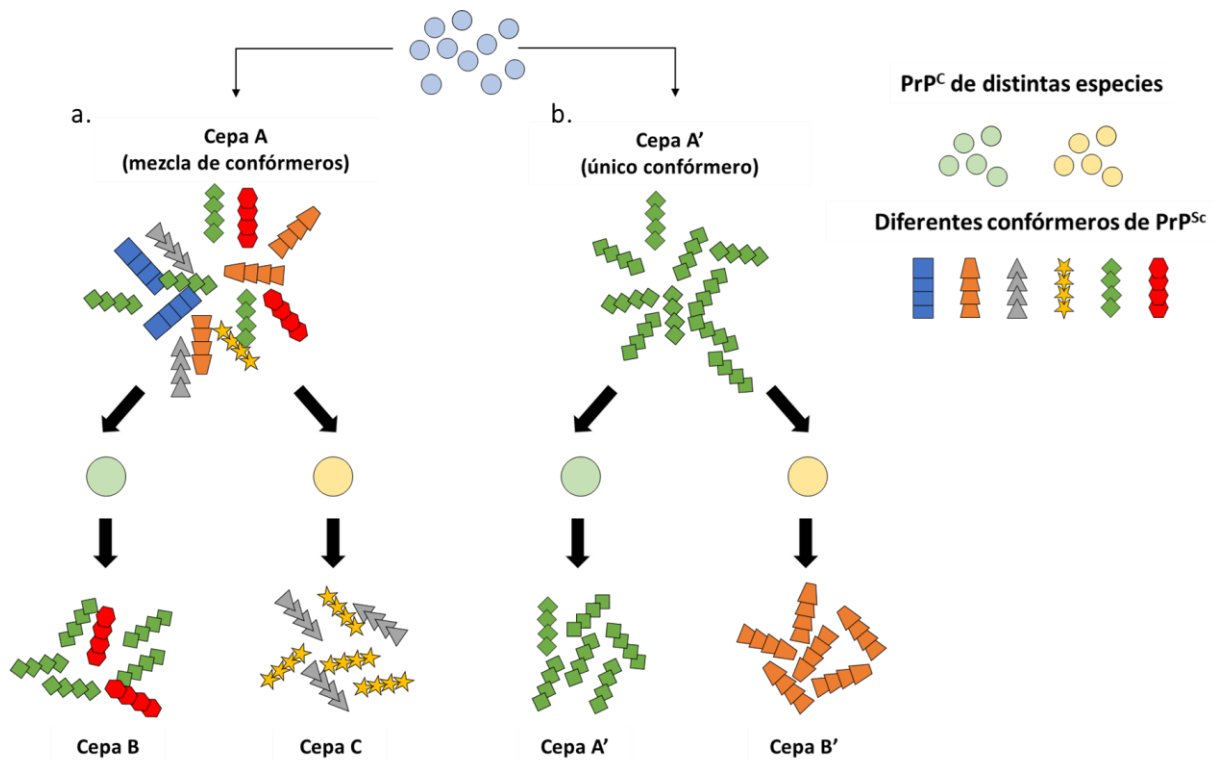


Figura 7. Modelos de emersión de nuevas cepas priónicas tras la superación de barreras de transmisión. a) Fenómeno de selección. Ante una mezcla de conformómeros inicial que constituyen la cepa A, la propagación a expensas de PrP^C diferentes podría modificar las proporciones de conformómeros iniciales llevando a nuevas mezclas de cuasi-especies que se encontraban en minoría y dando lugar a cepas nuevas con distintas características respecto a la cepa original. **b)** Fenómeno de adaptación. Ante una cepa priónica constituida por un único conformómero, la propagación a expensas de PrP^C distintas podría darse una modificación conformacional en el nuevo hospedador, dando como resultado la adquisición de nuevas características o bien el mantenimiento de sus propiedades bioquímicas y biológicas iniciales si la PrP^C del nuevo hospedador puede acomodar la estructura del conformómero original. Cabe destacar que los procesos de adaptación y selección no son mutuamente excluyentes y por tanto podrían darse de forma conjunta en el caso de que las cepas estuviesen constituidas por mezclas de conformómeros. Basado en (Collinge and Clarke, 2007).

La necesidad de otras técnicas que ayuden a interpretar el conocimiento acerca de la barrera de transmisión y el fenómeno de cepa obtenido *in vivo* e *in vitro*, ha llevado al auge en los últimos años de los modelos de estudio *in silico*. Basándose en observaciones experimentales recogidas a lo largo de décadas, estos estudios computacionales suponen un gran avance en el estudio de las barreras de transmisión, ya que podrían ayudar a identificar regiones concretas de la PrP que, al sufrir cambios estructurales, provocasen una variación en sus propiedades, permitiendo localizar los hipotéticos orígenes de distintas cepas priónicas y comprender los mecanismos moleculares subyacentes. Algunos estudios filogenéticos sirvieron para apoyar el origen común de la BSE y la vCJD, identificando el antecesor común entre homínidos y vaca (Krakauer et al., 1996). Las secuencias de estas dos especies, comparadas con las de otros muchos mamíferos demostraron una gran similitud, aunque también revelaron que algunas regiones del extremo C-terminal permitían la presencia de numerosos cambios puntuales (Wopfner et al., 1999). Dichos cambios se concentran en determinadas regiones como en el

lazo que separa la lámina- $\beta 2$ de la hélice- $\alpha 2$ ($\beta 2$ - $\alpha 2$), y apuntan a esta región como una zona de alta diversidad de secuencia para cérvidos (Gossert et al., 2005), equinos (Perez et al., 2010) y lepóridos (Vorberg et al., 2003), pudiendo ser clave en la barrera entre especies (Billeter et al., 1997). El uso coordinado de modelos *in silico* e *in vivo* para determinar las propiedades que rigen la transmisión entre especies resulta fundamental ya que ambos enfoques pueden resultar complementarios. La resolución estructural de las PrP^C de otras especies permitió identificar en la región $\beta 2$ - $\alpha 2$, cuatro aminoácidos cargados que diferían entre la PrP felina y la de los cánidos, pudiendo encontrarse en dichos cambios la resistencia de los perros a sufrir BSE (Lysek et al., 2005), como posteriormente se confirmó con estudios *in vitro* e *in vivo* que apuntaban a la presencia de ácido glutámico en la posición 163 de su secuencia (Fernandez-Borges et al., 2017c, Vidal et al., 2020). Encontramos un ejemplo similar en la PrP^C de conejo, donde la combinación de estudios de RMN (Wen et al., 2010a, Wen et al., 2010b) e investigaciones *in vitro*, permitió señalar regiones clave responsables de la baja susceptibilidad de esta especie a la enfermedad por priones (Erana et al., 2017).

Estos estudios plasman la importancia de combinar distintos enfoques para comprender mejor los fenómenos tan complejos de cepa y de barrera de transmisión. Ambos conceptos han sido estudiados hasta ahora de forma empírica, generando conocimiento experimental a lo largo de las décadas. Estas investigaciones han conducido a la revisión del concepto original de barrera de especie, centrado únicamente en las diferencias puntuales aminoacídicas, para redefinirlo como barrera de transmisión, término más completo que hace referencia a la compatibilidad estructural entre PrP^{Sc} y PrP^C. Este fenómeno hace referencia a un proceso que aún desconocemos a nivel molecular que está codificado en parte en la estructura tridimensional de cada PrP^{Sc}, conformación que hasta ahora permanece desconocida para la comunidad científica. A su vez, la heterogeneidad mostrada por la PrP^{Sc} se traduce en la existencia de diferentes cepas priónicas, que pueden adquirir potencialmente nuevas propiedades y dificultar el estudio de estos fenómenos. Este escenario hace completamente necesario el desarrollo de nuevos sistemas que permitan un estudio robusto del fenómeno de malplegamiento de la PrP^C y su relación con el surgimiento de cepas priónicas capaces de superar distintas barreras de transmisión.

5. Modelos experimentales para la propagación y el estudio de priones

Uno de los mayores retos en el campo de la investigación priónica es la obtención de sistemas y modelos que mimeticen fielmente las características de las enfermedades priónicas. Como hemos mencionado con anterioridad, los primeros modelos utilizados para investigar las EET fueron primates (Gajdusek et al., 1966) y pequeños rumiantes como ovejas y cabras (Pattison and Millson, 1961b). Sin embargo, debido a los largos periodos de incubación, los costes de manutención y otras razones éticas, la experimentación con este tipo de mamíferos empezó a reducirse surgiendo otros modelos como alternativa. El desarrollo de ratones transgénicos marcó un antes y un después en el campo de los priones, facilitando todos los estudios relacionados con la transmisión de estos agentes, particularmente desde la irrupción del topillo rojo (*Bank vole*) como receptor universal de EET (Watts et al., 2014). A pesar del avance que supuso el uso de ratones transgénicos, las enfermedades priónicas presentan largos periodos de incubación, lo que dificulta su estudio *in vivo*. Con el objetivo de estudiar este fenómeno de transmisión de forma más rápida que mediante el uso de animales transgénicos, algunos laboratorios desarrollaron sistemas basados en cultivos celulares. Desde la infección exitosa de la línea celular de neuroblastomas de ratón N2a con la cepa priónica murina RML (Race et al., 1987), surgieron diversos enfoques destinados a resolver algunos de los enigmas que rodean a las EET. De esta manera muchas investigaciones se centraron en estudiar el fenómeno de barrera de transmisión (Priola and Chesebro, 1995), la propagación de diferentes cepas en cultivos celulares (Priola, 2018), los mecanismos que participan en la propagación y neurotoxicidad de los priones (Krauss and Vorberg, 2013) o el testado de compuestos con actividad anti-priónica (Barret et al., 2003).

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

5.1. Primeros métodos de propagación de priones *in vitro*

Con el objetivo de eliminar la variabilidad que presentaban los cultivos celulares y superar limitaciones como la imposibilidad de utilizar diferentes cepas priónicas, comenzaron a desarrollarse sistemas *in vitro* que mimetizaban el proceso de malplegamiento que ocurre *in vivo*. El primero de estos sistemas fue el ensayo de conversión libre de células (del inglés, *cell-free conversion assay*), desarrollado por Caughey y colaboradores a principios de los noventa, basándose en la purificación de PrP^C y PrP^{Sc} a partir de cultivos celulares y encéfalos de animales infectados respectivamente. Tras el marcaje radioactivo de la PrP^C, esta se ponía en contacto con PrP^{Sc} previamente desnaturalizada y re-naturalizada y se inducía su malplegamiento (Kocisko et al., 1994). Esta técnica fue un gran apoyo a la hipótesis “solo proteína” y facilitó las investigaciones sobre la barrera de transmisión, la especificidad de cepa (Bessen et al., 1995) y el mecanismo de acción de distintos compuestos con acción anti-priónica (Caughey et al., 1998b). Sin embargo, las principales desventajas de esta técnica eran, la laboriosa obtención de PrP^C y PrP^{Sc} purificadas, la necesidad de grandes cantidades de estas y su bajo rendimiento a la hora de malplegar PrP^C, obteniendo además productos no infecciosos que no podían ser considerados como priones *bona fide* (Hill et al., 1999).

Años más tarde, este mismo grupo de investigadores desarrolló la técnica de conversión inducida por agitación en tiempo real (RT-QuIC, del inglés *Real Time – Quaking Induced Conversion*). Este método *in vitro* utiliza agitación como fuente de energía, proteína recombinante y Tioflavina T (ThT, del inglés *Thioflavine T*), compuesto cuya intensidad de fluorescencia aumenta al unirse a amiloides, permitiendo monitorizar la formación de este tipo de fibras en tiempo real (Wilham et al., 2010). Es una técnica extremadamente sensible y rápida, lo que la convierte en el sistema idóneo para la detección de priones en todo tipo de muestras biológicas, como líquido cefalorraquídeo (McGuire et al., 2016) u orina (John et al., 2013) entre otros (Orru et al., 2014, Erana et al., 2020a). Además de su alta sensibilidad, su especificidad cercana al 100% hace que su uso sea cada vez más frecuente en la práctica clínica como herramienta diagnóstica, no solo para EET, sino que está extendiéndose a la detección de otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el malplegamiento proteico (Saijo et al., 2019). No obstante, aunque se trata de una importante herramienta para la detección de priones y para el diagnóstico de enfermedades priónicas, las fibras amiloides producidas no son infecciosas, lo que limita la utilidad de la técnica para otro tipo de estudios de infectividad o estructurales (Atarashi et al., 2008).

5.2. Amplificación cíclica de proteínas malplegadas: PMCA

Los esfuerzos por mejorar el ensayo de conversión libre de células y conseguir un sistema *in vitro* capaz de malplegar PrP^C a partir de PrP^{Sc}, condujeron al desarrollo de una nueva técnica capaz de obtener priones *bona fide* mediante el uso de sonicación. Esta demostración supuso el desarrollo de la técnica PMCA (de sus siglas en inglés, *Protein Misfolding Cyclic Amplification*), la cual se basa en el principio de polimerización dependiente de nucleación para la propagación de amiloides (Saborio et al., 2001). A nivel conceptual, la PMCA se asemeja a la técnica de la PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*), donde a partir de una hebra de DNA molde se pueden obtener millones de copias idénticas gracias a una reacción en cadena que ocurre cíclicamente. La PMCA es una técnica similar, cuyo objetivo es la amplificación de priones utilizando proteína en lugar de ácidos nucleicos como en el caso de la PCR. Esta técnica consta de una primera fase de incubación en la que una pequeña cantidad de PrP^{Sc} o semilla entra en contacto con un exceso de PrP^C encefálica, que hace las veces de sustrato y se malpliega dando lugar a nuevas moléculas de PrP^{Sc}, que van siendo reclutadas por las fibras de PrP^{Sc} hasta formar agregados. En la siguiente fase, se aplica un ciclo de sonicación mediante ultrasonidos que se cree que fragmenta las fibras amiloides de PrP^{Sc} formadas, posiblemente favoreciendo la aparición de nuevos centros de nucleación disponibles para la siguiente fase de incubación. La cantidad inicial de PrP^{Sc} se ve aumentada de forma exponencial a medida que se suceden los ciclos de incubación y sonicación, mimetizando *in vitro* con una cinética acelerada el proceso de malplegamiento y propagación que ocurre *in vivo* (Saa et al., 2005). De esta manera, cantidades de PrP^{Sc} que son indetectables por métodos bioquímicos clásicos como el *Western blot*, pueden ser amplificadas mediante esta técnica y ser fácilmente detectadas posteriormente. Esto ha hecho de la PMCA una herramienta extremadamente sensible que ha resultado en un avance muy relevante en el campo de los priones por sus potenciales usos (Telling, 2001). La PMCA es capaz de mimetizar las propiedades fundamentales de la propagación priónica que ocurren *in vivo*, reproduciendo las características determinantes de las distintas cepas de priones *in vitro*. Así, la nueva PrP^{Sc} generada mediante PMCA conserva las propiedades bioquímicas y biológicas de la semilla de PrP^{Sc} inicial, destacando su infectividad *in vivo* (Castilla et al., 2005). Esta capacidad de replicar las principales cepas priónicas en un sistema *in vitro* de forma rápida, ha sido ampliamente explotada para estudiar la barrera de transmisión existente entre los roedores más utilizados como modelos de investigación (Castilla et al., 2008), pero también en especies de mayor impacto socioeconómico (Meyerett et al., 2008, Kurt et al., 2007) y para desentrañar los mecanismos que rigen la resistencia a infección por priones de ciertas especies (Erana et al., 2017, Vidal et al., 2020). Sin embargo, se ha observado que la PMCA es capaz de superar algunas barreras infranqueables experimentalmente *in vivo*, ni siquiera mediante el uso de ratones transgénicos que sobre expresan PrP (Sigurdson et al., 2006). Por tanto, los resultados

obtenidos con este sistema deben evaluarse cuidadosamente y complementarse con otro tipo de estudios para conseguir una mejor comprensión de las barreras de transmisión. Además, la PMCA ha sido utilizada para la generación de muestras para realizar estudios estructurales (Sevillano et al., 2018), evaluar la efectividad de ciertos compuestos con capacidad anti-priónica (Nicoll et al., 2010) o investigar el papel de los cofactores en la propagación priónica (Fernandez-Borges et al., 2017a), entre otras aplicaciones. Sin embargo, el propósito inicial de la PMCA fue la de servir como técnica de diagnóstico de las EET debido a su alta sensibilidad, lo que hacía de ella una herramienta propicia para tratar de detectar PrP^{Sc} en todo tipo de fluidos corporales (Saa et al., 2006). El posterior desarrollo de la técnica de RT-QuIC relegó a la PMCA como método de diagnóstico, debido entre otros a su menor complejidad técnica. No obstante, la PMCA sigue manteniéndose como una de las principales herramientas de investigación en el campo de los priones actualmente.

La PMCA experimentó un importante cambio con su adaptación a proteína recombinante, pasando de utilizar PrP^C purificada de cultivos celulares o encéfalos, como sustrato de la reacción, a PrP recombinante (rec-PrP) purificada de *E. Coli*. Esta nueva variante de la PMCA (PMCA recombinante o rec-PMCA) contribuyó a reforzar la hipótesis “solo proteína”, consiguiéndose priones infecciosos utilizando sustratos basados exclusivamente en PrP recombinante, sin la necesidad de ningún componente de origen encefálico (Kim et al., 2010). A pesar de las características diferenciales entre la rec-PrP y la PrP^C de mamíferos, como la ausencia de glicosilaciones o la falta de anclaje GPI, se han conseguido priones sintéticos *bona fide* mediante el uso combinado de rec-PrP y PMCA. Sin embargo, estos priones pueden presentar propiedades biológicas heterogéneas, destacando una infectividad limitada en muchos casos, a pesar de utilizar procedimientos idénticos a otros que resultaron en priones recombinantes infecciosos (Priola and McNally, 2009). Esto ha conducido a la obtención, por parte de diferentes grupos de investigación, de distintos priones recombinantes con capacidad infecciosa, como los generados por Supattapone y colaboradores mediante PMCA en presencia de cofactores como el RNA (Deleault et al., 2003) o la fosfatidiletanolamina (Deleault et al., 2012a), o los producidos por Castilla y colaboradores utilizando cofactores variados como el dextrano (Fernandez-Borges et al., 2017a). Así, la PMCA ha demostrado que, aun con cierta variabilidad, es posible generar priones artificiales *in vitro* que presenten infectividad similar a los priones de mamíferos, facilitando así el estudio de las EET.

5.3. Amplificación de proteínas malplegadas por agitación: PMSA

Recientemente se ha desarrollado en nuestro laboratorio la técnica denominada amplificación de proteínas malplegadas por agitación (PMSA, del inglés *Protein Misfolding Shaking Amplification*)

(Erana et al., 2019). Esta técnica trata de combinar los puntos fuertes de los sistemas de propagación *in vitro* anteriores tratando de solventar sus principales limitaciones. Algunos de los problemas que presenta la PMCA son la necesidad de costosos y complejos equipos de sonicación, su limitada escalabilidad y la necesidad de emplear técnicas de *immunoblot* para la visualización de resultados. La posibilidad de sustituir la sonicación por agitación como fuente de energía ya fue aprovechada por la RT-QuIC, aunque al no dar lugar a priones *bona fide*, su utilidad se limita a la detección y diagnóstico de EET. Por otra parte, la falta de conocimiento de los eventos moleculares que tienen lugar durante la PMCA y a la dificultad de controlar los parámetros de sonicación, conduce a la generación de PrP^{res} con distintas propiedades biológicas, originando mezclas heterogéneas que pueden dificultar los estudios bioquímicos y estructurales (Wang et al., 2017).

Sin embargo, la novedosa técnica de PMSA supera estos problemas de complejidad, variabilidad, escalabilidad y dificultad de implementación, basándose en el uso de agitación en lugar de sonicación como fuente de energía (Ladner-Keay et al., 2014). La agitación se administra mediante el uso de sistemas *Thermomixer* o *Monoshake* de forma continua, a diferencia de los ciclos de sonicación/incubación que requiere la PMCA. Otra diferencia es la naturaleza del sustrato, compuesto únicamente por rec-PrP y dextrano sulfatado en un buffer de composición totalmente definida que contiene además detergentes y sales. El sistema requiere también del uso de partículas esféricas de zirconia – sílice de 1.0 mm para mejorar la eficiencia de la propagación, consiguiendo así que un prion recombinante *bona fide* de topillo rojo procedente de PMCA, se adapte a PMSA manteniendo sus características fundamentales. Por otro lado, la utilización de dextrano sulfatado como cofactor limita la generación de PrP^{res} estructuralmente heterogéneas, permitiendo por primera vez la generación de priones recombinantes altamente infecciosos y homogéneos respecto a los obtenidos mediante PMCA junto con homogenizados de encéfalo completos como fuente de cofactores. Este nuevo sistema podría ser, por tanto, clave para la obtención de material con las características necesarias para estudios estructurales mediante técnicas de alta resolución, aunque ya ha demostrado su alto valor en otros campos de la investigación, permitiendo el testado masivo de bibliotecas de compuestos con posible actividad anti-priónica (Charco, 2018, González-Miranda, 2020) o la evaluación de diferentes métodos de descontaminación de priones de forma rápida y segura (Erana et al., 2020b). Las posibilidades de esta técnica de reciente desarrollo podrían ser numerosas y requieren de una mayor exploración, lo que hace que sea el sistema más utilizado a lo largo de esta tesis doctoral, donde explotaremos sus características para generar distintos priones recombinantes *bona fide*, comprender mejor el fenómeno de cepa y aportar información acerca del evento de malplegamiento espontáneo que tiene lugar en las EET.

6. Malplegamiento espontáneo de la PrP y su relevancia en las enfermedades priónicas

La conversión de PrP^C a PrP^{Sc} de manera espontánea es posiblemente la mayor incógnita en el campo de los priones, pues es responsable de la aparición de las EET esporádicas (putativamente espontáneas) que suponen la mayoría de los casos de prionopatías en humanos (Ironsides et al., 2017). Un mejor conocimiento acerca de los mecanismos moleculares que desencadenan este malplegamiento de manera espontánea, constituiría un gran avance a la hora de comprender la etiología de este tipo de EET.

Aunque algunas de las EET esporádicas han sido descritas durante las últimas décadas, como es el caso del sFI (Mastrianni et al., 1999) o de la VPSPr (Gambetti et al., 2008), el carácter espontáneo de las prionopatías se conoce desde mucho antes. Desde el descubrimiento de los primeros casos de CJD en la década de 1920 (Creutzfeldt, 1920, Jakob, 1921), los casos de sCJD se han convertido en la EET más frecuente en humanos. Esta variante presenta una incidencia anual cercana a los dos casos por millón de habitantes al año, es muy poco común entre la población joven y ligeramente más frecuente en mujeres que en hombres, presentando en ambos casos una duración de la enfermedad muy variable (Zerr and Parchi, 2018). Esta variabilidad tanto en la aparición de los primeros síntomas como en la duración de la enfermedad, viene acompañada además de una heterogeneidad clínica que ha supuesto un reto a la hora de clasificar los múltiples subtipos de esta patología (Parchi et al., 2012). Esto sugiere la existencia de diferentes tipos de malplegamientos, que podrían generarse de manera espontánea y originar diversas cepas, que serían las responsables últimas de la heterogeneidad observada en la sCJD (Hill et al., 2003). Este fenómeno de heterogeneidad, sumado a la baja incidencia que presenta este tipo de patologías, dificulta el estudio de la enfermedad priónica esporádica en humanos. Este problema se traslada a las EET en otros mamíferos, donde la frecuencia de aparición espontánea en animales como la oveja es igualmente baja, tanto por su incidencia como por problemas de diagnóstico adicionales (Ghergariu, 1991). La falta de casos esporádicos en animales de experimentación más comúnmente utilizados en el laboratorio, como ratones o hámsteres, imposibilita el estudio de esta variante de la enfermedad en modelos WT *in vivo*. Con el objetivo de superar esta limitación, se han generado modelos murinos transgénicos que desarrollan una EET sin necesidad de ser inoculados, permitiendo así el estudio detallado del proceso de malplegamiento sin la intervención de un agente infeccioso exógeno. Sin embargo, todos estos modelos se basaban en la inclusión de mutaciones patogénicas, como la presencia del cambio P102L que mimetiza el GSS (Hsiao et al., 1991) o la combinación de valina en la posición 129 y la sustitución D178N que mimetizaba la enfermedad de FFI (Dossena et al., 2008). Son tan solo algunos ejemplos de la enorme variedad de modelos murinos transgénicos que mimetizan EET en diferentes especies a través de la adición de

mutaciones (Brandner and Jaunmuktane, 2017). En todos los casos, la conversión espontánea de PrP^C a PrP^{Sc} ocurre irremediamente como consecuencia de la presencia de una mutación en el gen *PRNP* por lo que únicamente mimetiza la parte de espontaneidad de las enfermedades priónicas esporádicas. A pesar de que estos animales no necesitan ser inoculados con priones externos, no son considerados los modelos más adecuados para estudiar el evento de malplegamiento, ya que los mecanismos que disparan la conversión podrían ser ligeramente diferentes en una ETT genética que en las variantes esporádicas.

El desarrollo de los sistemas de propagación *in vitro*, solventaban el problema de la baja frecuencia de aparición de la enfermedad esporádica en la naturaleza y supusieron nuevas oportunidades de estudio para el proceso de espontaneidad. Los primeros métodos de conversión fueron sistemas basados en células, donde en algunos casos se observaron eventos de espontaneidad inesperados. Un ejemplo de ello fue la observación, por parte de Collinge y colaboradores, de priones generados espontáneamente en los controles negativos de cultivos celulares mientras testaban la capacidad del scrapie para unirse a materiales metálicos. Estos controles negativos eran varillas metálicas que habían sido recubiertas con homogeneizado cerebral de ratones no infectados, dando lugar a priones capaces de inducir enfermedad experimental en ratones transgénicos (Edgeworth et al., 2010). El hecho de que podían existir agregados de PrP^{res} en el cerebro de roedores no infectados (Yuan et al., 2006), sembró la duda de que dichos priones fueran producto de una contaminación, teniendo en cuenta que se trabajaba con scrapie de forma paralela. De la misma manera, se había reportado la aparición espontánea del fenotipo *[PSI⁺]* en levaduras, asociado a la acumulación de la forma malplegada de la proteína Sup35, un prion de levadura (Lancaster et al., 2010). La búsqueda de priones generados *in vitro* de manera espontánea y de las formas de ejercer cierto control sobre este evento se ampliaron con el uso de rec-PrP, lo que permitía un mejor control de los factores implicados en la reacción. Fue así como Legname y colaboradores obtuvieron priones sintéticos que mostraban infectividad *in vivo*, aunque solo en animales que sobreexpresaban PrP^C murina y mostrando además largos periodos de incubación (Legname et al., 2004). Estas fibras, generadas *de novo* mediante incubación con agitación durante varios días, no pueden ser consideradas como priones *bona fide*, ya que no demostraron una infectividad real en un modelo WT y puede que únicamente acelerasen la aparición de la patología propia de un modelo de sobreexpresión. El primer dato de generación espontánea de un prion infeccioso *in vitro* llegó de nuevo de forma inesperada de la mano de Supattapone y colaboradores, que observaron la aparición de PrP^{res} en los controles negativos tras 10 rondas de PMCA (Deleault et al., 2007). Estas muestras únicamente contenían PrP^C purificada a partir de homogeneizados de cerebros de hámster y RNA, un cofactor que parecía ser esencial para la aparición de espontaneidad. Los priones generados resultaron ser infecciosos en hámsteres WT, y

desarrollaban una clínica similar a aquellos hámsteres inoculados con cepas de scrapie clásicas, aunque presentaron un periodo de incubación más largo que el habitual (Kimberlin and Walker, 1977). Según estos autores, la presencia de polianiones y lípidos favorece la conversión a PrP^{Sc}, hecho que verificaron mediante la repetición del experimento en un laboratorio no utilizado anteriormente para la investigación de priones, reduciendo la posibilidad de que sus resultados previos se debieran a contaminaciones. Más tarde otros autores generaron priones infecciosos de manera similar utilizando directamente homogeneizado de cerebro como sustrato, observando que la nueva cepa de priones era distinta de las cepas clásicas conocidas (Barria et al., 2009). Pese a que, en ambos casos, los priones creados *de novo* a partir de PrP^C purificada o directamente con homogeneizado cerebral, eran infecciosos en un modelo WT, la heterogeneidad de la fuente de PrP no permitía controlar qué tipo de malplegamiento estaba ocurriendo, dando lugar a productos que necesitaban de múltiples cofactores, poco aptos para estudios estructurales con técnicas de alta resolución. Por otra parte, y aunque la contaminación quedó descartada, la necesidad de más de diez rondas de PMCA para obtener PrP^{res} lo convertía en un método de difícil reproducibilidad, puesto que cada ciclo de incubación/sonicación suponía la incorporación de más PrP^C o de homogeneizado cerebral que podrían conducir a que posibles monómeros de PrP^{res} generados en la ronda anterior indujeran distintos tipos de malplegamiento cada vez. Es por este motivo por lo que algunos autores volvieron al uso de proteína recombinante, como es el caso de las numerosas investigaciones dirigidas por Baskakov y colaboradores. Este grupo retomó el uso de proteína recombinante de hámster sirio y una técnica similar a la utilizada por Legname y colaboradores en 2004 con la que, alternando ciclos de incubación y agitación durante días, obtenían unas fibras recombinantes de PrP^{res} cuyos monómeros mostraban un tamaño de aproximadamente 16 kDa tras su tratamiento con proteasas. Estas fibras recombinantes eran posteriormente sometidas a un proceso de moldeado (al que los autores se refieren como *annealing* o *templating*), en el que la rec-PrP se incubaba junto a homogeneizado de cerebro de hámster silvestre durante un corto periodo de tiempo en el que se alternaban ciclos de baja y alta temperatura (Makarava et al., 2010). El producto de dicho moldeado resultó ser infeccioso en hámsteres WT, aunque se requirió de un segundo pase utilizando los encéfalos de los hámsteres inoculados con las fibras “moldeadas” para obtener una enfermedad de curso más suave y periodo de incubación más largo que con otras cepas priónicas clásicas. Aunque estos autores generan en un principio fibras recombinantes de PrP en un ambiente controlado, el proceso de moldeado que requieren posteriormente y que parece indispensable para que estas fibras adquieran su capacidad infectiva, hace que el producto final que se inocula *in vivo* no sea un prion recombinante con las características de un prion *bona fide*. Por esta razón, estas fibras recombinantes generadas son consideradas como fibras de PrP^{res} con algunas propiedades amiloidogénicas, pero resultan un modelo incompleto para estudiar el malplegamiento espontáneo de priones.

Tras los estudios desarrollados por Kim y colaboradores donde combinaban el uso de rec-PrP y PMCA para obtener priones recombinantes utilizando PrP^{Sc} encefálica como semilla (Kim et al., 2010), el grupo de Ma reportó la obtención del primer prion recombinante que, en presencia de RNA y lípidos, inducía una EET en ratones WT con periodos de incubación similares a los de las cepas clásicas (Wang et al., 2010). En este caso, los priones sintéticos fueron obtenidos tras 17 rondas de PMCA, por lo que a pesar de utilizar rec-PrP y componentes mínimos y definidos, una de las principales críticas que recibió este trabajo fue la posibilidad de una contaminación debido a la alta capacidad amplificadora de esta técnica (Castilla et al., 2005), así como la falta de reproducibilidad a la hora de conseguir infectividad *in vivo* en modelos WT, ya que otros grupos, siguiendo el mismo protocolo y tras obtener priones bioquímicamente idénticos, estos no fueron infecciosos *in vivo* (Timmes et al., 2013). Estos estudios reflejan cómo la técnica de PMCA puede no ser el mejor abordaje para la obtención robusta de priones *bona fide*, dado que esta técnica presenta gran dificultad para un control exhaustivo de los parámetros operativos, resultando en estocasticidad y obteniéndose en ocasiones variabilidad inter- e intra-experimental (Piening et al., 2005). Por ejemplo, el evento de sonicación causa una distribución desigual de la energía, dando lugar a fenómenos de cavitación y picos de altas temperaturas, así como la generación de radicales libres (Flint and Suslick, 1991, Mark et al., 1998). Por lo tanto, la degradación y la desnaturalización pueden limitar la utilidad de los productos resultantes de PMCA para estudios estructurales, lo que hace totalmente necesaria la generación de nuevas herramientas capaces de dar lugar a priones recombinantes *bona fide* de manera fácil, estable y en un ambiente controlado.

El descubrimiento del topillo rojo (*Bank vole*) como modelo de investigación para las enfermedades priónicas supuso una revolución en las aproximaciones que intentaban esclarecer el fenómeno de generación espontánea. El topillo rojo es un roedor de pequeño tamaño que presenta de forma natural un polimorfismo en la posición 109 de su PrP, que puede estar ocupada por una metionina (M109) o una isoleucina (I109). Esta especie resulta de especial interés en el campo de la investigación priónica desde que se constató su alta capacidad para propagar un gran número de priones. A modo de ejemplo, están los numerosos estudios que demostraron su inusitada susceptibilidad a aislados de diferentes especies, como el CJD (Nonno et al., 2006) o el scrapie (Piening et al., 2006) entre otros (Agrimi et al., 2008). Estos primeros experimentos repararon en que la presencia del genotipo I109 en la PrP del topillo rojo originaba periodos de incubación más cortos tras la inoculación de determinadas cepas priónicas (Di Bari et al., 2013). La inusual susceptibilidad de estos roedores a priones de diversos orígenes se atribuyó a la presencia de algún cofactor en sus cerebros que facilitaba la propagación de PrP^{Sc} o simplemente, a que la estructura primaria de su PrP^C era propensa al malplegamiento. Los ensayos *in vivo* utilizando ratones transgénicos que expresaban la PrP del topillo rojo despejaron todo tipo de dudas (Espinosa et al., 2016), señalando la importancia de

la secuencia aminoacídica del topillo rojo y presentándolo como el aceptor universal de priones (Watts et al., 2014). Esta característica ha llevado a su utilización como modelo para intentar mimetizar las principales EET que afectan a humanos, como la variante genética del CJD, el FFI o el GSS (Watts et al., 2016). La capacidad del topillo rojo para ser infectado por distintas cepas de priones también fue estudiada *in vitro*, además de mediante bioensayos. De esta manera en el año 2011, mientras se testaban diversas cepas clásicas mediante PMCA utilizando homogeneizados cerebrales de topillo rojo M109 e I109, se observó la aparición de PrP^{Sc} en los controles negativos de manera espontánea. Este inesperado fenómeno se observó en sustratos de ambos genotipos a partir de la segunda ronda de PMCA, aunque con el paso de los ciclos la frecuencia resultó mayor en el sustrato I109, sugiriendo por primera vez una posible conexión entre esta posición y el fenómeno de espontaneidad. Sin embargo, estos resultados se achacaron a una posible contaminación fruto de la enorme capacidad amplificadora de la PMCA (Cosseddu et al., 2011). Un año más tarde estos inesperados resultados cobraron sentido cuando el grupo de Prusiner describió que los ratones transgénicos que expresaban la PrP de topillo rojo con la presencia de isoleucina en la posición 109, desarrollaban una enfermedad espontánea con todas las características típicas de una EET. Los cerebros de dichos animales resultaron infecciosos cuando se utilizaron como inóculo para un nuevo grupo de ratones transgénicos con la PrP de topillo rojo, ratones que sobreexpresaban la PrP murina e incluso ratones WT (Watts et al., 2012). Por tanto, la expresión de isoleucina en la posición 109 parece ser fundamental para la generación espontánea de priones. Cabe destacar que el codón 109 del topillo rollo corresponde al residuo 108 de la PrP murina, que también es polimórfico e influye en la distinta susceptibilidad a la transmisión de priones (Moore et al., 1998). La PrP del topillo rojo con isoleucina en la posición 109 ya ha sido adaptada con éxito tanto al estudio del malplegamiento espontáneo de distintas cepas en PMCA (Fernandez-Borges et al., 2017a), como a la novedosa técnica de propagación PMSA, donde mediante el uso de semillas priónicas se han conseguido obtener priones recombinantes con alta capacidad infecciosa y aptos para estudios estructurales (Erana et al., 2019).

Estos priones recombinantes obtenidos mediante PMSA se generaron en presencia de cofactores definidos, al igual que otros reportados previamente. Algunos autores apuntaron a que la presencia de RNA estimulaba la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} en presencia de semilla (Deleault et al., 2003), pero que dicho efecto podía variar en función del cofactor añadido y según a qué especie perteneciera la PrP, como pudo comprobar el grupo de Supattapone al obtener resultados dispares cuando intentaron propagar cepas clásicas de hámster y de ratón en presencia de RNA (Deleault et al., 2010). Nuestro grupo reportó también la utilidad de otros cofactores para la generación de priones recombinantes mediante PMCA, señalando al dextrano como uno de los más efectivos (Fernandez-Borges et al., 2017a). Este hecho parece ser extensivo a la generación espontánea de priones, donde el grupo de

Supattapone observó que la presencia de RNA era fundamental para conseguir la conversión de PrP^C purificada a partir de cerebros de hámsteres a PrP^{Sc}, apuntando que la presencia de polianiones y lípidos favorece la conversión a PrP^{Sc} (Deleault et al., 2007). Los estudios de Baskakov, pese a contar con fibras amiloideas que no cumplen con todas las propiedades de un prion *bona fide*, también apuntan a la dependencia de cofactores. Las fibras generadas *de novo* por este grupo necesitaron la presencia de cofactores, ya fueran añadidos o presentes en homogeneizados cerebrales durante el proceso de moldeado al que las someten, para así resultar infecciosas *in vivo* (Makarava et al., 2011). Así, aunque queda claro que los cofactores juegan un papel en el desencadenamiento del malplegamiento de priones y, probablemente, en la selección de determinadas cepas priónicas infecciosas generadas *in vitro*, se desconoce su función exacta y cómo la ejercen. Una de las teorías actualmente en discusión, es si la capacidad infecciosa de una determinada rec-PrP^{res} malplegada *in vitro* depende de su asociación con el cofactor, el cual le conferiría la infectividad o, por el contrario, el cofactor únicamente induciría o seleccionaría una cepa concreta que sería infecciosa incluso tras la eliminación de dicho cofactor. Para ello, el grupo de Supattapone utilizó cepas de priones recombinantes de topillo rojo sin cofactor y con cofactor y testaron su capacidad de propagación en homogeneizados de cerebro de topillo rojo mediante PMCA, observando en ambos casos PrP^{res}. Sin embargo, la cepa generada sin cofactor no fue capaz de inducir una EET evidente en topillos rojos ni en ratones, apuntando al cofactor como elemento esencial para alcanzar las propiedades de prion *bona fide*. Únicamente cuando propagaban las cepas generadas sin cofactor en homogeneizado cerebral de topillo rojo durante tres rondas de PMCA, conseguían recuperar las propiedades infectivas propias de un prion (Burke et al., 2019). Por ello, este grupo de investigadores defiende que las cepas generadas en ausencia de cofactor pueden ser infecciosas, pero que la ausencia temporal del mismo enmascara dicha capacidad, siendo el cofactor imprescindible para otorgar el carácter infeccioso a los priones. Por el contrario, otras investigaciones sugieren que pueden obtenerse priones recombinantes infecciosos en ausencia de cofactor (Fernandez-Borges et al., 2017a), así como no infecciosos en presencia de estos (Timmes et al., 2013), por lo que los cofactores no serían esenciales para la infectividad. Estos hechos conducen a que, tras casi una década desde la descripción del primer prion *bona fide* generado de manera espontánea, aún no seamos capaces de comprender qué mecanismos moleculares llevaron a su obtención ni qué papel juega la presencia de cofactores en el evento de malplegamiento de la PrP o en la generación de priones infecciosos.

Una mejor comprensión del proceso de conversión de la forma sana PrP^C a su forma patológica PrP^{Sc} es clave en el campo de la investigación priónica. Además, la observación de pequeñas cantidades de agregados de PrP resistente a PK en mamíferos no infectados, como roedores e incluso humanos (Yuan et al., 2006), proporcionan una evidencia experimental de que existen confórmeros de PrP

agregada presentes de forma minoritaria en cerebros de animales sanos. Estos pequeños agregados podrían ser fruto de un malplegamiento espontáneo que tiene lugar con la edad y que podrían formar parte, junto a otras proteínas, de un sistema neuroprotector cuyos mecanismos se debilitan con la edad, tal y como sugieren algunos autores (Balch et al., 2008, Safar, 2012), fenómeno prácticamente imposible de estudiar *in vivo* debido a la escasa frecuencia de aparición y a los largos periodos de incubación. Por tanto, la comprensión del evento de malplegamiento y la formación espontánea, primero de pequeños oligómeros de PrP^{Sc} y luego de grandes fibras amiloides, no se limita únicamente a desentrañar la etiología de la variante esporádica de la enfermedad, sino que podría aportar información crucial acerca de la función de los amiloides. Tras la adaptación de la proteína recombinante de topillo rojo a PMSA por parte de nuestro laboratorio (Erana et al., 2019), uno de los objetivos de esta tesis doctoral será explorar los límites de esta técnica y adaptarla para obtener priones recombinantes *bona fide* de manera espontánea utilizando PrP recombinante de otras especies que aporten nuevos modelos de mayor interés socioeconómico como los priones ovinos o más accesibles en el laboratorio como los murinos, para el estudio de dicho fenómeno. Además, basándonos en técnicas utilizadas para la distinción de cepas priónicas en la naturaleza, realizaremos una detallada caracterización bioquímica y biológica de las propiedades de los diferentes priones recombinantes generados mediante PMSA, a través de los cuales intentaremos comprender el rol que pueden desempeñar los cofactores a la hora de generar priones *de novo* y en el mantenimiento de sus características. Así, a lo largo de esta tesis doctoral, explotaremos las ventajas de la técnica PMSA para la generación de priones recombinantes *in vitro* y estudiaremos la cinética de formación de priones *bona fide*, caracterizándolos biológicamente y aportando una nueva metodología robusta capaz de proporcionar modelos de gran interés aptos para estudios estructurales entre otros.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La técnica PMSA podría ser utilizada para la generación espontánea de priones *bona fide* de distintas especies de manera rápida y robusta, pudiendo incluso originar diversas cepas cuyo estudio permitiría una mejor comprensión del evento de malplegamiento, ya que ha demostrado ser una herramienta eficaz para la propagación *in vitro* de priones recombinantes de topillo rojo.

Objetivos

1. Adaptar la técnica de PMSA, utilizada hasta la fecha como método de propagación de priones *in vitro*, a la formación de priones recombinantes murinos de manera espontánea.
 - a. Determinar las condiciones idóneas de PMSA para la generación espontánea de PrP murina resistente a proteasas utilizando una variante basada en la PrP de topillo rojo.
 - b. Determinar si la presencia de isoleucina en la PrP murina en la posición equivalente a la del topillo rojo es necesaria o si existen otras variantes de la PrP de ratón que permitan el malplegamiento espontáneo de la misma.
 - c. Determinar si es posible obtener malplegamiento espontáneo *in vitro* a partir de PrP murina silvestre.
2. Estudiar las características de los productos de PrP resistente a proteasas obtenidos espontáneamente mediante PMSA para identificar potenciales confórmeros que podrían constituir distintas cepas.
 - a. Realizar una caracterización bioquímica que permita detectar diferentes propiedades entre las PrP murinas malplegadas.
 - b. Realizar una caracterización biológica que permita confirmar la generación de priones recombinantes *bona fide* con propiedades distinguibles.
3. Determinar el rol que desempeñan los cofactores en la propagación *in vitro* de diferentes priones recombinantes murinos y el impacto sobre sus características.
4. Analizar la cinética del malplegamiento espontáneo *in vitro*, caracterizando tanto *in vitro* como *in vivo* los productos obtenidos durante el proceso.
5. Demostrar que la metodología desarrollada para la obtención de priones recombinantes murinos de forma espontánea es trasladable a otras especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Construcción de los plásmidos de expresión de las PrP de ratón silvestre L108 T189 y F108 V189, de ratón con todos los polimorfismos posibles en posición 108 y de oveja VRQ

1.1. Generación de plásmidos con PrP murina L108 T189, F108 V189 y oveja VRQ mediante recombinación homóloga

Para la producción de las PrP recombinantes de ratón (con los polimorfismos L108 T189 y F108 V189, correspondientes a los genotipos *a* y *b* respectivamente) y oveja VRQ (V136, 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 (Berrow et al., 2007). 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 carboxi-peptidasa 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 sometió a una digestión 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 murina con los polimorfismos L108 T189 o F108 V189 y de oveja con los polimorfismos A136, R154 y Q171, extraídas previamente de tejido encefálico correspondiente a cada especie utilizando el kit de extracción de ADN genómico *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel) se amplificaron y adecuaron a la recombinación homóloga mediante la técnica de PCR, teniendo en cuenta las especificaciones señaladas en el protocolo de la OPPF. Este paso es crucial para la correcta clonación de las secuencias deseadas en el vector mediante el sistema *In Fusion*, ya que se basa en una recombinación homóloga entre los extremos de la secuencia a

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

- Oligonucleótido *forward* (F) para la PrP de ratón L108 T189:
AGGAGATATACCATGAAAAAGCGGCCAAAGCCTGAA

- Oligonucleótido *reverse* (R) para la PrP de ratón L108 T189:
GTGATGGTGATGTTAGGATCTTCTCCCGTCGTAATA

- Oligonucleótido *forward* (F) para la PrP de ratón F108 V189:
CCGCCGTACGTCATCATGGCGAACCTTGGCTAC

- Oligonucleótido *reverse* (R) para la PrP de ratón F108 V189:
GGGGCCGGCCTCATCCCACGATCAGGAAG

- Oligonucleótido *forward* (F) para la PrP de oveja VRQ:
CCGGAATCCGGCGTACGATGGTGAAAAGCCACATAGGC

- Oligonucleótido *reverse* (R) para la PrP de oveja VRQ:
CTAGTCTAGACTAGGCCGGCCCTATCCTACTATGAGAAAAATG

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 Cyclers, 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 e inserto utilizando un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) con el objetivo de mezclar de ambos componentes en proporción molar 1:2 (vector:fragmento). Finalmente, los productos resultantes de la recombinación se transformaron en bacterias competentes *E. coli* DH5 XL-Gold® (Stratagene) siguiendo el protocolo estándar de transformación mediante choque térmico descrito por Inoue *et al* (Inoue et al., 1990). Todas las colonias bacterianas obtenidas se cultivaron en 2 ml de medio de cultivo Luria-Bertoni (LB) (Pronadisa) con 50 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37 °C en agitación toda la noche. Partiendo de estos cultivos, los plásmidos procedentes de colonias bacterianas se purificaron empleando el 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 murina L108 T189, F108 V189 y oveja VRQ 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'). Tras verificar que los productos

de secuenciación eran correctos mediante el uso de la herramienta BLAST (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*), se obtuvieron los siguientes plásmidos:

pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ murino L108 T189

pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ murino F108 V189

pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ ovino VRQ

Cabe destacar que también se utilizó un cuarto plásmido generado previamente en el laboratorio de manera similar y que contiene la PrP de topillo rojo I109:

pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ topillo rojo I109

1.2. Generación de plásmidos con PrP murina con todas las variantes aminoacídicas en la posición 108 utilizando mutagénesis dirigida

Con el objetivo de evaluar el efecto sobre el malplegamiento espontáneo de la presencia de cada uno de los 20 aminoácidos que forman parte de las proteínas en la posición 108 de la PrP murina, diseñamos 19 parejas de oligonucleótidos que incorporasen al plásmido pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ murina L108 T189 ya existente cada uno de los cambios mediante mutagénesis dirigida. 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 diseñaron las secuencias del oligonucleótido *forward* (del inglés, hacia adelante) (F) y la secuencia del oligonucleótido *reverse* (del inglés, reverso) (R), obtenida a partir de la secuencia reversa y complementaria del oligonucleótido *forward*. La selección de los mejores oligonucleótidos posibles se refinó mediante el software libre "Oligo analyzer 3.1" (Integrated DNA Technologies). La Tabla 2 recoge todos los oligonucleótidos *forward* y *reverse*, señalizando el codón que se ha modificado y que codifica el aminoácido sustituido:

Tabla 2. Lista de los oligonucleótidos diseñados para la obtención de las construcciones genéticas con todos los polimorfismos posibles en la posición 108 de la PrP murina.

Oligonucleótido	Secuencia
RaL108A F	5'- CAAAAACCAAC GCG AAGCATGTGGCAG -3'
RaL108A R	5'- CTGCCACATGCTT CGC GTTGGTTTTTGG -3'
RaL108C F	5'- CAAAAACCAACT GCA AAGCATGTGGCAG -3'
RaL108C R	5'- CTGCCACATGCTT GCA GTTGGTTTTTGG -3'

MATERIALES Y MÉTODOS

RaL108D F	5'- CAAAAACCAAC GACA AGCATGTGGCAG -3'
RaL108D R	5'- CTGCCACATGCTT GTC GTTGGTTTTGG -3'
RaL108E F	5'- CAAAAACCAAC GAAA AGCATGTGGCAG -3'
RaL108E R	5'- CTGCCACATGCTT TTTC GTTGGTTTTGG -3'
RaL108F F	5'- GCAAACCAAAAACCAACT TCA AGCATGTGGCAGGGG -3'
RaL108F R	5'- CCCCTGCCACATGCTT GAA GTTGGTTTTGGTTGC -3'
RaL108G F	5'- CAAAAACCAAC GGCA AGCATGTGGCAG -3'
RaL108G R	5'- CTGCCACATGCTT GCC GTTGGTTTTGG -3'
RaL108H F	5'- CAAAAACCAAC CATA AGCATGTGGCAG -3'
RaL108H R	5'- CTGCCACATGCTT ATG GTTGGTTTTGG -3'
RaL108I F	5'- CAAAAACCAAC ATTA AGCATGTGGCAGGGGC -3'
RaL108I R	5'- CTGCCACATGCTT AAT GTTGGTTTTGGTTGC -3'
RaL108K F	5'- CAAAAACCAAC AAAA AGCATGTGGCAG -3'
RaL108K R	5'- CTGCCACATGCTT TTTT GTTGGTTTTGG -3'
RaL108M F	5'- CAAAAACCAAC ATGA AGCATGTGGCAG -3'
RaL108M R	5'- CTGCCACATGCTT CAT GTTGGTTTTGG -3'
RaL108N F	5'- CAAAAACCAAC ACA AGCATGTGGCAG -3'
RaL108N R	5'- CTGCCACATGCTT GTT GTTGGTTTTGG -3'
RaL108P F	5'- CAAAAACCAAC CCGA AGCATGTGGCAG -3'
RaL108P R	5'- CTGCCACATGCTT CGG GTTGGTTTTGG -3'
RaL108Q F	5'- CAAAAACCAAC CAGA AGCATGTGGCAG -3'
RaL108Q R	5'- CTGCCACATGCTT CTG GTTGGTTTTGG -3'
RaL108R F	5'- CAAAAACCAAC CCGA AGCATGTGGCAG -3'
RaL108R R	5'- CTGCCACATGCTT GCG GTTGGTTTTGG -3'
RaL108S F	5'- CAAAAACCAAC AGCA AGCATGTGGCAG -3'
RaL108S R	5'- CTGCCACATGCTT GCT GTTGGTTTTGG -3'

RaL108T F	5'- CCAAAAACCAAC ACCA AGCATGTGGCAG -3'
RaL108T R	5'- CTGCCACATGCTT GGT GTTGGTTTTTGG -3'
RaL108V F	5'- CCAAAAACCAAC GTGA AGCATGTGGCAG -3'
RaL108V R	5'- CTGCCACATGCTT CAC GTTGGTTTTTGG -3'
RaL108W F	5'- CCAAAAACCAACT GGA AGCATGTGGCAG -3'
RaL108W R	5'- CTGCCACATGCTT CCAG TGTTGGTTTTTGG -3'
RaL108Y F	5'- CCAAAAACCAACT ACA AGCATGTGGCAG -3'
RaL108Y R	5'- CTGCCACATGCTT GTA GTTGGTTTTTGG -3'

Se efectuaron mutagénesis dirigidas secuenciales de dos pasos. Para ello, además de los oligonucleótidos específicos diseñados para introducir cada una de las mutaciones, se diseñaron dos oligonucleótidos que hibridan con una secuencia del vector pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ de ratón 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 murina:

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

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

Para la obtención de cada una de las mutaciones, se realizaron primero dos PCR, una de ellas con el oligonucleótido *forward* que contenía la mutación y el oligonucleótido *reverse* del extremo 5'; y la otra con el oligonucleótido *forward* del extremo 3' y el oligonucleótido *reverse* que contenía la mutación. En todos los casos y en esta primera fase, las PCR realizadas contenían: 2 ng de plásmido de pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ L108 T189 murino, 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 completar un volumen final de 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 para cada mutación, que contenían cada uno de ellos, un fragmento del gen que codifica la PrP murina con las mutaciones descritas. Con el objetivo de retirar los *buffers* presentes de la reacción anterior, se realizó una purificación de todos los fragmentos mediante el uso del kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) y siguiendo el protocolo del fabricante (*QIAquick® Spin Handbook*). El segundo paso de la mutagénesis dirigida consistió en la reconstitución completa de los genes que codifican la PrP murina albergando cada uno de ellos, una mutación distinta en la posición 108. Para ello se realizó de nuevo una PCR empleando como moldes los dos fragmentos obtenidos en el paso anterior para cada mutación y los oligonucleótidos *forward* y *reverse* que hibridan respectivamente en la región cercana al extremo N-terminal y C-terminal del gen que codifica la PrP. En todos los casos y en esta última fase, las PCR empleadas contenían: 50-100 ng de fragmentos de 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 murina se digirieron con la enzima de restricción XbaI (Fermentas) y posteriormente, tras realizar una purificación con *GeneJet PCR Purification Kit* (Fermentas), se digirieron con la enzima de restricción PstI (Fermentas), en todos los casos, siguiendo las especificaciones del fabricante. La enzima de restricción XbaI reconoce una secuencia de DNA ubicada cerca del extremo N-terminal de la secuencia del gen que codifica la PrP₂₃₋₂₃₁ murina, mientras que PstI digiere en una zona cercana al extremo C-terminal, dando lugar a fragmentos de aproximadamente 1074 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). El plásmido pOPIN E PrP₂₃₋₂₃₁ murino se digirió con las enzimas de restricción XbaI y PstI, siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente. Los fragmentos de 4707 pb se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, de nuevo con tinción con *RedSafe* 0.1 % (v/v) (Proquinorte) y *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Los fragmentos correspondientes a las secuencias de las ORFs del gen que codifica para las PrP murinas mutadas se clonaron en el vector pOPIN E murino obtenido en

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

pOPIN E PrP23-231 murino L108A
pOPIN E PrP23-231 murino L108C
pOPIN E PrP23-231 murino L108D
pOPIN E PrP23-231 murino L108E
pOPIN E PrP23-231 murino L108F
pOPIN E PrP23-231 murino L108G
pOPIN E PrP23-231 murino L108H
pOPIN E PrP23-231 murino L108I
pOPIN E PrP23-231 murino L108K
pOPIN E PrP23-231 murino L108M
pOPIN E PrP23-231 murino L108N
pOPIN E PrP23-231 murino L108P
pOPIN E PrP23-231 murino L108Q
pOPIN E PrP23-231 murino L108R
pOPIN E PrP23-231 murino L108S
pOPIN E PrP23-231 murino L108T
pOPIN E PrP23-231 murino L108V
pOPIN E PrP23-231 murino L108W
pOPIN E PrP23-231 murino L108Y

2. Obtención de proteínas del prion recombinantes

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

Para producir las proteínas recombinantes murinas, de topillo rojo y la ovina a partir de los plásmidos pOPIN E generados anteriormente, todos ellos se transformaron en bacterias competentes *E. coli* Rosetta (DE3)TM (EMD Millipore), desarrolladas especialmente para la expresión de proteínas eucariotas. Los plásmidos pOPIN E se transformaron específicamente en estas bacterias mediante el protocolo estándar de transformación por choque térmico (Inoue et al., 1990). Posteriormente se conservaron a -80 °C en medio LB + glicerol en proporción 1:1 (v:v).

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

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

El precipitado bacteriano resultante se resuspendió en 100 ml de solución de lisis [50 mM tris(hidroximetil)aminometano 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 MgCl₂ (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 20 mM. El producto lisado se centrifugó a 8500 g (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific) durante 1 h y a una temperatura de 4 °C. El precipitado resultante se resuspendió en 100 ml de solución de lavado [20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 150 mM cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich), 1 % Sarkosyl (Sigma-Aldrich), ajustado a pH 8.0]. El material resuspendido se

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

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

La pureza de las proteínas recombinantes obtenidas y la eficacia del proceso de purificación se evaluaron mediante tinción de proteína total tras electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) en geles *Criterion TGX 4 – 15 %* (Bio-Rad). A lo largo del proceso de purificación se fueron recogiendo fracciones de 10 µl de varios de los eluidos obtenidos. En concreto se recogieron muestras de 10 µl de la muestra filtrada antes de cargarla en la columna de afinidad, de la muestra filtrada tras su paso por la columna y de la proteína final purificada. A continuación, las muestras de 10 µl se precipitaron añadiendo 56.7 µl de metanol frío (Fisher Chemical) y tras centrifugar durante 30 min a una velocidad de 19 000 *g* y a 4 °C (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific), el material precipitado se resuspendió en 16 µl de solución de carga *NuPAGE* (Invitrogen Life Technologies) diluido 1:3 en PBS (del inglés *Phosphate Buffer Saline*) (Fisher Bioreagents) y se cargó en el gel de electroforesis. Por último, el gel se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en solución de tinción *BlueSafe* (NZYTech).

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

Esta técnica ha sido la principal herramienta utilizada a lo largo de esta tesis doctoral, aplicada en diversas condiciones. En este apartado se detallarán las distintas condiciones de preparación de sustratos basados en las proteínas priónicas recombinantes de topillo rojo, oveja VRQ y de ratón, incluyendo todas las variantes de la posición 108 de la PrP murina y los polimorfismos correspondientes a los genotipos *a* y *b*.

3.1. Preparación de sustratos para PMSA

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

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

En aquellos casos en que se ha tratado de aumentar la concentración de proteína en el sustrato para experimentos concretos, se han evitado las manipulaciones de la misma post-diálisis, ya que la concentración a través de filtros de centrifugación puede ocasionar grandes pérdidas de proteína por la formación de agregados amorfos. Por otra parte, en ocasiones se prepararon sustratos carentes de dextrano sulfatado o con una concentración menor. Para los apartados correspondientes de Resultados en los que se utilizan estos sustratos, se realizaron las siguientes modificaciones en el proceso anteriormente descrito:

Concentración de proteína pre-diálisis: Con el objetivo de obtener sustratos para PMSA con mayor concentración final de proteína soluble, se utilizó el doble de proteína habitual diluida en esta ocasión a una ratio 2:5 (v/v) en PBS y dializada de la misma forma descrita previamente. Tras centrifugar para eliminar la proteína precipitada, se monitorizó la concentración de proteína soluble mediante *BCA Protein Assay*. Por último, la medida adicional con el dispositivo NanoDrop 2000 permitió realizar las diluciones correspondientes para obtener sustratos cuya concentración final de PrP recombinante fuese de 40 µg/ml (1.75 µM) o de 160 µg/ml (7 µM), exactamente la mitad o el doble que la concentración obtenida tras una preparación de sustrato estándar.

Presencia de dextrano sulfatado: Otra de las variables en la preparación de sustratos utilizados a lo largo de esta tesis doctoral es la concentración de dextrano en el mismo. Para la preparación de este tipo de sustratos, seguimos el protocolo convencional hasta dejar la proteína a la concentración deseada y diluirla en solución de conversión fría 1:10. Tras ello, el sustrato fue convenientemente separado y alicuotado en función de la concentración final de dextrano sulfatado deseada. A continuación, utilizando preparaciones de dextrano sulfatado del 5 % y el 0.5 % (p/v) de concentración, se añadió el volumen correspondiente a los sustratos alicuotados anteriormente para dar lugar a preparaciones con una concentración final de dextrano sulfatado del 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005 y 0 % (p/v).

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

Los experimentos de propagación mediante pases seriados partiendo de semillas en suspensión (no adsorbidas a partículas esféricas, variación que se detalla más adelante) se llevaron a cabo de la siguiente manera. Los diferentes sustratos de PMSA basados en PrP recombinante de ratón, fueron divididos en alícuotas de 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 zirconia - sílice de 1 mm de diámetro (BioSpec Products). Generalmente, estos sustratos se inocularon a dilución 1:10 (inóculo:sustrato) con semillas recombinantes originadas previamente en PMSA. Sin embargo, en cada uno de los apartados de Resultados se detallará la dilución, que puede oscilar entre 1:10 y 1:10¹¹

según el experimento realizado. Estos tubos con sustrato y semillas recombinantes fueron sometidos a una ronda de PMSA cuya duración estándar es de 24 h, indicándose en los apartados posteriores si dicha duración varía. Se utilizaron termobloques con agitación (*Digital Shaking Drybath*, Thermo Scientific) a 39 °C y 700 rpm de agitación continua. Aunque estos son los parámetros habituales en una ronda de PMSA habitual, en ocasiones estas variables se modificaron de la siguiente manera:

Temperatura: La experiencia de este laboratorio ha marcado que la temperatura óptima para la propagación de semillas recombinantes mediante PMSA es de 39 °C. Sin embargo, como parte de los experimentos de caracterización que se detallarán con posterioridad, algunas semillas recombinantes se sometieron a condiciones restrictivas de propagación. Entre ellas se encontró una disminución de la temperatura de PMSA, procediendo de manera idéntica, pero variando la temperatura de los termobloques, estableciéndola así a 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 °C, manteniendo los 700 rpm de agitación continua y controles de propagación en paralelo a 39 °C.

Tiempo de PMSA: La duración habitual de una ronda de PMSA es de 24 h, el tiempo de propagación puede acortarse y en numerosas ocasiones la técnica se realizó *o/n* (del inglés, *over night*), con una duración aproximada de entre 16 y 20 h. Dicha oscilación dependía del objetivo final del experimento de propagación y de la efectividad conocida de la semilla recombinante utilizada. En aquellos estudios donde el objetivo fue determinar el tiempo mínimo de propagación, los tubos de experimentación fueron sometidos a PMSA durante 3, 4, 6 y 16 h exactamente.

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

Condiciones iniciales: El protocolo es similar al realizado para la propagación de proteínas malplegadas mediante PMSA. La principal diferencia radica en el tipo de material del que están compuestas las partículas que acompañan al sustrato. En las primeras condiciones de generación espontánea para la PrP recombinante de topillo rojo y la PrP recombinante murina, se utilizaron tubos de 0.2 ml de pared fina (Axygen) previamente rellenos con aproximadamente 0.14 mg de partículas esféricas de vidrio de 0.2-0.3 mm de diámetro (Sigma-Aldrich) y donde se añadieron 50 µl de sustrato para PMSA. En un principio, estas reacciones de PMSA destinadas a la generación espontánea de proteínas recombinantes malplegadas se llevaban a cabo utilizando un sistema *Monoshake* (Thermo Scientific) introducido en un horno de laboratorio (Nahita) para controlar la temperatura. Las condiciones utilizadas fueron 39 °C de temperatura y una agitación continua de aproximadamente 700 rpm, debido a las limitaciones del dispositivo para un control preciso de la velocidad de agitación.

Condiciones optimizadas a la generación espontánea de priones murinos: Ante la dificultad de obtener PrP recombinantes murinas de manera espontánea bajo estas condiciones y la baja eficiencia

de malplegamiento de la PrP recombinante de topillo rojo, comenzamos a variar determinados parámetros del protocolo, basándonos en la experiencia adquirida por el laboratorio a lo largo de los años. De esta manera, las condiciones de generación espontánea fueron optimizadas y se seleccionaron las siguientes: uso de tubos de tipo eppendorf de 2 ml con fondo cónico similares a los utilizados en los experimentos de propagación mediante PMSA con 500 – 800 μ l de sustrato, 200 mg de partículas esféricas de vidrio de 0.1 mm (Sigma-Aldrich), PMSA de 24 h de duración, a 39 °C de temperatura y agitación continua a 700 rpm utilizando termobloques (*Digital Shaking Drybath*, Thermo Scientific) que permitían un control más preciso de estos parámetros. Para pesar la cantidad necesaria de partículas esféricas se utilizó una balanza de precisión Summit SI234.3 (Denver Instrument).

3.4. Generación espontánea de rec-PrP^{res} mediante PMSA para ensayos cinéticos

Los experimentos de generación espontánea destinados a monitorizar la cinética del proceso de formación de rec-PrP^{res} se realizaron de manera similar, aunque con ligeras variaciones respecto a los procesos de generación espontánea monitorizados únicamente a punto final. Al necesitar un volumen de sustrato de partida mayor, en el ensayo cinético se utilizaron tubos de tipo Falcon de 50 ml (Thermo Fisher) con fondo cónico donde previamente se habían depositado 2.4 mg de partículas esféricas de vidrio de 0.1 mm (Sigma-Aldrich). Siguiendo una proporción de 0.2 g partículas/ml de sustrato, se añadieron 12 ml de sustrato basado en PrP recombinante de ratón silvestre o de oveja silvestre VRQ. Dichos sustratos fueron preparados a partir de 3 lotes, o en inglés *batches*, de proteína diferentes para asegurar la robustez del experimento, incluyendo además réplicas técnicas de cada preparación. Estos tubos fueron sometidos a PMSA utilizando un agitador con termostato (Thermo Fisher) y un adaptador para tubos de 50 ml acoplado (Thermo Fisher), manteniendo las condiciones convencionales de 39 °C de temperatura y 700 rpm de agitación continua. Al tratarse de un ensayo cinético de generación espontánea se extrajeron muestras para su posterior análisis tras 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h de PMSA partiendo del mismo tubo de experimentación.

4. PMSA para la propagación de priones recombinantes *in vitro* mediante el uso de partículas esféricas de zirconia - sílice como semillas

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

Tras comprobar que es posible adsorber ciertas semillas recombinantes a partículas esféricas de diferente material y utilizarlas en PMSA directamente como semillas sin la necesidad de realizar diluciones (Erana et al., 2020b), decidimos aplicar este método con las rec-PrP^{res} murinas obtenidas espontáneamente en esta tesis doctoral, dado que facilita la conservación de las semillas y ayuda a uniformizar títulos frente a las semillas en suspensión. Para ello se llevó a cabo una propagación

mediante PMSA de las cuatro rec-PrP^{res} murinas en presencia de partículas esféricas de zirconia – sílice de 1.0 mm de diámetro. Antes de la propagación, las partículas esféricas se lavaron tres veces con PBS (Fisher reagents) y una última vez con H₂O estéril libre de nucleasas (Amresco, VWR International Eurolab) mediante agitación en vórtex. En tubos de tipo eppendorf de 2.0 ml con fondo cónico (Thermo Scientific) se añadieron 250 mg de partículas esféricas lavadas y se agregaron 800 µl de sustrato basado en rec-PrP murina L108I. Seguidamente, se añadió la semilla en proporción 1:100 (semilla:sustrato). Todos los tubos con sustrato y semilla se sometieron a una ronda seriada de PMSA de 24 h, 700 rpm y 39 °C utilizando un termobloque con agitación (*Digital Shaking Drybath*, Thermo Scientific). Con el objetivo de conseguir una mayor cantidad de PrP malplegada adherida a la superficie de las partículas esféricas, realizamos 6 – 8 réplicas técnicas para cada semilla. Tras esta única ronda de PMSA, el material generado en las réplicas de experimentación de cada semilla se aglutinó en un mismo tubo, se homogeneizó y se conservó a -80 °C para ser utilizado como semilla en formato líquido en posteriores experimentos, tras ser analizado para confirmar la presencia de rec-PrP^{res} mediante digestión con PK y tinción de proteína total. Operamos de manera similar en el caso de las partículas esféricas de zirconia – sílice, pasando las partículas de cada semilla a un mismo tubo de experimentación que, tras un proceso de lavado y secado detallado en la siguiente sección, se conservaron a temperatura ambiente.

4.2. Propagación de priones mediante PMSA en distintas condiciones utilizando partículas esféricas de zirconia – sílice con rec-PrP^{res} adsorbida

Antes de utilizarlas como semillas en experimentos de propagación mediante PMSA, se confirmó que el proceso de adsorción de semillas a las partículas de zirconia – sílice fuese correcto. Para ello, las partículas esféricas con rec-PrP^{res} adsorbidas se lavaron tres veces con PBS (Fisher reagents) 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} no adsorbida y que haya sido arrastrada con las partículas esféricas, asegurando así que el malplegamiento del sustrato se debe únicamente al efecto de la semilla adsorbida en las partículas esféricas. Posteriormente, las partículas esféricas con rec-PrP^{res} adsorbidas se secaron en estufa de laboratorio a 42 °C durante 6 – 8 h para su correcta conservación a temperatura ambiente. Una vez estuvieron completamente secas, se testó la capacidad de propagación de estas partículas mediante una ronda de PMSA preliminar utilizando un número mínimo de partículas de zirconia – sílice (1, 3 o 10) con las semillas murinas adsorbidas. Los productos de esta ronda fueron analizados mediante digestión con PK y tinción de proteína total, permitiendo establecer en 3 el número mínimo de partículas de zirconia – sílice con rec-PrP^{res} adsorbidas a utilizar como semilla en los experimentos de propagación. De manera general, las rondas de PMSA en las que se utilizan

partículas esféricas con rec-PrP^{res} adsorbida se llevaron a cabo en tubos de tipo eppendorf de 2 ml con fondo cónico (Thermo Scientific) donde previamente se habían colocado un mínimo de 3 partículas esféricas con semillas adsorbidas y a los que posteriormente se añadieron entre 500 y 600 µl de sustrato basado en rec-PrP murina L108I. Los experimentos se llevaron a cabo en un termobloque con agitación (*Digital Shaking Drybath*, Thermo Scientific) fijando una velocidad de agitación constante de 700 rpm e incubando las muestras a 39 °C *o/n*. Sin embargo, los parámetros de temperatura y duración de las rondas de PMSA fueron modificadas acorde a las necesidades del experimento, indicándose en el apartado correspondiente de Resultados. En aquellos experimentos donde fue necesario la utilización de un control sin semilla estos se prepararon de igual forma, pero utilizando partículas esféricas de zirconia – sílice de 1.0 mm sin rec-PrP^{res} en su superficie. El uso de partículas de zirconia – sílice con rec-PrP^{res} adsorbidas a ellas como semilla resultó en un método de propagación robusto, fácil de reproducir y que permitió la comparación de propagaciones realizadas en diferentes condiciones para caracterizar bioquímicamente las cuatro semillas murinas, cuyos resultados se detallarán posteriormente y que incluyen: escalado de muestras para su estudio epitópico y de resistencia a PK, propagación a distinta temperatura, propagación en sustratos basados en rec-PrP murina silvestre de genotipo *a* y genotipo *b* o en ausencia de dextrano sulfatado.

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

5.1. Preparación de sustratos para PMCA basados en homogeneizados de encéfalos de ratón

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

Ratón silvestre: Ratones de genotipo silvestre de tipo C57BL/6 (Charles River Laboratories France) que expresan (1x) la PrP^C murina.

TgMol108I: Ratones transgénicos que sobreexpresan entre 3 y 4 veces (respecto a un ratón de genotipo silvestre) la PrP^C murina con la mutación puntual L108I sobre un fondo genético *Prnp*^{0/0} (Venegas, 2018).

Tg338: Ratones transgénicos Tg338 que sobreexpresan 8 veces (8x) la PrP^C ovina VRQ (V136, R154 y Q171) sobre un fondo genético *Prnp*^{0/0} (Vilotte et al., 2001).

Tg501: Ratones transgénicos Tg501 que expresan (1x respecto a cerebro de cabra) la PrP^C ovina ARQ (A136, R154 y Q171) sobre un fondo genético *Prnp*^{0/0} (Aguilar-Calvo et al., 2014).

Los animales se sacrificaron mediante inhalación de CO₂ y los encéfalos fueron perfundidos mediante punción cardiaca con 50 ml de solución de perfusión [PBS (HyClone sin iones de Ca y Mg) y 5 ml de EDTA (Sigma-Aldrich)] con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de sangre de sangre posible. Con la ayuda de un homogeneizador de tipo Potter-Elvehjem (Fisherbrand), 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). Por último, los homogeneizados que serán utilizados como sustratos para PMCA se alicuotaron convenientemente y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

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

La propagación *in vitro* de priones mediante PMCA se realizó basándonos en el procedimiento descrito por Castilla y colaboradores (Saborio et al., 2001, Saa et al., 2006) que permite mimetizar *in vitro* el proceso de propagación priónica que tiene lugar *in vivo*, pero con una cinética acelerada. Esta técnica se utilizó para la evaluación de la potencial capacidad de infección de las rec-PrP murinas y ovinas malplegadas espontáneamente por PMSA. Para ello, se llevaron a cabo rondas seriadas de PMCA en las que las PrP malplegadas recombinantes en estudio se diluyeron 1:10 en el respectivo sustrato de interés. Se utilizaron tubos de 0.2 ml de pared fina (Axygen) para favorecer la penetración de las ondas ultrasónicas, a los que se les añadió en primer lugar partículas esféricas de zirconia – sílice de 1.0 mm de diámetro y posteriormente, 45 µl de sustrato de PMCA. Se utilizó un sonicador Misonix Q-700 con sistema de microplaca (Qsonica) programado para llevar a cabo ciclos de 30 min de incubación y 15 – 20 s de sonicación a una amplitud del 60 – 80 %. La temperatura a lo largo de todo el proceso se mantuvo entre 37 – 39 °C utilizando un baño de agua circulante (Thermo Scientific). 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 proyectadas, que dependió del

sustrato utilizado y la semilla a evaluar. De forma general, se incluyeron duplicados de cada semilla debido a la estocasticidad propia de la PMCA. Como controles de generación espontánea de PrP^{res} o de contaminación cruzada, se incluyeron tubos sin semilla recombinante que solo contenían sustrato y a los que se les añadió dextrano sulfatado al 0.05%, alcanzando así la misma cantidad final que presentan los tubos de experimentación debida a la adición de semillas recombinantes que contenían dicho cofactor. La duración de las rondas de PMCA y el número de pases seriados realizados dependió del sustrato utilizado, estableciéndose las condiciones idóneas en función de la experiencia del laboratorio y teniendo en cuenta los niveles de expresión de cada uno de los modelos utilizados. Las condiciones fueron las siguientes:

Ratón silvestre: Entre 3 y 4 rondas de PMCA, cada una con una duración de 24 h y manteniendo el resto de los parámetros idénticos.

TgMoL108I: Entre 2 y 3 rondas de PMCA, cada una con una duración de 6 h y manteniendo el resto de los parámetros idénticos.

Tg338: Entre 2 y 3 rondas de PMCA, cada una con una duración de 12 h y manteniendo el resto de los parámetros idénticos.

Tg501: Entre 3 y 4 rondas de PMCA, cada una con una duración de 24 h y manteniendo el resto de los parámetros idénticos.

5.3. PMCA para la determinación de la potencial infectividad específica de las semillas recombinantes mediante diluciones seriadas de las semillas

La evaluación preliminar de la capacidad de las semillas recombinantes espontáneas para malplegar la PrP^C de encéfalo se realizó únicamente con una dilución 1:10 de los productos a testar. Cuando el objetivo fue una estimación más precisa de la eficacia de propagación de una semilla, lo que nos permitiría aproximar su potencial infectividad específica, fue necesario realizar ligeras modificaciones en el protocolo anterior. Como parte del ensayo cinético, una vez se monitorizó la generación espontánea de rec-PrP^{res}, se rastreó la aparición de la capacidad de malplegamiento de PrP^C por parte de las nuevas semillas producidas.

Las muestras recombinantes de ratón silvestre y de oveja VRQ silvestre extraídas durante el ensayo cinético fueron utilizadas como semillas en su respectivo sustrato no sobreexpresor; homogeneizado cerebral de C57BL/6 para las semillas recombinantes de ratón y homogeneizado de Tg501 para las semillas recombinantes ovinas. Las semillas fueron diluidas de forma seriada desde 1:10 hasta 1:10⁶ en el correspondiente sustrato de PMCA y sometidas a cuatro rondas de PMCA de 24 h cada una. Este

número de rondas fue seleccionado para asegurar la detección de la dilución máxima a la que era capaz de inducir el malplegamiento de PrP^C de cada inóculo, comprobando así que se alcanzaba el límite de capacidad de malplegamiento *in vitro* que para evitar subestimar su capacidad de propagación. Para controlar la aparición de PrP^{res} espontánea y posibles eventos de contaminación cruzada, se incluyeron cuatro tubos que contenían únicamente sustrato y dextrano sulfatado al 0.05% (v/v) (tubos sin semilla). Todas las muestras sometidas a PMCA fueron tratadas con PK y analizadas mediante técnicas de *immunoblot* para detectar la presencia de PrP^{res}.

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

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

6.1. Digestión de PrP malplegada mediante tratamiento con proteinasa K

La resistencia parcial al tratamiento con proteasas que presentan los priones (Kocisko et al., 1994) es una cualidad que ha sido tradicionalmente empleada para su detección. La digestión de las muestras que podrían contener PrP malplegada con proteinasa K (PK) es el método más utilizado dentro de este tipo de tratamientos, pudiéndose aplicar en cualquier tipo de muestras, ya sea procedente de técnicas de propagación *in vitro* como la PMCA o PMSA, cultivos celulares o tejidos y fluidos biológicos. Debido a que durante la realización de esta tesis doctoral se han utilizado tanto la PMSA como la PMCA como métodos de generación y propagación de PrP malplegadas, el formato de la digestión y las condiciones fueron adaptadas al tipo de muestras utilizadas:

Muestras procedentes de homogeneizados de encéfalos de ratones transgénicos: 5 µl de las muestras resultantes de PMCA se diluyeron 1:4 en PBS con 2% de Tween-20 (Sigma-Aldrich) + 2 % de Nonidet P40 (Sigma-Aldrich) + 5 % de Sarkosyl (Sigma-Aldrich). Las muestras se digirieron utilizando una concentración final de PK (Roche) de 170 µg/ml durante 1 h a 56 °C en agitación constante de 450 rpm utilizando un *Thermomixer* (Eppendorf). El proceso de digestión se detuvo con la adición de 10 µl de solución de carga *NuPAGE* (Invitrogen Life Technologies). Este procedimiento se aplicó para las muestras procedentes de sustratos basados en homogeneizados cerebrales de ratones TgMoL108I, Tg338 y Tg501.

Muestras procedentes de homogeneizados de encéfalos de ratones de genotipo silvestre: 10 µl de las muestras resultantes de PMCA se diluyeron 1:2 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 85 µg/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). Este procedimiento se aplicó para las muestras procedentes de sustratos basados en homogeneizados cerebrales de ratones C57BL/6.

Muestras de PMSA (condiciones iniciales): Las muestras obtenidas en los primeros experimentos de generación espontánea provenían de tubos con un volumen de experimentación final de 50 µl. Por ello, para evaluar la formación espontánea de rec-PrP^{res} se extrajeron únicamente 10 µl de cada muestra, los cuales se diluyeron 1:2 en PBS con 10 % de Sarkosyl (Sigma-Aldrich) y a continuación se digirieron utilizando una concentración de PK (Roche) de 25 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) y la presencia de rec-PrP^{res} se evaluó mediante electroforesis y *Western blot*.

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

Muestras destinadas al ensayo de resistencia a PK: Algunas de las muestras obtenidas tras la propagación de cuatro de las semillas murinas adsorbidas a partículas de zirconia – sílice fueron analizadas para determinar su resistencia relativa al tratamiento con proteasas en un ensayo cuyo objetivo era evaluar la existencia de rec-PrP^{res} con características distintivas, ya que distintos perfiles de resistencia a PK se asocian a distintas cepas (Bessen and Marsh, 1992a). Se preparó un *stock* exclusivo de PK (Roche) para este ensayo, evitando así la potencial variabilidad debida a distintas

preparaciones de PK. Tras ello, 400 μ l de cada muestra fueron digeridos añadiendo distintos volúmenes de PK (Roche) para alcanzar las concentraciones 25, 100, 500, 1000 y 2000 μ g/ml. Tras ello, se operó de manera similar, incubando las muestras durante 1 h a 42 °C sin agitación en una estufa de laboratorio (Nahita), centrifugándolas a 19 000 *g* durante 15 min a 4 °C dos veces (Centrífuga Sorvall Legend XTR, Thermo Scientific) tras realizar entre ambas un lavado con PBS. El material precipitado fue resuspendido en 15 μ l de solución de carga *NuPAGE* (Invitrogen Life Technologies) diluida previamente 1:3 en PBS.

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

La evaluación de la presencia o ausencia de rec-PrP^{res} en las muestras obtenidas mediante PMSA en condiciones adaptadas a generación espontánea o en ensayos de propagación y tratadas con PK, se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) seguida de una tinción de proteína total con la solución de tinción *BlueSafe* (NZYtech). Para ello, las muestras digeridas y resuspendidas en solución de carga *NuPAGE* se hirvieron durante 10 min a 100 °C y se cargaron en geles de poliacrilamida del 4 – 12 % utilizando el sistema *NuPage® Novex® (NuPAGE Midi gel, Invitrogen Life Technologies)* y sometidos a electroforesis durante 1 h y 20 min (10 min a 70 V, 10 min a 110 V y 1h a 150 V). Tras la electroforesis se realizó la tinción 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 visualización de muestras no sometidas a PMSA y no digeridas con PK, como es el caso de los sustratos preparados con las distintas proteínas recombinantes, se utilizó el mismo sistema de electroforesis bajo condiciones similares. A diferencia de las muestras digeridas, 10 μ l de sustrato fueron diluidos en 10 μ l de PBS, aunque en los apartados 7.1 y 8.1 se realizaron diluciones adicionales 1:2, 1:4 y 1:8 en PBS para la preparación de las muestras. A 40 μ l de cada muestra se le añadieron 10 μ l de solución de carga *NuPAGE* (Invitrogen Life Technologies), a excepción del sustrato diluido 1:8, al que se le añadieron 20 μ l por ser la última muestra de la dilución seriada. Tras la preparación de todas las muestras, 10 μ l de cada una de ellas fueron cargados en geles de poliacrilamida del 4 – 12 % y se procedió a realizar la electroforesis utilizando el sistema *NuPAGE® Novex® (NuPAGE Midi gel, Invitrogen Life Technologies)* con los mismos parámetros descritos anteriormente. Tras la electroforesis, se realizó la tinción de proteína total con *BlueSafe* (NZYtech) en las mismas condiciones que las especificadas anteriormente. En todos los geles se incluyeron además 3 μ l de marcador de peso molecular (Nippon genetics).

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

La detección de las muestras obtenidas mediante PMCA y aquellas generadas espontáneamente en las condiciones iniciales de PMSA se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección por *Western Blot*, tras su correspondiente digestión con PK. Una vez resuspendidas en solución de carga *NuPAGE*, las muestras se hirvieron durante 10 min a 100 °C. Se utilizaron 16 µl de cada muestra digerida y 10 µl de las muestras no digeridas para la separación electroforética de proteínas. En todos los casos dicha separación se realizó mediante el sistema *Criterion TGX gel 4 – 12 %* (Bio-Rad). En todos los geles se incluyeron además 3 µl de marcador de peso molecular (Nippon genetics). Tras la separación, las muestras fueron transferidas utilizando membranas adsorbentes de difluoruro de polivinilideno (PVDF, del inglés *PolyVinylidene DiFluoride*) (*Trans-Blot Turbo Transfer Pack PVDF*, Bio-rad) mediante electrotransferencia utilizando el equipo *Trans-Blot Turbo System* (Bio-Rad). El bloqueo de la membrana se realizó utilizando solución de bloqueo [PBS (Fisher Bioreagents), 5 % (p/v) leche deslipidada, 0.05 % (v/v) Tween-20 (Sigma-Aldrich)] en la que se incubaron las membranas durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación orbital suave. A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario D18 [dilución 1:5000 en PBS con Tween-20 al 0.05 % (v/v) y leche deslipidada al 0.1 % (p/v)] para la PrP^{res} murina y ovina (Peretz et al., 2001). Se utilizó el anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (1:2500 en PBS con Tween-20 al 0.05 % (v/v) y leche deslipidada al 0.1 % (p/v), Thermo Scientific Pierce) para el anticuerpo primario D18. Tras la incubación con cada anticuerpo durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación orbital suave, se realizaron un lavado de 10 min y tres más de 5 min con una solución de PBS (Fisher Reagents) + 0.05 % (v/v) de Tween-20 (Sigma-Aldrich). Los resultados fueron evaluados mediante la visualización de bandas de PrP^{res} por quimioluminiscencia, utilizando el kit *Super Signal West Pico* (Thermo Scientific Pierce) para revelar la membrana. La visualización y toma de imágenes digitales se llevó a cabo utilizando el equipo *FluorChem Q* (Alpha Innotech) y el software *Alphaview* (Alpha Innotech). En las ocasiones en las que fue necesario un análisis semicuantitativo de la intensidad de fluorescencia de las muestras analizadas, se utilizó la herramienta informática *ImageJ*.

6.4. Detección de proteínas mediante electroforesis, tinción de proteína total y posterior mapeo epitópico

En el caso concreto de las muestras de rec-PrP^{res} obtenidas tras un ensayo de propagación mediante PMSA y destinadas al mapeo epitópico, se siguió un protocolo que combinaba los dos apartados previos. Tras la correspondiente digestión con PK, las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida y sometidas a electroforesis en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), tras la cual se aplicó la solución *BlueSafe* (NZYtech) para tinción de proteína total. El tratamiento de las

muestras fue similar al detallado anteriormente, siendo hervidas durante 10 min a 100 °C y cargadas en geles de poliacrilamida del 4 – 12 % bajo las mismas condiciones de electroforesis. En esta ocasión, tras la electroforesis y la tinción total de proteína, los geles de poliacrilamida fueron sometidos a una serie de lavados con H₂O destilada tras lo que los geles se incubaron durante 30 minutos en un buffer de transferencia Bolt™ Transfer Buffer 20X (Invitrogen) diluido a una concentración final de 1X mediante a adición de H₂O destilada y metanol. Pasado este tiempo, las muestras presentes en los geles fueron transferidas mediante electrotransferencia utilizando el equipo *Trans-Blot Turbo System* (Bio-Rad) a membranas adsorbentes de difluoruro de polivinilideno (PVDF, del inglés *PolyVinylidene DiFluoride*) e incubadas durante 1 h en solución de bloqueo [PBS (Fisher Bioreagents), 5 % (p/v) leche deslipidada, 0.05 % (v/v) Tween-20 (Sigma-Aldrich)]. A continuación, las distintas membranas fueron incubadas con diversos anticuerpos como parte del mapeo epitópico. De esta manera, para la detección de rec-PrP^{res} murina se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: 12B2 (1:2500), 9A2 (1:400), 7D9 (1:1000, Abcam), D18 (1:5000), SAF84 (1:400, Cayman Chemical) y M20 (1: 5000, Santa Cruz Biotechnology). En la mayoría de los casos se utilizó el anticuerpo secundario policlonal conjugado con peroxidasa de rábano Goat anti-mouse IgG-HRP (1:3000, Santa Cruz Biotechnology). Excepcionalmente, se utilizó el anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (1:2500, Thermo Scientific Pierce) para detectar el anticuerpo primario D18 y el anticuerpo de Donkey anti-goat IgG-HRP (1:10000, Santa Cruz Biotechnology) como secundario para el anticuerpo policlonal M20. Tras la incubación con cada anticuerpo durante 1 h a temperatura ambiente, se realizaron lavados tal y como se ha descrito previamente con una solución de PBS (Fisher Reagents) + 0.05 % (v/v) de Tween-20 (Sigma-Aldrich) y se evaluaron los resultados mediante la visualización de bandas de rec-PrP^{res} por quimioluminiscencia, utilizando el kit *Super Signal West Pico* (Thermo Scientific Pierce) para revelar la membrana. La visualización de imágenes digitales se llevó a cabo utilizando el equipo *FluorChem Q* (Alpha Innotech) y el software *Alphaview* (Alpha Innotech).

7. Estudios de infectividad *in vivo*

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

7.1. Modelos de experimentación y seguimiento

Con el objetivo de inducir enfermedad priónica en los modelos de experimentación, se utilizaron ratones transgénicos de entre 4 y 6 semanas de edad. Estos animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (100 mg/kg) /xilacina (10 mg/kg) y posteriormente inoculados de forma intracerebral en un área cercana al hipocampo utilizando una aguja hipodérmica de calibre 27 G con 15 - 20 μ l del inóculo de interés diluido 1:10 en PBS. En los diferentes bioensayos se utilizaron las siguientes líneas de ratones transgénicos y de genotipo silvestre, utilizados también para la obtención de encéfalos perfundidos y cuyas características se detallan en la sección 5.1: C57BL/6, TgMoL108I, Tg338 y Tg501. De manera excepcional y, además de los modelos murinos transgénicos detallados, se inocularon intracerebralmente dos corderos (macho y hembra) de genotipo VRQ/VRQ y de raza Rasa Aragonesa a la edad de 355 días, no observándose signos clínicos hoy en día.

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

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

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

7.2. Entidades colaboradoras y cumplimiento de las normativas éticas

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

De esta manera, la Universidad de Santiago y el Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA) adscrito a dicha entidad, participaron en la inoculación y posterior estabulación de los ratones transgénicos Tg501 y parte de los ratones silvestres C57BL/6, agradeciendo al Dr. Jesús Rodríguez Requena su papel en esta parte del estudio. Dicho estudio se aprobó por el Comité de Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Santiago (número de permiso 15005/16/006) y se realizó de acuerdo con las recomendaciones para el cuidado y uso de animales de experimentación acorde a la legislación nacional española (R. 1201/05).

Por su parte, las inoculaciones y la posterior estabulación de los ratones transgénicos TgMoL1081 corrieron a cargo del Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (Neiker-Tecnalia), siendo la Dra. Mariví Geijo y el Dr. Joseba Garrido los principales responsables de dicha actividad. Este estudio se aprobó por el Órgano Encargado del Bienestar Animal y Comité Evaluador (OEBA-CE) de Neiker-Tecnalia (número de permiso NEIKER-OEBA-2017-006) y se realizó de acuerdo con las recomendaciones para el cuidado y uso de animales de experimentación acorde a la legislación nacional española (R. 1201/05).

Los bioensayos en ratones silvestres C57BL/6 relacionados con el estudio cinético y los ratones transgénicos Tg338 fueron desarrollados en el Centre de Recerca en Sanitat Animal (IRTA-CReSA). Este estudio fue aprobado por la Direcció General de Polítiques Ambientals i Medi Natural (Departament de Territori i Sostenibilitat) de la Generalitat de Catalunya (autorización de proyecto número 10932) y se realizó de acuerdo con las recomendaciones para el cuidado y uso de animales de experimentación acorde a la legislación nacional española (R. 1201/05). Además de la inoculación y estabulación de dichos animales, los posteriores análisis anatomopatológicos de todos los ratones descritos fueron realizados en dichas instalaciones, agradeciendo al Dr. Enric Vidal y a M^a Sierra Espinar el papel que han desempeñado en dichas actividades.

Por último, el reciente estudio *in vivo* que implicó a dos corderos en la Universidad de Zaragoza fue aprobado por el Comité de Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (número de permiso PI04/17), agradeciendo a la Dra. Rosa Bolea y a todo su equipo la aportación realizada a este proyecto. De la misma manera, dicho estudio fue realizado siguiendo las

recomendaciones para el cuidado y uso de animales de experimentación acorde a la legislación nacional española (R. 1201/05).

8. Estudios anatomopatológicos

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

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

El primer paso del estudio inmunohistoquímico fue la eliminación de parafina de las muestras, realizada utilizando una batería de distintos alcoholes dispuestos en un teñidor automático (LEYCA *Autostainer XL*). Tras dos lavados con H₂O destilada, se llevó a cabo el desenmascaramiento de los epítomos de PrP^{Sc}, comenzando por una inmersión de 5 minutos en ácido fórmico 5 % (p/v) (Fisher) y seguido por una digestión con una solución de 4 µg/ml de PK (Roche) durante 15 minutos a 37 °C, realizando sendos lavados con H₂O destilada entre ambos pasos. A continuación, las muestras emplazadas en los portaobjetos de vidrio fueron tratadas con una solución 1:10 de citrato (*Target Retrieval Solution*, Dako) para asegurar un pH bajo y llevadas a ebullición utilizando una olla a presión (Monix). Las peroxidasas endógenas de las muestras se bloquearon mediante la inmersión en una solución de metanol durante 20 minutos y se incubaron durante toda la noche a 4 °C en presencia del anticuerpo primario 2G11 (Prionics AG, 1:1000).

Al día siguiente, las muestras fueron atemperadas y se incubaron durante 30 minutos con el sistema DAKO EnVision (polímero conjugado a los anticuerpos secundarios con peroxidasa junto con la 3,3'-diaminobencidina). Tras ello, el revelado se realizó mediante la inmersión de los portaobjetos de vidrio en una solución de DAB y H₂O₂ hasta visualizar un marcaje que señala la presencia de depósitos de PrP^{Sc}. Una vez los tejidos fueron marcados, se realizó un contraste con hematoxilina (Mayer) y se procedió a la deshidratación de estos utilizando una batería de distintos alcoholes dispuestos en un

teñidor automático (LEYCA *Autostainer XL*) y a su posterior montaje con una resina acrílica con base de xileno (DPX, Casa Álvarez).

Las muestras localizadas en portaobjetos de vidrio convencionales y destinadas para su evaluación morfológica mediante HE, fueron tratadas con una batería de distintos alcoholes dispuestos en un teñidor automático (LEYCA *Autostainer XL*) y sumergidas en solución de hematoxilina (Merck) y eosina alcohólica (Casa Álvarez). Tras ello, fueron montadas de manera similar utilizando una resina acrílica con base de xileno (DPX, Casa Álvarez). En ambos casos, las muestras fueron observadas utilizando un microscopio óptico de fluorescencia.

8.2. Evaluación y elaboración del perfil lesional

Tras la toma de imágenes utilizando el microscopio óptico de fluorescencia, se analizaron las siguientes secciones encefálicas: corteza piriforme, hipocampo, corteza occipital, corteza temporal, corteza parietal, corteza frontal, estriado, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, médula oblonga, núcleos cerebelosos, vermis y corteza cerebelosos (Figura 8). La evaluación positiva de los animales a través de HE se determinó por cambios espongiiformes, presencia de vacuolización (intraneuronal) o espongiosis (en el neuropilo) de la sustancia gris. Se trató de discernir la espongiosis causada por EETs de la que se podía deber a la neurodegeneración neuronal asociada a la edad (sustancia blanca) o de la relacionada con la sobreexpresión de la proteína del prion (cuerpo calloso y capas profundas de la corteza, sin estar asociada a depósitos de PrP^{Sc}). En los ensayos IHQs se buscaron depósitos de proteína mal plegada, minimizando el marcaje de la PrP^C e identificando patrones de acumulación específicos de la PrP^{Sc}: patrón punteado, granular fino, intraneuronal, linear (axones), placas (extracelular), estrellado (células gliales) y perivascular.

La elaboración del perfil lesional de los confórmers de proteína recombinante malplegada se realizó mediante la evaluación de las áreas anteriormente descritas. Dicha evaluación consistió en un sistema de puntuación del 0 al 5 acorde al grado de severidad de la lesión, atribuyendo un 0 cuando no había lesión, 1 si la lesión era muy leve y 5 si el grado de severidad era muy elevado. Posteriormente, los resultados de dicha evaluación de representaron de manera visual sobre un esquema (Figura 25 b) con los cuatro cortes encefálicos en los que cada uno de ellos se dividía a la mitad para representar las lesiones espongiiformes (color rosa) y los depósitos de PrP^{Sc} (color azul).

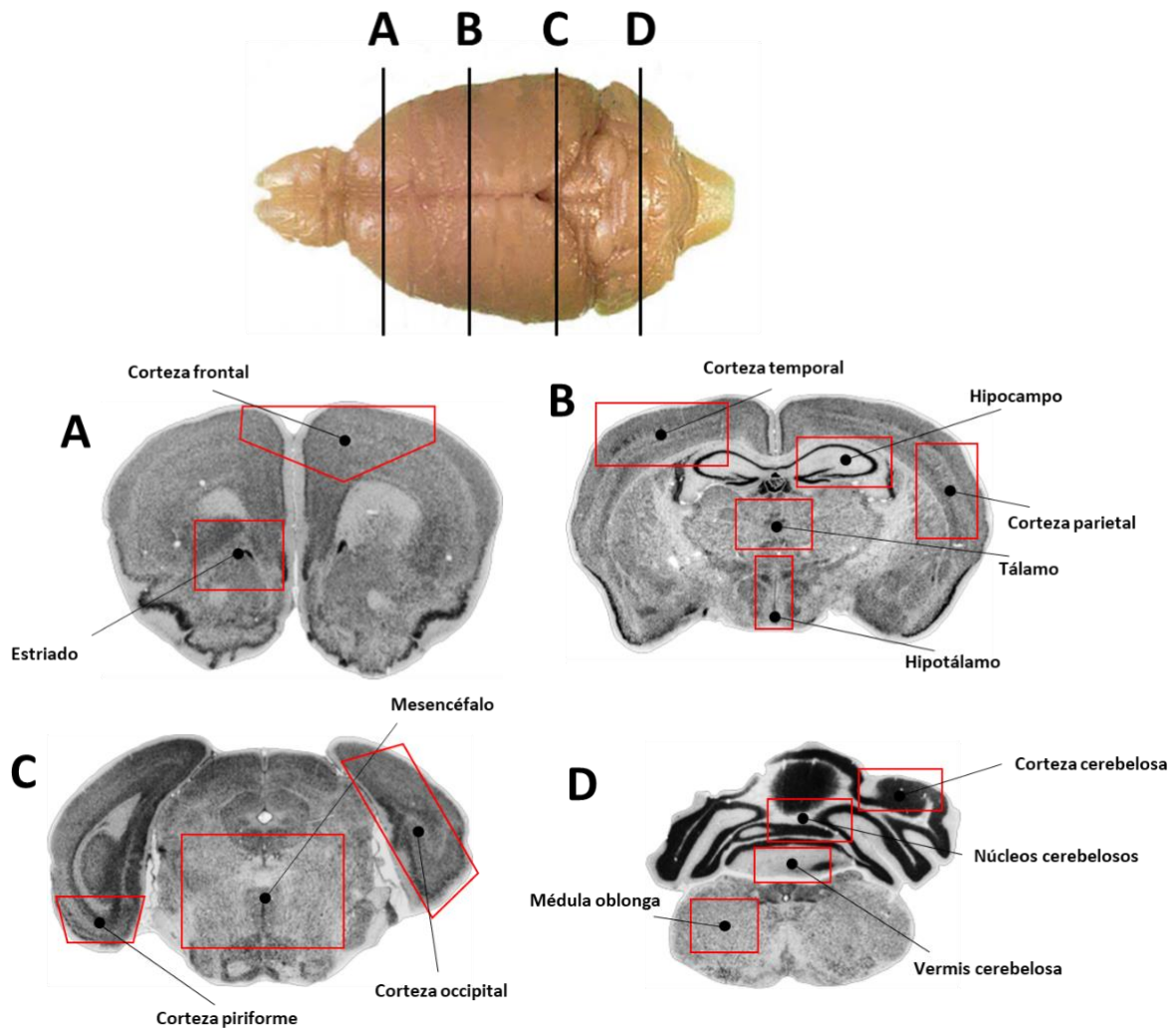


Figura 8. Secciones de encéfalo de ratón para la evaluación anatomopatológica de las características de cepa. La realización de 4 cortes (A, B, C y D) transversales a los cerebros incluidos en parafina permite el estudio de distintas áreas marcadas en rojo: corteza piriforme, hipocampo, corteza occipital, corteza temporal, corteza parietal, corteza frontal, estriado, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, médula oblonga, núcleos cerebelosos, vermis cerebeloso y corteza cerebelosa. Modificado de (Bruce and Fraser, 1991).

RESULTADOS

1. Adaptación de la PMSA para la obtención de PrP recombinante murina malplegada espontáneamente

El estudio de las enfermedades priónicas de origen esporádico en humanos presenta numerosos contratiempos, como la heterogeneidad clínica y la baja incidencia de la enfermedad (Parchi et al., 2012). Este panorama, extensible también a las EET de para otros mamíferos, dejan como opción de estudio más viable la aplicación de técnicas *in vitro*. La técnica PMSA, desarrollada recientemente en nuestro laboratorio ofrece nuevas posibilidades para la investigación de los mecanismos moleculares que dan origen a las EET esporádicas. Dicha herramienta, que ya ha demostrado ser capaz de producir priones recombinantes infecciosos mediante la propagación de semillas priónicas (cantidades minoritarias de PrP^{Sc} que actúan como iniciadoras del malplegamiento) (Erana et al., 2019), muestra un amplio potencial para todo tipo de aplicaciones en la investigación de las EET. Hasta la fecha, la PMSA se ha valido fundamentalmente de la utilización de la proteína del prion recombinante de topillo rojo (*Bank vole*) con el polimorfismo I109, considerado como el aceptor universal de priones (Watts et al., 2014), que además da lugar a la enfermedad priónica de evolución más rápida (Di Bari et al., 2013) y que también ha sido relacionado con la aparición espontánea de EET en modelos transgénicos de ratón que expresan la PrP^C de topillo rojo (Watts et al., 2012).

Con el fin de estudiar el malplegamiento espontáneo en otras especies y confirmar los resultados obtenidos con la PrP de topillo rojo, cuyas características tan particulares se atribuían a la presencia de una isoleucina en la posición 109, se generó una PrP recombinante murina con esta variación. La forma nativa de la PrP murina presenta una leucina en posición 108 (L108), resultando en la obtención de la proteína recombinante de ratón L108I (rec-Ra L108I). Esta proteína recombinante se utilizó, junto a la secuencia silvestre murina (rec-Ra L108), para la generación espontánea de priones mediante la técnica de PMSA. Se aplicaron las mismas condiciones que previamente habían permitido la propagación de semillas de manera exitosa utilizando la PrP recombinante de topillo rojo (rec-To I109) (Erana et al., 2019), con la salvedad de que no se añadieron priones exógenos, ni de origen encefálico ni recombinante. Esta estrategia venía avalada por resultados obtenidos previamente en el laboratorio, donde se mostraba la obtención de confórmeros proteicos malplegados de forma espontánea por PMSA mediante el uso de sustratos basados en rec-PrP, siempre 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 de ser infecciosa, es decir tener la capacidad de provocar una enfermedad priónica en modelos animales (resultados del laboratorio pendientes de publicación).

Utilizando estas dos proteínas recombinantes murinas y la de topillo rojo, se prepararon sustratos basados únicamente en rec-PrP, sales, detergente y dextrano sulfatado como cofactor. Estos tres tipos de sustratos fueron sometidos a sucesivas rondas de PMSA de 24 h sin la adición de semilla, testando así la capacidad de malplegamiento espontáneo de todas ellas y cuyos resultados se muestran en la Figura 9 a y 9 b (panel izquierdo). En esta primera aproximación, en la que los elementos clave aparecen esquematizados en la Figura 9 b (panel derecho), utilizamos pequeños volúmenes de sustrato en presencia de partículas esféricas de vidrio de 0.2-0.3 mm de diámetro, que habían demostrado previamente favorecer el proceso de malplegamiento espontáneo. El producto de la primera ronda de PMSA se diluyó 1:10 en sustrato fresco, sometiéndose de nuevo a la técnica. Este procedimiento se repitió hasta realizar quince rondas seriadas de PMSA. Tal y como se muestra en la Figura 9 a, no se obtuvo PrP^{res} de manera espontánea en ninguno de los sustratos durante la primera ronda de PMSA. Por el contrario, el sustrato rec-To I109 rojo malplegó espontáneamente y produjo PrP^{res} tras 2 rondas de PMSA. Este resultado no se replicó hasta la ronda 11 en el caso del sustrato rec-Ra L108I. Tras la realización de 11 rondas, se observó PrP^{res} en la mitad de las réplicas técnicas y, tras más de 15 rondas de PMSA, se detectó PrP^{res} en el 100% de tubos utilizando sustrato de rec-Ra L108I mediante técnicas de *Western blotting* (Figura 9 b, panel izquierdo), donde pudimos observar por primera vez PrP resistente a PK de un peso molecular inferior a 20 kDa. En ninguna de las rondas de PMSA pudimos detectar la presencia de PrP^{res} espontánea en los tubos con sustrato de rec-Ra L108, señalando la importancia del aminoácido (leucina/isoleucina) en la posición 108. La experiencia del laboratorio en el uso de la PMSA permitió la optimización de diferentes condiciones, mejorando los resultados en lo que a producción espontánea de priones se refiere. De esta manera, comprobamos que el uso de mayores volúmenes de sustrato en tubos de 2 ml junto a la presencia de partículas esféricas de vidrio de menor tamaño (0.1 mm frente a 0.2-0.3 mm), favorecía la formación de PrP malplegada espontáneamente. Registramos un adelanto de la generación espontánea al utilizar tanto sustrato de rec-Top I109 como de rec-Ra L108I (Figura 9 c), detectando PrP^{res} desde la primera ronda de PMSA en todas las réplicas técnicas. Al trabajar con volúmenes más grandes, pudimos observar mediante tinción de proteína total, que el material obtenido resistente a PK presentaba una banda de ~16 kDa correspondiente al fragmento ~90-230 resistente a proteasas característico de los priones *bona fide*. Se visualizaron otros fragmentos proteolíticos de menor tamaño, producto de diferentes sitios de cortes internos dentro del núcleo resistente de la rec-PrP malplegada y que pueden servir para distinguir posibles confórmeros estructuralmente diferentes entre sí de manera rápida (Figura 9 d).

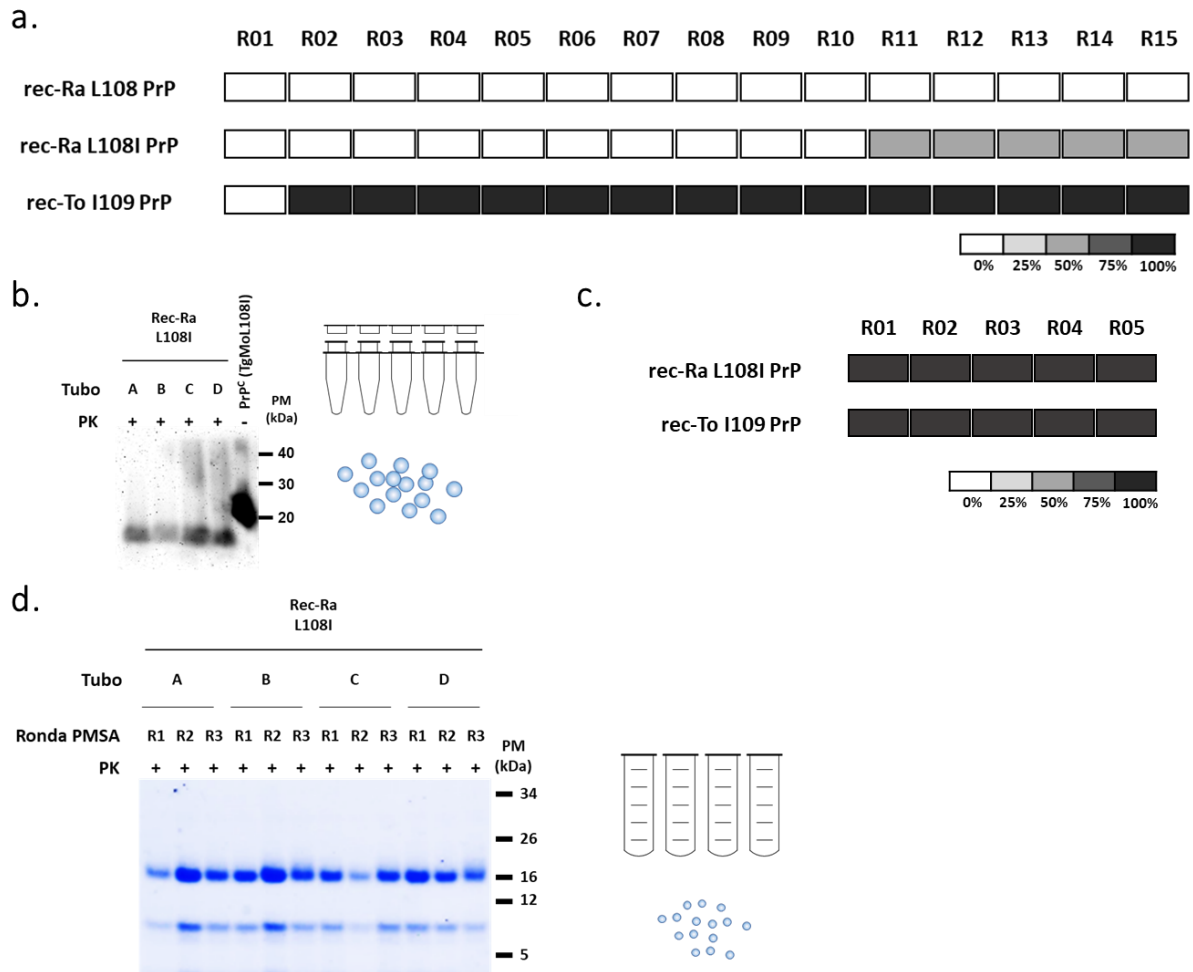


Figura 9. Estudio de la capacidad de malplegamiento espontáneo de las PrP recombinantes murinas mediante distintas metodologías de PMSA originalmente desarrolladas para la PrP recombinante de topillo rojo. **a)** Representación gráfica de la generación espontánea de distintas rec-PrP malplegadas (rec-PrP^{res}) a través de rondas seriadas (R01-R15) de PMSA, siguiendo la metodología original desarrollada para la rec-PrP de topillo rojo y aplicando una dilución 1:10 en cada ronda de PMSA. Se utilizaron tres sustratos, dos de ellos con PrP murina (rec-Ra L108 y rec-Ra L108I) y uno con PrP de topillo rojo (rec-To I109). La evaluación de la generación de rec-PrP^{res} de forma espontánea se llevó a cabo mediante digestión con PK del producto de cada ronda de PMSA, electroforesis y *Western blot*. La capacidad de malplegamiento espontáneo de cada uno de los tres sustratos fue testada por cuadruplicado, señalando la detección de rec-PrP^{res} tras cada ronda de PMSA con distintas intensidades de gris como indica la leyenda. Únicamente se detectó la presencia de rec-PrP^{res} en las primeras rondas de PMSA para la rec-To I109, mientras que el sustrato con rec-Ra L108I no malplegó hasta la ronda 11 de PMSA. **b)** Electroforesis y *Western blot* de las cuatro réplicas de sustrato rec-Ra L108I donde se detectó formación de rec-PrP^{res} en todos los tubos de experimentación tras más de 15 rondas de PMSA (panel izquierdo). Representación de los elementos clave de la metodología original de PMSA desarrollada inicialmente para rec-PrP To I109 llevada a cabo en tubos de 0.2 ml con partículas esféricas de vidrio de 0.2-0.3 mm de diámetro y con 50 µl de sustrato (panel derecho). **c)** Representación gráfica de la generación espontánea de rec-PrP^{res} mediante rondas seriadas (R01-R05) de PMSA con dilución 1:10, siguiendo una metodología optimizada y utilizando los sustratos con rec-To I109 y rec-Ra L108I. La evaluación de la generación de rec-PrP^{res} espontánea se realizó mediante digestión con PK, electroforesis y tinción de proteína total. La presencia de rec-PrP^{res} en cada ronda se representa igual que en el panel a. Bajo estas nuevas condiciones de PMSA, se detectó rec-PrP^{res} en el 100 % de las réplicas de ambos sustratos desde la primera ronda. **d)** Electroforesis y tinción de proteína total de las cuatro réplicas de las tres primeras rondas de PMSA con el sustrato rec-Ra L108I (panel izquierdo). Representación gráfica de los elementos clave de la PMSA optimizada para la proteína murina en la que se utilizaron tubos de 2 ml con 500 µl de sustrato y partículas esféricas de vidrio de 0.1 mm en (panel derecho). PM: marcador de peso molecular.

2. Análisis del rol del aminoácido situado en la posición 108 de la PrP en el malplegamiento espontáneo

La posición aminoacídica 109 en la PrP de topillo rojo (correspondiente a la 108 en ratón) se encuentra justo al final de la región polibásica CC2, pudiendo estar ocupada por una metionina o una isoleucina de forma natural, ambos aminoácidos apolares. El tipo de aminoácido en esta posición está estrechamente relacionado con la aparición espontánea de EET en modelos transgénicos de ratón que expresan la PrP^C de topillo rojo y sus diferentes variantes polimórficas (Watts et al., 2012) y, aunque se desconoce el papel estructural que desempeña un aminoácido u otro en la posición 109, quisimos comprobar si la PrP de ratón presentaba una mayor facilidad para el malplegamiento espontáneo cuando contenía otros aminoácidos en dicha posición. Por ese motivo estudiamos la generación espontánea mediante PMSA utilizando sustratos con todos los aminoácidos posibles en la posición 108 de la PrP murina, buscando aquellos que promovieran el malplegamiento espontáneo de la rec-PrP de ratón.

2.1. Evaluación del efecto de distintos aminoácidos en la posición 108 sobre la capacidad de malplegamiento espontáneo de la PrP murina

Con el objetivo de testar el efecto que produce la presencia de diferentes aminoácidos en la posición 108 de la PrP murina en su malplegamiento espontáneo, preparamos 20 sustratos partiendo de 20 proteínas recombinantes murinas, cada una de las cuales presentaba uno de los 20 aminoácidos existentes. La concentración de rec-PrP en todos los sustratos se igualó tras la diálisis (0.8 mg/ml de rec-PrP), utilizando para ello mediciones de proteína total. Para confirmar que todos los sustratos partían de concentraciones similares para el posterior malplegamiento espontáneo a través de PMSA, los 20 sustratos fueron visualizados mediante electroforesis y tinción de proteína total. Todos los sustratos preparados a partir de proteína recombinante muestran una concentración similar (Figura 10). Cabe destacar la formación de dímeros de PrP en el sustrato rec-Ra L108C PrP (Figura 10, pocillo 2) debido a la presencia de una cisteína adicional que podría ocasionar la formación de puentes disulfuro intermoleculares.

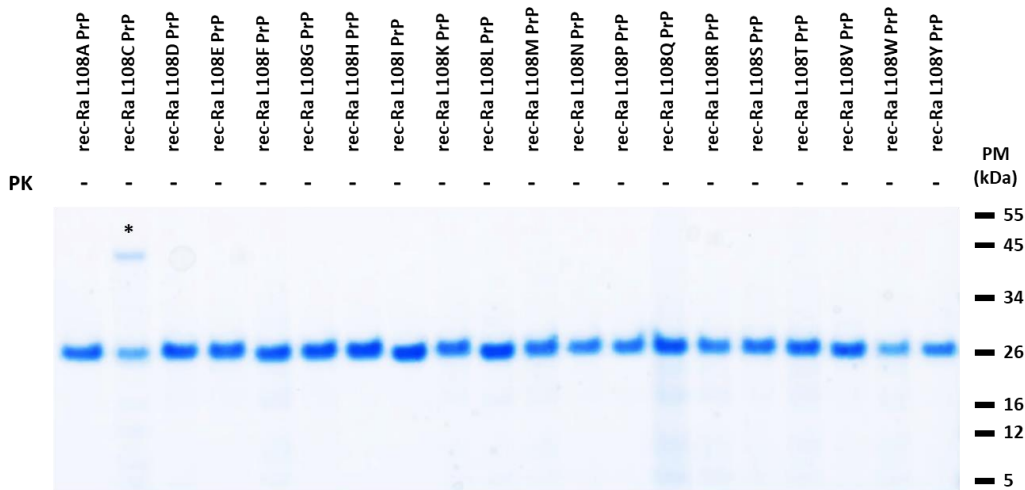
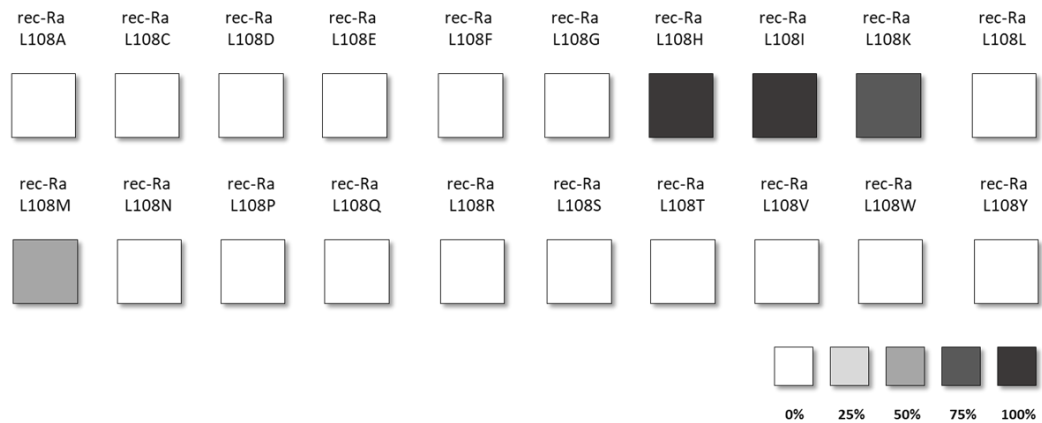


Figura 10. Visualización de los sustratos preparados con PrP recombinantes murinas con las 20 variantes aminoacídicas posibles en la posición 108. Se utilizaron 20 proteínas recombinantes murinas para preparar sustratos de PMSA con rec-PrP de ratón con los diferentes aminoácidos en la posición 108, para testar el efecto de cada uno de ellos en la generación espontánea de rec-PrP^{res}. Con el objetivo de confirmar que la concentración inicial de rec-PrP en todos los sustratos era la misma, todos ellos se analizaron mediante electroforesis y tinción de proteína total sin digerir con PK, confirmando que todos ellos presentaban una cantidad similar de rec-PrP. PM: marcador de peso molecular. *En el sustrato rec-Ra L108C PrP, la presencia de una cisteína adicional provoca la formación de dímeros por la presencia de puentes disulfuro intermoleculares.

Una vez ajustada la cantidad de proteína de cada uno de los sustratos, se realizó un único pase de PMSA de 24 h de duración con cada uno de los 20 sustratos por cuadruplicado aplicando las nuevas condiciones de PMSA, que incluían la adición de partículas esféricas de vidrio de 0.1 mm a cada réplica de experimentación. El objetivo de utilizar una única ronda de PMSA fue la de seleccionar el aminoácido que más favorecía el malplegamiento proteico espontáneo. Este procedimiento, que aplicaba condiciones restrictivas en comparación con las rondas seriadas, también minimizaba el riesgo de contaminación. Tras la digestión del producto de la única ronda de PMSA con PK para todos los sustratos y su visualización mediante tinción de proteína total, se detectó rec-PrP^{res} en varios de los sustratos (Figura 11 a). Aunque en la gran mayoría no se detectó rec-PrP^{res}, los sustratos rec-Ra L108H, rec-Ra L108I, rec-Ra L108K y rec-Ra L108M dieron lugar a material resistente a PK con distinto grado de efectividad, atendiendo al número de réplicas técnicas positivas. De esta manera, obtuvimos una tasa de conversión espontánea del 100% para los sustratos rec-Ra L108H y rec-Ra L108I, siendo los sustratos rec-Ra L108K y rec-Ra L108M menos eficaces a la hora de malplegar espontáneamente (Figura 11 a). Los cuatro sustratos que produjeron rec-PrP^{res} presentaron un perfil electroforético muy similar, independientemente de la mutación que albergasen (Figura 11 b). Este experimento sirvió para comprobar que los resultados de generación espontánea descritos en el polimorfismo natural del topillo rojo (M109 o I109) eran trasladables a la proteína recombinante de ratón, ya que tanto el sustrato rec-Ra L108I como el rec-Ra L108M fueron capaces de malplegar de manera espontánea, presentando mayor eficiencia para la espontaneidad el sustrato rec-Ra L108I que el sustrato rec-Ra L108M.

a.



b.

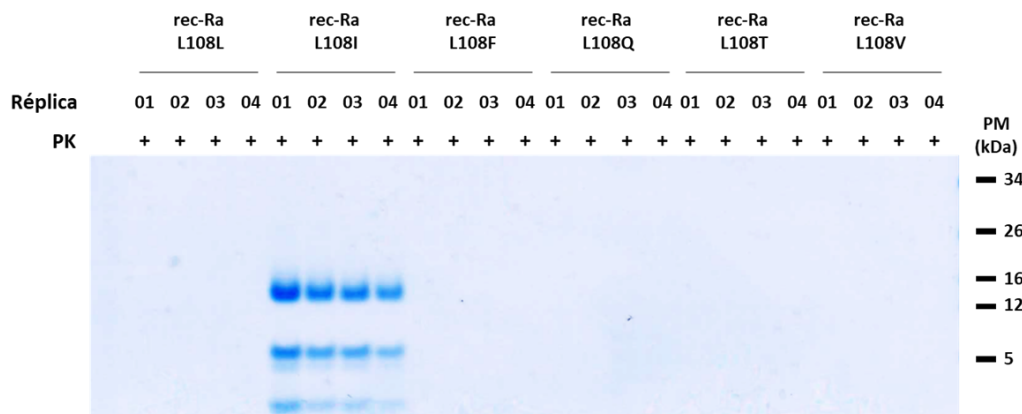


Figura 11. Generación espontánea de rec-PrP^{res} mediante PMSA utilizando distintas rec-PrP murinas. a) Representación esquemática de los resultados de generación espontánea de rec-PrP^{res} tras una única ronda de PMSA, siguiendo las condiciones optimizadas de PMSA y utilizando los sustratos con rec-PrP murina con todas las variantes aminoacídicas posibles para la posición 108. La evaluación de la generación de rec-PrP^{res} se llevó a cabo mediante digestión con PK, electroforesis y *Western blot*. La capacidad de malplegamiento espontáneo de cada una de las veinte rec-PrP murinas se evaluó por cuadruplicado, señalando la detección de rec-PrP^{res} tras cada ronda de PMSA con distintas intensidades de gris como indica la leyenda. Se detectó rec-PrP^{res} tras 24 horas de PMSA en los sustratos con rec-Ra L108H (100% tubos positivos), rec-Ra L108I (100%), rec-Ra L108K (75%) y rec-Ra L108M (50%). b) Electroforesis y tinción de proteína total representativa de seis de los veinte sustratos sometidos a PMSA. Tras la digestión con PK, electroforesis y tinción de proteína total, se detectó la presencia de rec-PrP^{res} en las cuatro réplicas del sustrato rec-Ra L108I. Las cuatro réplicas presentaron un patrón de movilidad electroforética idéntico con un fragmento predominante de ~16 kDa típico de los priones recombinantes *bona fide*. PM: marcador de peso molecular.

Aunque estos resultados sirvieron para demostrar que es posible generar PrP^{res} espontánea utilizando proteína recombinante de ratón con distintas mutaciones en la posición 108, nuestro objetivo era localizar aquellos aminoácidos que permitieran dicha formación de manera más eficaz. Atendiendo a la diferente tasa de éxito en la obtención espontánea de rec-PrP^{res} que presentan cuatro de los sustratos del estudio, pudimos hacer una distinción preliminar basándonos en este criterio. Sin embargo, al presentar dos de ellos PrP^{res} en un 100% de las réplicas en una sola ronda de 24 h, fue necesario otro experimento adicional que nos permitiera discriminar de una forma más precisa cuál de los sustratos era más susceptible de malplegarse espontáneamente. Para ello, se realizaron pases

únicos de PMSA por cuadruplicado aplicando las mismas condiciones de PMSA que en el experimento anterior, variando únicamente la duración del proceso. En esta ocasión limitamos los tiempos de incubación a 3 h, 4 h, 6 h y 16 h. Todos los productos fueron digeridos con PK tras la PMSA y visualizados mediante tinción de proteína total.

La Figura 12 muestra de manera esquemática el comportamiento de estos cuatro sustratos ante una PMSA de duración reducida. Podemos observar que el sustrato rec-Ra L108I fue el único capaz de malplegar de manera espontánea y dar lugar a rec-PrP^{res} desde las 3 h de PMSA. Al tratarse de pases independientes en lugar de seriados como en el experimento anterior, las cuatro réplicas que conforman cada pase a una duración determinada de PMSA presentan una ligera variabilidad intra-experimental. Este hecho explica que la tasa de generación espontánea para el sustrato rec-Ra L108I tras 6 h de PMSA sea del 75% en lugar del 100%, como se esperaría al observar que tras 4 h de PMSA se detectó rec-PrP^{res} en la totalidad de los tubos de experimentación para ese mismo sustrato. Esta ligera variabilidad no impidió la selección del polimorfismo L108I como el más exitoso de los 20 testados en PMSA para el malplegamiento espontáneo, indicando que el aminoácido isoleucina provoca efectos similares en la PrP murina a los observados en la PrP de topillo rojo.

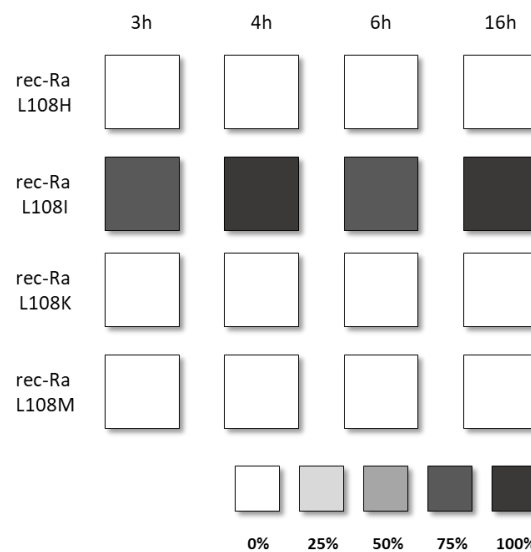


Figura 12. Generación espontánea de rec-PrP^{res} mediante PMSA de duración reducida. Representación esquemática de los resultados de generación espontánea de rec-PrP^{res} tras una única ronda de PMSA de duración variable: 3 h, 4 h, 6 h o 16 h. Los sustratos utilizados fueron los cuatro en los que se detectó rec-PrP^{res} espontánea tras 24 h de PMSA anteriormente (Figura 11). La formación de rec-PrP^{res} se evaluó mediante digestión con PK, electroforesis y tinción de proteína total. Únicamente se detectó la formación de rec-PrP^{res} con el sustrato rec-Ra L108I, señalando la isoleucina en posición 108 como el aminoácido que más favorece el malplegamiento espontáneo de la rec-PrP murina.

2.2. Generación espontánea y conservación de potenciales confórmeros de PrP^{res} murina

Estos experimentos sirvieron para destacar la PrP con la mutación L108I como la más apta para la generación espontánea de priones recombinantes murinos mediante el uso de PMSA. A lo largo de dichos experimentos y sus correspondientes repeticiones técnicas, comenzamos a detectar patrones electroforéticos diferentes tras la digestión con PK y la observación mediante tinción de proteína total. Aunque en todos los experimentos de generación espontánea utilizamos la PMSA para inducir el malplegamiento de la PrP recombinante murina, las condiciones de PMSA variaron ligeramente. En un primer momento se utilizaron pequeños volúmenes de sustrato rec-Ra L108I en presencia de partículas esféricas de vidrio de 0.2-0.3 mm de diámetro en tubos de PCR y que fueron sometidos a PMSA (Figura 9 b, panel derecho). A medida que la experiencia del laboratorio en el uso de esta técnica aumentaba, fueron adaptándose las condiciones del proceso para promover la generación de PrP recombinantes malplegadas de manera espontánea. Fue así como se comenzó a utilizar volúmenes mayores en tubos de 2 ml que se complementaban con partículas de vidrio de 0.1 mm, lo que permitió observar la aparición de rec-PrP^{res} tras 24 h de PMSA (Figura 9 c).

Independientemente de las condiciones de PMSA utilizadas o de la ronda en la que fueron analizados, todos los productos fueron digeridos con proteinasa K de la misma manera, dando lugar en determinadas ocasiones a fragmentos de rec-PrP^{res} con patrones electroforéticos muy similares, siendo común a todos ellos la presencia de una banda de ~16 kDa. Acompañando a esta banda, se observaron fragmentos de menor peso molecular de entre 5 y 9 kDa, siendo la presencia y la intensidad de estas, las principales características para discernir de manera visual potenciales confórmeros distintos de rec-PrP^{res}. La Figura 13 a muestra algunas de estas diferencias en la composición de los fragmentos detectadas en distintas rondas y condiciones de PMSA, lo que nos llevó a aislar hasta cuatro posibles confórmeros de rec-PrP^{res} que podrían presentar diferencias estructurales entre sí. Estos cuatro productos o semillas priónicas fueron denominadas según las condiciones de PMSA en las que fueron generadas (*st*, del inglés, *small tube* o *bt*, del inglés, *big tube*), el sustrato utilizado (*MI*, del inglés, *Mouse Isoleucine*), el número de réplica técnica que recibieron en el experimento (01, 02, 03...) y según hubiera o no dextrano añadido en el sustrato (*Dx*, cuando la concentración de dextrano en el sustrato es del 0.5 % o *CB*, cuando no añadimos dextrano).

Con el objetivo de estabilizar las rec-PrP^{res} seleccionadas, verificar la consistencia del patrón electroforético observado y comprobar que los distintos confórmeros eran propagables, realizamos varias rondas seriadas de PMSA. Cada una de las cuatro semillas originales se diluyó 1:10 en sustrato rec-Ra L108I y se sometieron a 24 h de propagación por PMSA en presencia de partículas esféricas de

zirconia – sílice de 1.0 mm de diámetro, que han demostrado favorecer la propagación de priones sin generar PrP^{res} de manera espontánea. El producto de la primera ronda de estabilización se volvió a diluir 1:10 en sustrato fresco y el procedimiento se repitió hasta realizar tres rondas seriadas de PMSA. Tal y como se muestra en la Figura 13 b, los patrones de movilidad electroforética de cada semilla se estabilizaron, con ligeras variaciones sobre el cálculo de tamaño inicial de los fragmentos, pero manteniéndose a lo largo de las rondas seriadas y con los fragmentos más predominantes ganando intensidad. Todos los productos derivados de las semillas originales demostraron ser igualmente resistentes al tratamiento con PK. Los cuatro confórmeros bioquímicamente diferentes seleccionados mostraban en todos los casos un fragmento predominante de ~16 kDa característico de los priones recombinantes, pero contenían fragmentos de bajo peso molecular ligeramente diferentes, como el patrón electroforético de stMI-01 Dx que dio lugar a una banda única de aproximadamente ~9 kDa o el confórmero stMI-03 Dx, que mostró dos fragmentos de intensidad similar por encima de los 5 kDa. Por otra parte, la proteína malplegada btMI-05 Dx presentó un fragmento predominante de ~9 kDa y otro menos intenso ligeramente superior a los 5 kDa revelándose muy similar al confórmero stMI-03 Dx, mientras que en el confórmero btMI-09 Dx se detectó el mismo fragmento de ~9 kDa de stMI-01 Dx (Figura 5 c).

Las diferencias observadas en los patrones de movilidad electroforética resultaron insuficientes para determinar si los cuatro productos seleccionados se trataban de distintos confórmeros con características propias. Por lo tanto, una vez estabilizadas, fue necesaria una caracterización bioquímica precisa que nos permitiera distinguirlos entre sí basándonos en otras propiedades. En segundo lugar y, para confirmar la naturaleza de infecciosa de los priones murinos generados espontáneamente mediante PMSA, se realizó una caracterización biológica en modelos animales.

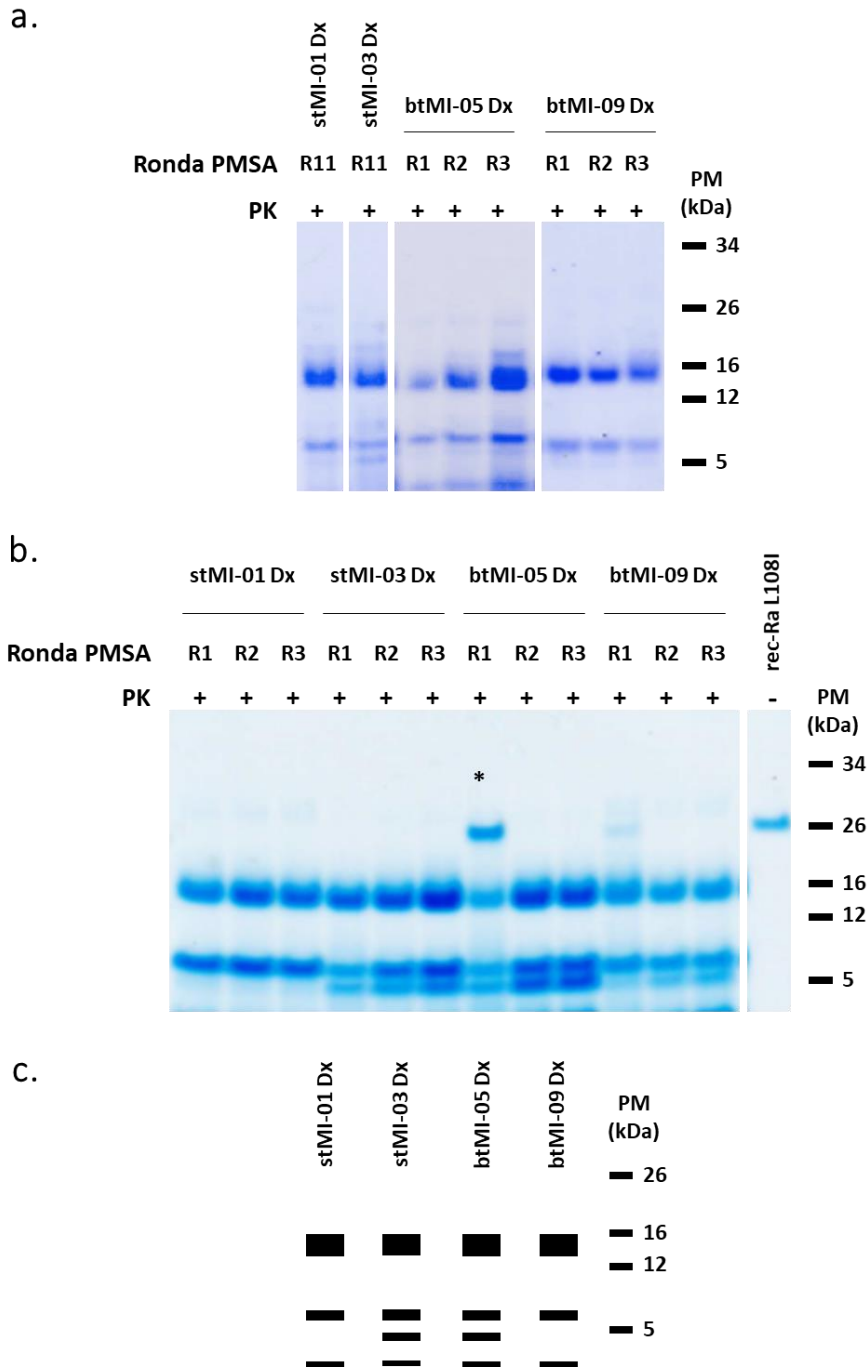


Figura 13. Observación de los patrones de movilidad electroforética de rec-PrP^{res} murina con la variante L108I generadas espontáneamente y seleccionadas por sus diferencias bioquímicas. a) Composición de distintos geles tras electroforesis y tinción de proteína total en los que se identificaron posibles conforméromos de rec-PrP^{res}, atendiendo a diferencias en los perfiles de movilidad electroforética tras su digestión con PK y que indican diferencias bioquímicas. Los conforméromos stMI-01 Dx y stMI-03 Dx se seleccionaron tras 11 rondas de PMSA, surgiendo en distintas réplicas de un mismo experimento, mientras que los conforméromos btMI-05 Dx y btMI-09 Dx fueron detectados en la primera ronda de PMSA en experimentos independientes. Todas las rec-PrP^{res} seleccionadas presentaron el fragmento de ~16 kDa típico de los priones *bona fide* además de distintos fragmentos de menor peso molecular que las distinguen entre sí, salvo en el caso de stMI-01 Dx y btMI-09 Dx que muestran un patrón indistinguible. **b)** Electroforesis y tinción de proteína total que ilustra la estabilidad de los cuatro conforméromos de rec-Ra L108I seleccionados tras su propagación mediante 3 rondas seriadas de PMSA. **c)** a PM: marcador de peso molecular. *En algunos casos se dieron digestiones incompletas en los que además de los fragmentos esperados se observó una banda adicional de ~26 kDa correspondiente a la rec-PrP sin digerir presente en el sustrato.

3. Caracterización bioquímica de los potenciales confórmeros seleccionados de rec-Ra L108I Dx

Cuando observamos por primera vez diferencias en el patrón de peso molecular de algunos productos de rec-PrP^{res}, decidimos realizar una caracterización bioquímica detallada que nos permitiera distinguirlos. Para ello, se evaluaron sus características bioquímicas básicas, la manera en la que se propagan en su propio sustrato utilizando factores restrictivos y la capacidad o no de ser propagadas en distintos sustratos murinos.

3.1. Determinación de las características bioquímicas básicas

La capacidad de distintos materiales para adsorber PrP en la superficie es un hecho conocido, habiéndose demostrado además que los priones adsorbidos en la superficie de diferentes materiales retienen sus propiedades infecciosas (Edgeworth et al., 2009, Mori et al., 2016). Recientemente, este laboratorio ha adaptado la técnica de PMSA para adsorber semillas recombinantes de topillo rojo a partículas esféricas de zirconia – sílice y utilizar estas esferas como semilla en experimentos de propagación, asegurando una cantidad de inóculo más uniforme y reduciendo la variabilidad intra-experimental (Erana et al., 2020b). Aplicando este procedimiento de adsorción, las semillas recombinantes denominadas como stMI-01 Dx, stMI-03 Dx, btMI-05 Dx y btMI-09 Dx (Figura 13) se adhirieron a esferas de zirconia – sílice y con ellas se realizó la caracterización bioquímica.

La adsorción de las semillas de rec-Ra L108I Dx a las partículas esféricas fue llevada a cabo mediante la propagación de las rec-PrP^{res} en presencia de partículas de zirconia – sílice de 1.0 mm, lavadas previamente para eliminar posibles impurezas. Utilizamos estas partículas de zirconia – sílice para propagar las cuatro semillas rec-Ra L108I Dx, permitiendo que la nueva rec-PrP^{res} generada se adhiriera a las partículas tras su malplegamiento. Se utilizaron stMI-01 Dx, stMI-03 Dx, btMI-05 Dx y btMI-09 Dx como semillas por cuadruplicado, que fueron diluidas 1:100 en sustrato fresco compuesto por rec-PrP homóloga y sometidas a una ronda de PMSA de 24 h de duración. El producto líquido de cada una de las cuatro réplicas de cada semilla fue extraído y combinado, homogeneizándolo y conservándolo para su posterior utilización una vez se comprobó la presencia de rec-PrP^{res} tras digerir con PK. De la misma manera, las partículas de zirconia – sílice de los tubos correspondientes a cada semilla fueron recuperadas y lavadas con PBS y H₂O estéril libre de nucleasas para eliminar cualquier resto de rec-PrP^{res} no adherida a la superficie de las partículas. Para comprobar que las rec-PrP^{res} propagadas a partir de las cuatro semillas originales se habían adherido correctamente y mantenían su correspondiente perfil de movilidad electroforética, se llevó a cabo una ronda adicional de PMSA donde únicamente se usaron estas partículas de zirconia – sílice como semilla, sin la adición de rec-

PrP^{res} en formato líquido. Se incluyeron seis réplicas técnicas de cada semilla, cada una de ellas únicamente con 3 partículas esféricas con rec-PrP^{res} adherida y en presencia de sustrato fresco, obteniendo propagación en todos los casos. Como podemos observar en la Figura 14 a, las cuatro semillas de rec-Ra L108I Dx propagadas a partir de partículas esféricas conservaron el mismo patrón de movilidad electroforética que las propagadas mediante la adición de semilla en formato líquido (Figura 13).

En el caso de las semillas stMI-01 Dx y btMI-09 Dx, el patrón de peso molecular es idéntico, con la banda característica de rec-PrP^{res} de ~16 kDa y una segunda banda superior a los 5 kDa. Ambas bandas de rec-PrP^{res} se mostraron nítidas e intensas tras ser digeridas con PK y observadas mediante tinción de proteína total. La semilla stMI-03 Dx también presentó una banda de ~16 kDa, aunque ligeramente menos intensa y un patrón de doble bandeo poco intenso en la zona cercana a los 5 kDa. Por último, la semilla btMI-05 demostró ser idéntica a las semillas stMI-01 Dx y btMI-09 Dx en su banda de ~16 kDa, difiriendo en las bandas de menor peso molecular, donde presentó un doble bandeo compuesto por un fragmento intenso por encima de los 5 kDa y otro, de señal más difusa, por debajo de los 5 kDa. Aunque los pesos moleculares de los fragmentos de rec-PrP^{res} de cada una de las semillas son aproximados debido a la limitación de la técnica, la Figura 14 a sí demuestra el mantenimiento de al menos tres patrones electroforéticos diferentes que se corresponden con las cuatro semillas recombinantes murinas generadas de manera espontánea. Destaca el hecho de que dos de ellas (stMI-01 Dx y btMI-09 Dx) resultan indistinguibles bioquímicamente en un primer momento tras la digestión con PK y la observación mediante electroforesis y tinción de proteína total.

3.1.1. Identificación de los fragmentos proteolíticos de las rec-PrP^{res} mediante mapeo epitópico

Como parte de la caracterización bioquímica básica de las cuatro semillas rec-Ra L108I Dx, realizamos un estudio estructural utilizando anticuerpos que mapean en diferentes regiones de la PrP. Con este estudio tratamos de identificar los fragmentos observados previamente y confirmar que existen diferencias estructurales entre los cuatro confórmeros de PrP^{res} murina generados espontáneamente. Las muestras de rec-PrP^{res} obtenidas tras la adsorción a partículas de zirconia – sílice (Figura 14 a), fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con seis anticuerpos distintos que mapean diferentes regiones de la PrP. Observamos una gran similitud entre las señales obtenidas en las cuatro semillas rec-Ra L108I, tal y como muestra la Figura 14 b. Únicamente detectamos diferencias cuando se utilizó el anticuerpo 12B2, aquel que se une al epítipo WGQGG de la región N-terminal de la PrP. En ese caso, no observamos ningún fragmento que se corresponda con las semillas stMI-01 Dx, btMI-05 Dx y btMI-09 Dx, mientras que sí observamos una banda de bajo peso

molecular en la muestra de stMI-03 Dx. Debido a que estas muestras han sido digeridas previamente con PK, este resultado indica que la semilla stMI-03 Dx presenta alguna diferencia estructural que provoca que el corte realizado por la PK sea más próximo al extremo N-terminal que en el caso de los otros tres confórmeros, lo que permite que el epítipo reconocido por el anticuerpo 12B2 se mantenga intacto tras la proteólisis y así distinguirla inequívocamente del resto. En la Figura 14 c se representa la distribución a lo largo de la zona globular de la PrP de los epítipos reconocidos por los anticuerpos utilizados, lo que permite realizar una aproximación más fina del tamaño e identidad de los fragmentos obtenidos tras el tratamiento con proteasas. De esta manera, los patrones de movilidad electroforética observados mediante tinción de proteína total (Figura 14 a), se complementan con esta información adicional, pudiéndose representar de manera esquemática para facilitar su identificación (Figura 14 d). La banda común a los cuatro confórmeros de ~16 kDa es detectada por todos los anticuerpos excepto el 12B2, indicando que es el resultado de un corte en el extremo N-terminal de la PK posterior al aminoácido 97 de la rec-PrP^{res}. La región cercana a los 5 kDa resulta de interés, pues es a través de ella con la que podemos distinguir estas cuatro semillas priónicas. Los confórmeros stMI-01 Dx y btMI-09 Dx presentan un fragmento de ~9 kDa que es mapeado únicamente por SAF84 y M20, indicando que se compone de la parte más cercana al extremo C-terminal de la PrP. Este mismo fragmento se detecta en la muestra btMI-05 Dx a través de una señal intensa tras la tinción de proteína total (Figura 14 a). Además, se encuentra acompañado de un fragmento de menor peso molecular de ~5 kDa que también podemos observar en la semilla stMI-03 Dx. Este último confórmero presenta una menor intensidad de señal en las bandas asociadas a los fragmentos de ~16 kDa y ~9 kDa, sugiriendo que pueden ser productos originados por cortes parciales de la PK, dando lugar a fragmentos de rec-PrP^{res} cuyo peso molecular no ha sido contemplado en nuestro esquema teórico (Figura 14 d).

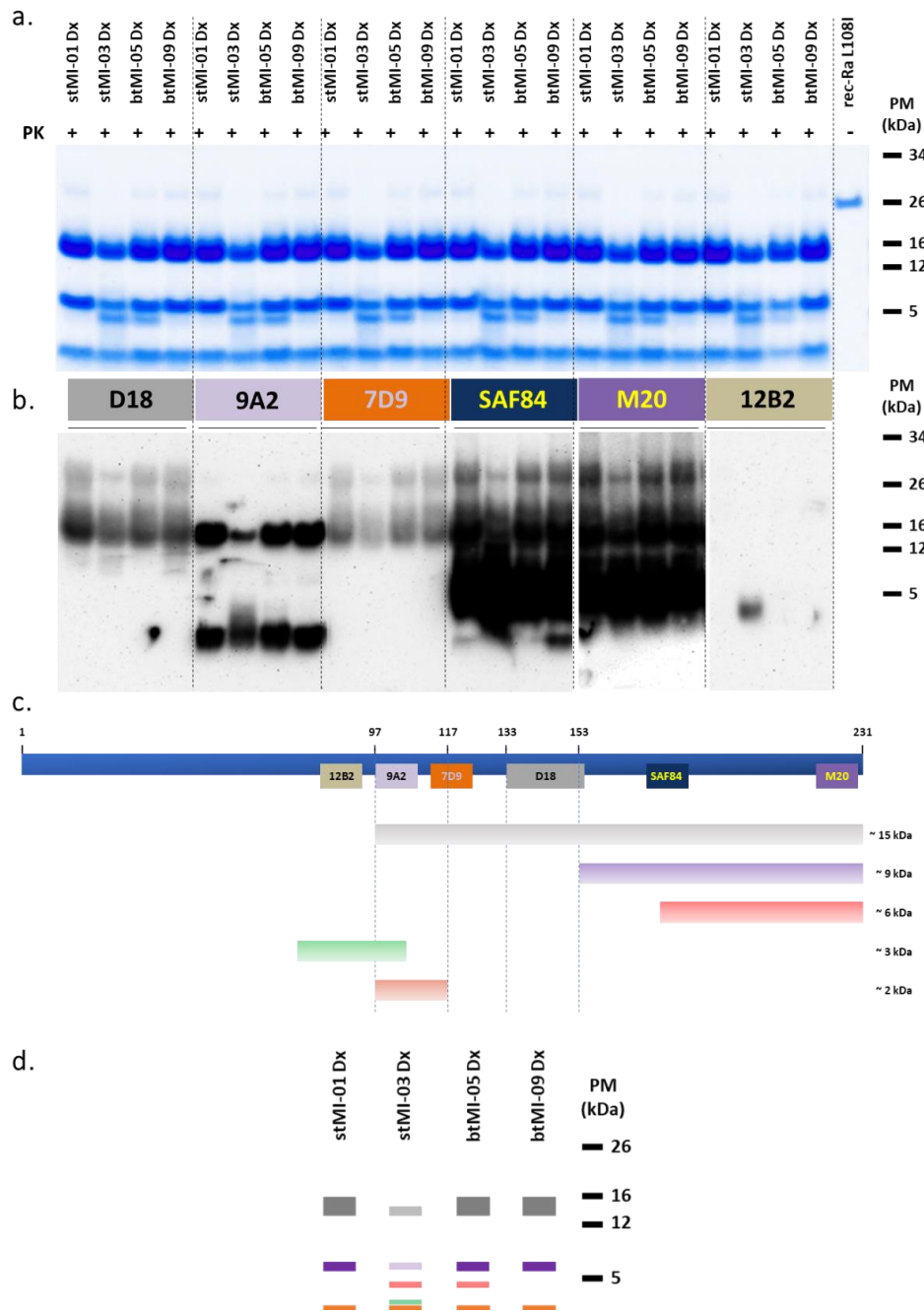


Figura 14. Análisis de los fragmentos proteolíticos de las distintas rec-PrP^{res} murinas con la variante L108I seleccionadas.
a) Electroforesis y tinción de proteína total en el que se visualizaron alternadas seis réplicas de stMI-01 Dx, stMI-03 Dx, btMI-05 Dx y btMI-09 Dx tras su digestión previa con PK y donde se analizaron los distintos perfiles electroforéticos de cada uno de los conformeros. **b)** Electrotransferencia del gel del panel superior para su posterior mapeo epitópico utilizando seis anticuerpos primarios diferentes: 12B2 (1:2500), 9A2 (1:400), 7D9 (1:1000), D18 (1:5000), SAF84 (1:400) y M20 (1: 5000). La banda de ~16 kDa típica de los priones *bona fide* y presente en las cuatro rec-PrP^{res} seleccionadas resultó indetectable con el anticuerpo 12B2, lo que indica que este fragmento es producto del corte en el extremo N-terminal de la PK aproximadamente desde el aminoácido 97. El reconocimiento de los fragmentos por los distintos anticuerpos resultó muy similar para las cuatro rec-PrP^{res}, destacando un fragmento de bajo peso molecular (~3 kDa) en el stMI-03 Dx distinto al resto de acuerdo al reconocimiento por parte del anticuerpo 12B2 **c)** Representación esquemática de la rec-PrP murina señalando los epítomos reconocidos por los anticuerpos utilizados en este análisis y de los distintos fragmentos proteolíticos detectados tras la electrotransferencia y el mapeo epitópico, incluyendo una estimación del peso molecular de cada uno de los cinco fragmentos distintos identificados. **d)** Representación esquemática del perfil de movilidad electroforética de las cuatro rec-PrP^{res} murinas L108I. stMI-01 Dx y btMI-09 Dx resultaron bioquímicamente indistinguibles a través de los análisis realizados, mientras que stMI-03 Dx y btMI-05 Dx presentaron perfiles electroforéticos únicos, con stMI-03 Dx caracterizado por ser la única con un fragmento de ~3 kDa reconocido por el anticuerpo 12B2 y compartiendo ambas un fragmento de ~6 kDa ausente en el resto. PM: marcador de peso molecular.

3.1.2. Ensayo de resistencia a PK

Los fragmentos de distinto peso molecular observados mediante tinción de proteína total y técnicas de *immunoblot* que nos permiten distinguir entre confórmeros, son los productos obtenidos tras ser digeridos por la proteínasa K (PK). La resistencia diferencial a este tratamiento es una de las características de cepa de los priones *bona fide*, por lo que estudiamos si existían diferencias en dicha propiedad. Las cuatro muestras se sometieron a concentraciones crecientes de PK (25, 100, 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g/ml}$). Los resultados fueron visualizados a través de una tinción de proteína total que reveló la alta resistencia a PK que presentaban los cuatro posibles confórmeros de proteína murina malplegada. Tres de las cuatro semillas recombinantes mantuvieron la banda típica de ~ 16 kDa característica de los priones *bona fide* utilizando concentraciones de hasta 1000 $\mu\text{g/ml}$ de PK. Solo la semilla stMI-03 Dx no resistió dicha concentración de PK, mostrando una menor resistencia que el resto de las seleccionadas y sugiriendo que presenta características estructurales distintivas (Figura 15).

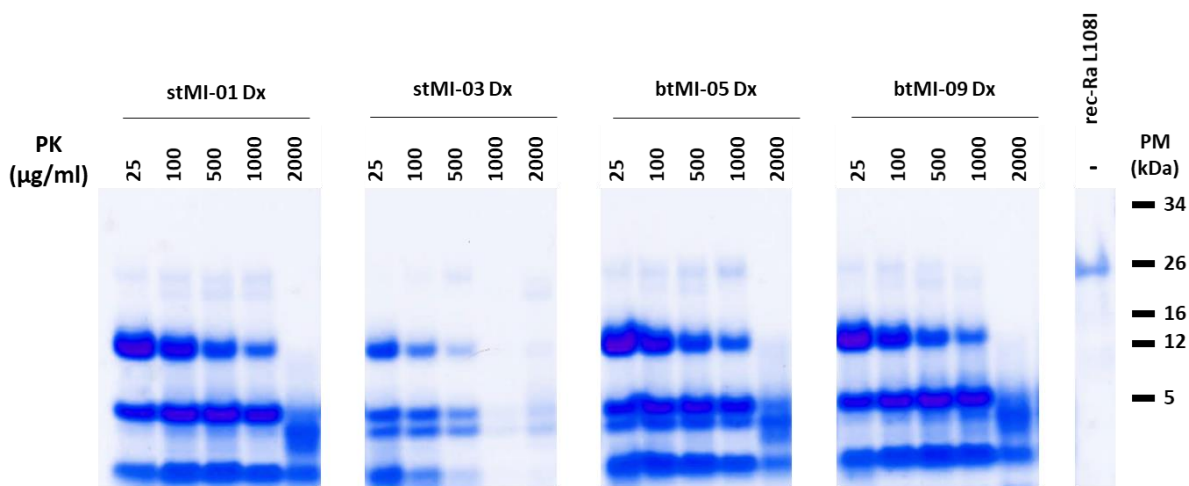


Figura 15. Evaluación de la resistencia a la digestión por proteasa de las rec-PrP^{res} murinas L108I seleccionadas. Electroforesis y tinción de proteína total donde se muestra la digestión de las rec-PrP^{res} murinas L108I obtenidas de forma espontánea mediante PMSA con concentraciones crecientes de PK. Cada una de las rec-PrP^{res} seleccionadas se digirió en las mismas condiciones con 25, 100, 500, 1000 o 2000 $\mu\text{g/ml}$ de PK. Todas presentan gran resistencia a la digestión con PK, conservando su perfil de movilidad electroforética inalterada incluso tras la digestión con 1000 $\mu\text{g/ml}$ de PK, con excepción de stMI-03 Dx, que fue la semilla con menor resistencia a la digestión con PK y con el fragmento de ~ 16 kDa siendo completamente digerida con 1000 $\mu\text{g/ml}$ de PK. PM: marcador de peso molecular.

3.2. Caracterización de la capacidad de propagación de las semillas en sustrato con rec-PrP homóloga utilizando condiciones restrictivas

Con el propósito de complementar la caracterización bioquímica de las cuatro semillas rec-PrP^{res} murinas generadas de manera espontánea mediante PMSA y poder distinguir las entre sí de forma inequívoca, realizamos estudios de propagación utilizando sustrato homólogo a las semillas bajo condiciones restrictivas de malplegamiento.

3.2.1. Capacidad de propagación mediante diluciones seriadas por PMSA

En primer lugar, realizamos un ensayo para testar la habilidad de las cuatro semillas recombinantes murinas para ser propagadas mediante diluciones seriadas tras una ronda de PMSA de 24 h. La capacidad de propagación se evaluó a través de la dilución máxima de la semilla que aún malplegaba la rec-PrP del sustrato. Utilizando como semilla los productos generados a partir de la PMSA realizada con partículas de zirconia – sílice, se realizaron las siguientes diluciones seriadas: 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷, 1:10⁸, 1:10⁹, 1:10¹⁰ y 1:10¹¹. Las muestras diluidas se sometieron a una ronda de PMSA de 24 h en presencia de partículas esféricas de zirconia – sílice, para su posterior digestión con PK y su observación mediante tinción de proteína total. Todas las proteínas malplegadas demostraron tener una alta capacidad de propagación dado que indujeron el malplegamiento en la totalidad de los casos hasta la dilución 1:10⁸. A pesar de que las diferencias no son significativas, las semillas recombinantes stMI-03 Dx y btMI-09 Dx podrían presentar una mayor capacidad de propagación ya que dan lugar a rec-PrP^{res} a diluciones mayores en alguna de las réplicas (Figura 16 a).

3.2.2. Determinación de la temperatura mínima de propagación

El siguiente paso fue estudiar la capacidad de las semillas recombinantes murinas para propagarse a baja temperatura. El objetivo fue determinar cuál es la temperatura mínima a la cual estos confórmers de rec-PrP^{res} malplegaban la rec-PrP de un sustrato homólogo, como una característica distintiva entre sí. Además, dicho ensayo podría ser utilizado para cribar de manera rápida distintas cepas potenciales de rec-PrP^{res}, utilizándolo como método de caracterización complementario a los anteriormente descritos en este apartado. Se realizaron rondas individuales de PMSA de 24 h a diferentes temperaturas, comenzando por 15 °C y llegando hasta los 24 °C. En todos los casos, los productos de las rondas de PMSA fueron digeridos con PK bajo las mismas condiciones y observados mediante tinción de proteína total. Las cuatro semillas recombinantes murinas Ra-L108I Dx malplegaron la rec-PrP de un sustrato homólogo y generaron nueva rec-PrP^{res} a una temperatura mínima de 24 °C, existiendo ligeras diferencias entre ellas. Mientras que la semilla btMI-05 Dx comenzó a propagar a una temperatura de 22 °C y el confórmero stMI-03 Dx a 23 °C, las proteínas malplegadas

stMI-01 Dx y btMI-09 Dx parecían necesitar al menos, una temperatura de 24 °C que les permitiera inducir el malplegamiento de la rec-PrP del sustrato fresco (Figura 16 b). Todas ellas produjeron nueva rec-PrP^{res} a la temperatura habitual de la PMSA de 39 °C. Al igual que en el ensayo de propagación mediante diluciones seriadas, existieron ligeras diferencias entre los confórmeros que, teniendo en cuenta el resto de las características bioquímicas observadas, sugieren que las cuatro semillas seleccionadas podrían representar confórmeros ligeramente distintos con características biológicas distinguibles.

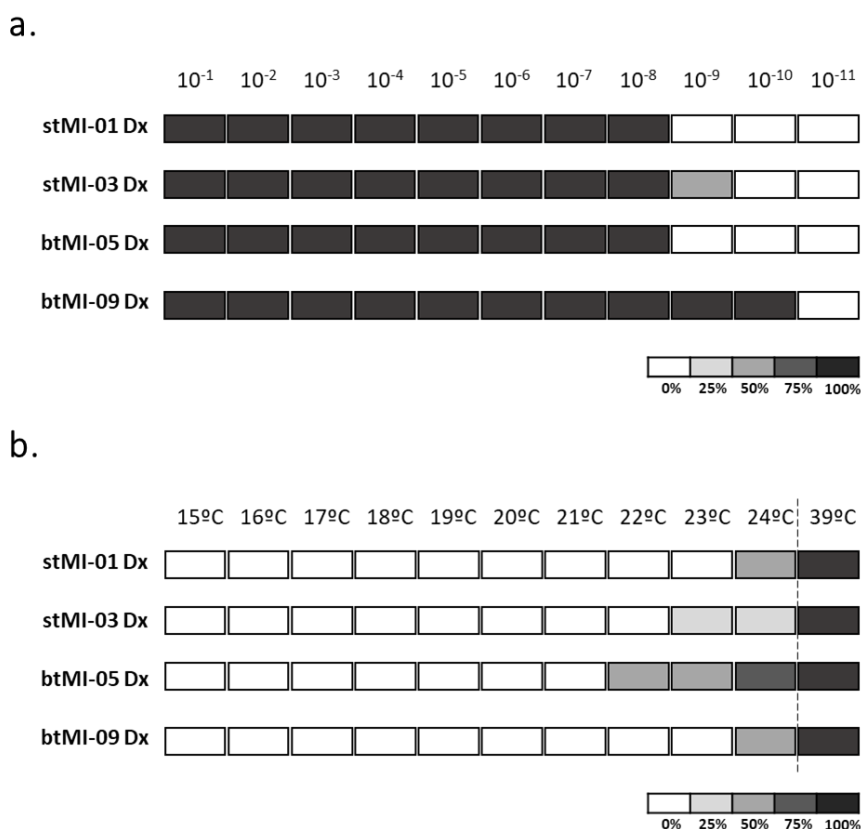


Figura 16. Caracterización de la capacidad de propagación en sustrato homólogo de las rec-PrP^{res} murinas L108I en diluciones seriadas y ante condiciones restrictivas de temperatura. a) Representación gráfica de la dilución máxima de cada rec-PrP^{res} murina seleccionada en la que se detectó propagación tras una ronda de PMSA de 24 h. Las rec-PrP^{res} se diluyeron 1:10¹ – 1:10¹¹ y se sometieron a PMSA, en presencia de partículas esféricas de zirconia – sílice de 1.0 mm. La evaluación de la presencia de rec-PrP^{res} se llevó a cabo mediante digestión con PK, electroforesis y tinción de proteína total del producto de cada dilución tras la ronda de PMSA. Cada dilución se ensayó por cuadruplicado y el porcentaje de réplicas con rec-PrP^{res} detectable aparece señalado con distintas intensidades de gris, tal y como indica la leyenda situada en la parte inferior. Las cuatro rec-PrP^{res} murinas L108I presentaron una gran eficiencia de propagación en diluciones seriadas, ya que todas alcanzaron al menos la dilución 1:10⁸ en todas las réplicas. El confórmero btMI-09 Dx destacó por ser el único capaz de propagar tras una dilución 1:10¹⁰. **b)** Representación gráfica de la capacidad de propagación de las rec-PrP^{res} murinas L108I a temperaturas inferiores a la habitual en PMSA. Se utilizaron como semilla partículas de zirconia – sílice de 1.0 mm con cada una de las rec-PrP^{res} adsorbida a ellas, realizando al menos cuatro réplicas para cada una de las temperaturas testadas. El porcentaje de réplicas con rec-PrP^{res} detectable tras una ronda de PMSA aparece señalado con distintas intensidades de gris, tal y como indica la leyenda situada en la parte inferior. Aunque las cuatro mostraron una capacidad de propagación reducida en PMSA a temperaturas inferiores a 25°C, btMI-05 Dx demostró una mayor capacidad de propagación a baja temperatura.

3.3. Caracterización de la capacidad de propagación de las semillas seleccionadas en sustratos con rec-PrP murinas no homólogas

Tras estudiar algunas de las propiedades básicas de los cuatro confórmers recombinantes murinos generados espontáneamente y comprobar que podemos diferenciarlos mediante ensayos *in vitro*, investigamos la capacidad de estas proteínas malplegadas para propagar en sustratos basados en PrP recombinantes diferentes a la rec-PrP L108I. El objetivo fue respaldar las diferencias observadas previamente entre las distintas proteínas malplegadas y evaluar si alguna de ellas podía adaptarse a la inducción del malplegamiento de otras rec-PrP no homólogas. El fenómeno de adaptación se encuentra íntimamente relacionado con los conceptos de cepa priónica y barrera de transmisión, uno de los aspectos más estudiados en la investigación priónica.

3.3.1. Propagación en sustratos basados en PrP recombinante murina silvestre

Los cuatro confórmers murinos generados espontáneamente mediante PMSA presentaban la mutación L108I, imitando el polimorfismo natural presente en la secuencia de la PrP del topillo rojo. Aunque con la metodología que se disponía en las primeras fases de este estudio se intentó malplegar de manera espontánea sustratos basados en PrP recombinante murina silvestre, no conseguimos obtener rec-PrP^{res} mediante PMSA (Figura 9). Sin embargo, con el doble objetivo de obtener priones recombinantes murinos silvestres y caracterizar de manera detallada el comportamiento de los cuatro confórmers de rec-PrP^{res} L108I, realizamos un ensayo de propagación con sustratos compuestos por distintas PrP recombinantes murinas silvestres. Existen dos variantes polimórficas que se consideran silvestres (genotipo *a*; L108 T189 y genotipo *b*; F108 V189) y que hacen que los ratones presenten distinta susceptibilidad a enfermedades priónicas (Carlson et al., 1988). Se prepararon los siguientes sustratos basados en estas dos variantes polimórficas de la PrP murina: rec-Ra L108 T189 y rec-Ra F108 V189. Las partículas de zirconia – sílice con los cuatro confórmers recombinantes L108I adsorbidos a ellas se utilizaron por cuadruplicado como semillas de la reacción de PMSA convencional en los dos sustratos basados en rec-PrP murina silvestre. Se realizó una única ronda de PMSA de 24 h, tras la cual los productos fueron digeridos con PK para ser observados posteriormente mediante tinción total de proteínas.

Tres de las cuatro semillas rec-Ra L108I Dx propagaron en el sustrato rec-Ra L108 T189, siendo la semilla stMI-03 Dx la única incapaz de malplegar dicho sustrato (Figura 17 a). En aquellos tubos en los que se detectó rec-PrP^{res}, esta presentó patrones electroforéticos idénticos independientemente de la semilla utilizada, pudiéndose observar en todos ellos la banda característica de ~16 kDa y un doble bandeo con fragmentos superiores a ~5 kDa. No se detectaron fragmentos de menor tamaño que compusieran un patrón de peso molecular característico de cada confórmer y que permitieran su

diferenciación (Figura 17 a). En el caso de la propagación en sustrato rec-Ra F108 V189, ninguna de las semillas recombinantes Ra-L108I Dx fueron capaces de malplegar (Figura 17 b). La utilización de dos sustratos basados en dos variantes polimórficas en la PrP murina permitió discriminar entre algunas de las semillas recombinantes cuando se utilizó el sustrato basado en rec-PrP L108 T189 (genotipo *a*), pero no cuando se utiliza sustrato rec-PrP F108 V189 (genotipo *b*).

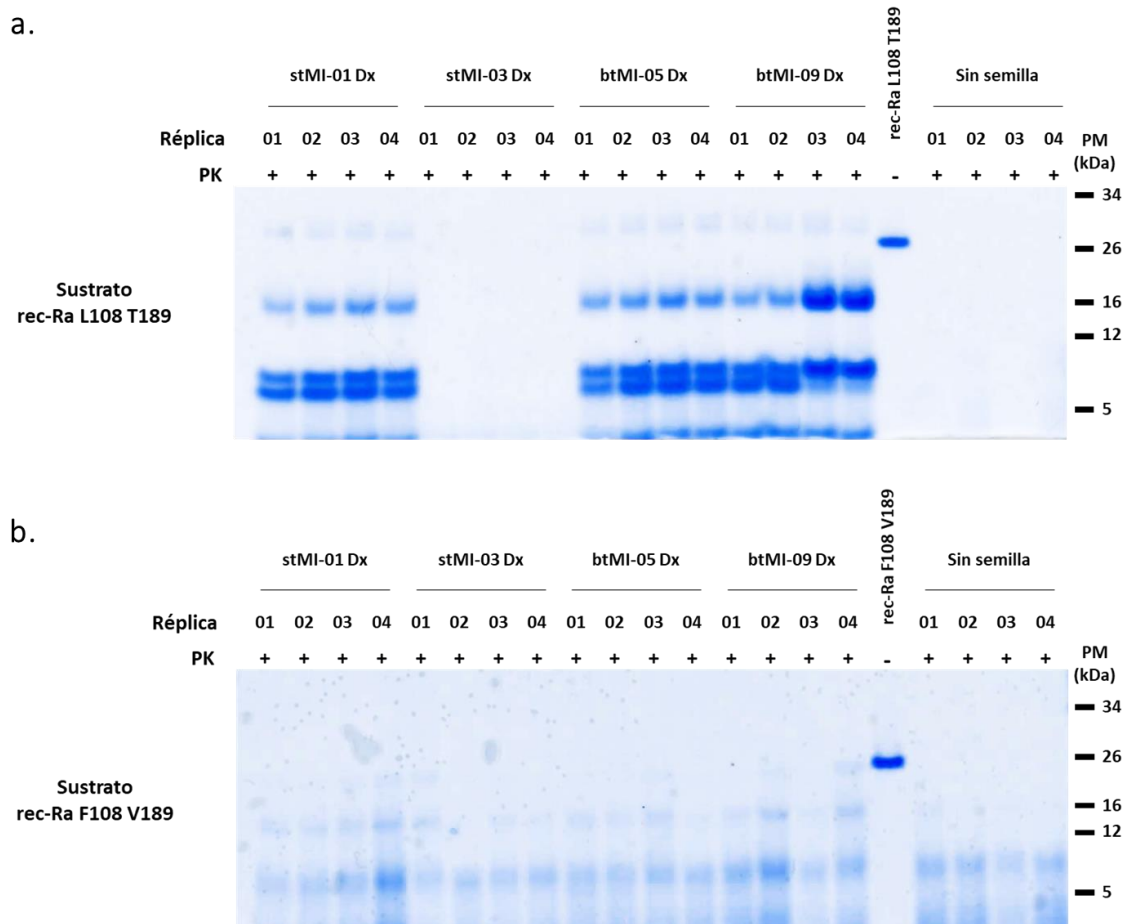


Figura 17. Propagación de las rec-PrP^{res} murinas L108I en sustratos con rec-PrP murinas no homólogas. Las cuatro rec-PrP^{res} murinas L108I se utilizaron como semillas para evaluar su capacidad para malplegar sustratos con rec-PrP murinas silvestres. La capacidad de propagación de cada rec-PrP^{res} se testó por cuadruplicado bajo las mismas condiciones de PMSA en **a)** sustrato con rec-PrP murina silvestre de genotipo *a* (L108 T189). La electroforesis y tinción de proteína total demostró la capacidad de propagación de tres de las cuatro rec-PrP^{res} a expensas de esta rec-PrP no homóloga, con la excepción de la stMI-03 Dx, revelando nuevamente diferencias con el resto. Cabe destacar que se observaron cambios en el perfil de movilidad electroforética respecto a las rec-PrP^{res} murinas L108I utilizadas como semillas tras una ronda de propagación en el sustrato con rec-PrP murina L108 T189. **b)** sustrato con rec-PrP murina silvestre de genotipo *b* (F108 V189). La electroforesis y tinción de proteína total muestra que ninguna de las rec-PrP^{res} murinas L108I pudo propagarse en este sustrato tras una ronda de PMSA. PM: marcador de peso molecular.

3.3.2. Propagación en sustrato con rec-PrP homóloga en ausencia de cofactor

La experiencia de este laboratorio con la técnica de PMCA nos ha llevado al uso de dextrano sulfatado como elemento facilitador para la obtención de PrP^{res} espontánea y altamente infecciosa. Por este motivo, decidimos incluir el dextrano como cofactor en todos los sustratos destinados tanto a la generación espontánea de priones recombinantes murinos como a su caracterización. Al ser el dextrano un elemento aparentemente clave en el malplegamiento *in vitro* de rec-PrP, estudiamos la implicación de su uso o no en la propagación de los cuatro confórmeros rec-Ra L108I Dx generados de manera espontánea. Para ello, preparamos un sustrato basado en rec-PrP Ra-L108I que carecía de dextrano sulfatado, produciendo el sustrato denominado rec-Ra L108I CB. Los cuatro confórmeros recombinantes originados en dextrano y adsorbidos a partículas de zirconia – sílice se utilizaron por triplicado como semilla en una única ronda de PMSA realizada bajo los parámetros convencionales, digiriéndose todos los productos obtenidos con PK y visualizándose mediante tinción de proteína total. Las cuatro semillas rec-Ra L108I Dx propagaron en un sustrato libre de dextrano tras una ronda de PMSA. Sin embargo, como puede observarse en la Figura 18, se perdieron los patrones electroforéticos originales característicos de cada confórmero (Figura 14 a). En particular, se obtuvieron dos tipos de patrones electroforéticos fácilmente distinguibles: un patrón caracterizado por la disminución de la señal del fragmento de 16 kDa y un patrón caracterizado por un fragmento de 16 kDa mayoritario con una señal muy significativa y con fragmentos menores claramente minoritarios y poco definidos. El patrón electroforético de los confórmeros stMI-01 Dx, btMI-05 Dx y btMI-09 Dx se igualó tras su propagación en ausencia de cofactor, mostrando el primer patrón descrito y fue el confórmero stMI-03 Dx el único que mostró el patrón con una prominente señal en el fragmento de 16 kDa.

Los estudios bioquímicos realizados hasta el momento nos han permitido distinguir al menos tres y posiblemente cuatro isoformas recombinantes de PrP^{res} que, pese haber sido generadas en condiciones de PMSA similares (en ocasiones idénticas), han emergido como cuatro confórmeros diferentes que en algunos casos presentan comportamientos claramente distintivos a nivel bioquímico (a excepción de stMI-01 Dx y btMI-09 Dx que únicamente se distinguieron por su capacidad de propagación en dilución seriada). La caracterización realizada sugiere además que las cuatro rec-PrP malplegadas espontáneamente presentan las propiedades clásicamente atribuibles a un prion *bona fide*. Sin embargo, esta afirmación no puede completarse hasta que los confórmeros rec-Ra L108I Dx induzcan una enfermedad priónica en un modelo animal, observando además distintas propiedades biológicas que nos permitan considerarlas como cepas diferentes.

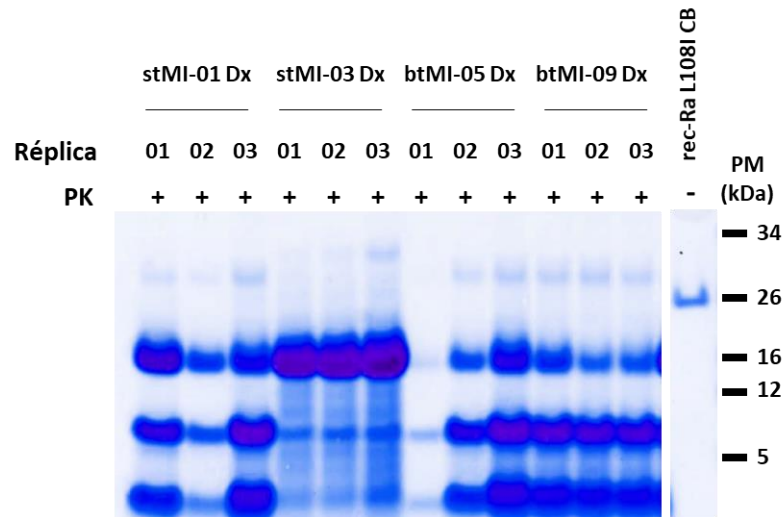


Figura 18. Propagación de las rec-PrP^{res} murinas L108I en sustratos con rec-PrP homóloga en ausencia de cofactor. Electroforesis y tinción de proteína total tras la digestión con PK de los productos procedentes de tres réplicas sometidas a una ronda de PMSA de 24 h en la que se evaluó la capacidad de las cuatro rec-PrP^{res} murinas L108I para propagar en sustrato con rec-PrP homóloga pero carente de dextrano sulfatado como cofactor. Se utilizaron como semillas partículas de zirconio – sílice con las rec-PrP^{res} adsorbidas a ellas. Las cuatro rec-PrP^{res} murinas generadas en presencia de dextrano indujeron la formación de rec-PrP^{res} en ausencia de cofactor, aunque se observaron cambios notables en el perfil electroforético de los productos resultantes con respecto a las originales (Figura 14 a). La semilla stMI-03 Dx mostró el cambio más llamativo por su diferencia respecto al patrón observado en el resto, adquiriendo una única banda muy intensa de ~16 kDa y mostrando otros fragmentos proteolíticos de menor tamaño con un patrón de tipo escalera (*ladder* en inglés). PM: marcador de peso molecular.

4. Caracterización biológica de los conformeros de rec-Ra L108I Dx

La generación espontánea de priones *in vitro* que presenten todas las características de un prion *bona fide* de forma consistente y reproducible es un reto importante que, hoy en día, continúa sin resolverse en el campo de la investigación priónica. La inclusión de la técnica PMSA como herramienta para la generación espontánea de priones puede suponer una mejora considerable en este apartado, pues se trata de un método de producción robusto y que permite un mejor control de los parámetros de la técnica. Los primeros resultados de esta tesis doctoral describen la formación de rec-PrP^{res} de forma espontánea utilizando PrP murina con la mutación del topillo rojo L108I y, dentro de las proteínas malplegadas producidas, la observación de diferentes patrones electroforéticos que podrían indicar la generación de distintas cepas. La caracterización bioquímica realizada, aporta evidencias suficientes como para afirmar que se han generado cuatro conformeros de rec-PrP^{res} que presentan diferentes propiedades *in vitro*, que se mantienen de manera estable a lo largo de las múltiples rondas de PMSA. Sin embargo, estos conformeros de rec-PrP^{res} deben demostrarse infecciosos *in vivo* antes de poder considerarlos priones *bona fide*. De manera adicional, la detección de diferencias en sus propiedades biológicas confirmaría que las cuatro proteínas malplegadas de rec-Ra L108I Dx son *de facto* cepas priónicas diferentes.

4.1. Infectividad en el modelo transgénico sobreexpresor de PrP^C murina L108I

Con el objetivo de demostrar que los priones murinos generados espontáneamente mediante PMSA presentan las características propias de un prion *bona fide*, testamos la infectividad de los cuatro confórmers recombinantes en un modelo animal que sobreexpresa entre tres y cuatro veces la PrP^C murina L108I (TgMoL108I).

4.1.1. Determinación de la capacidad de propagación *in vitro* de las semillas recombinantes mediante PMCA

Dado el desconocimiento sobre la infectividad de las proteínas malplegadas a testar y teniendo en cuenta que la presencia de un resultado negativo (falta de infectividad) implicaría al menos 2 años hasta su confirmación, se realizó un estudio *in vitro* que trató de prever el comportamiento de estas proteínas *in vivo*. Una alternativa a los ensayos *in vivo* para evaluar el potencial infectivo de un prion es el uso de la técnica PMCA para malplegar PrP^C procedente de encéfalos (Fernandez-Borges et al., 2017a). Así, las rec-PrP^{res} murinas se utilizaron como semillas para inducir el malplegamiento de un sustrato basado en homogeneizados de encéfalos de ratones transgénicos TgMoL108I. Este modelo animal fue seleccionado para los estudios *in vitro* por presentar una PrP^C de secuencia idéntica a las proteínas que se deseaba testar como semillas de propagación. Además, el alto nivel de expresión de PrP que presentan estos ratones transgénicos facilita la conversión *in vitro*, haciendo de la PMCA una herramienta muy eficiente (Mays et al., 2009).

Para comprobar si los priones recombinantes murinos generados son capaces de malplegar la PrP^C de este sustrato, las cuatro semillas fueron diluidas 1:10, 1:10², 1:10³ y 1:10⁴ en un homogeneizado encefálico de TgMoL108I por duplicado y se sometieron a dos rondas seriadas de PMCA de 6 h cada una. Para controlar la aparición de PrP^{Sc} espontánea y asegurar ausencia de contaminación, se incluyeron en ambas rondas cuatro muestras adicionales sin semilla. Los resultados se evaluaron mediante digestión con PK y *Western blot*. En primer lugar, no se observó ninguna señal de PrP^{Sc} en los tubos que no contenían semilla, confirmando la ausencia de contaminaciones cruzadas y/o la formación espontánea de PrP malplegada. Por el contrario, las cuatro semillas recombinantes malplegaron la PrP^C de TgMoL108I tras las primeras 6 h de PMCA (Figura 19), incluso tras ser diluidas 100 veces. El estudio comparativo de la capacidad de propagación de las distintas diluciones no mostró grandes diferencias entre los confórmers. Este resultado positivo utilizando una tecnología que había demostrado imitar fielmente la forma en la que los priones se propagan *in vivo*, sugirió por primera vez que todas las proteínas malplegadas podrían presentar un comportamiento infeccioso.

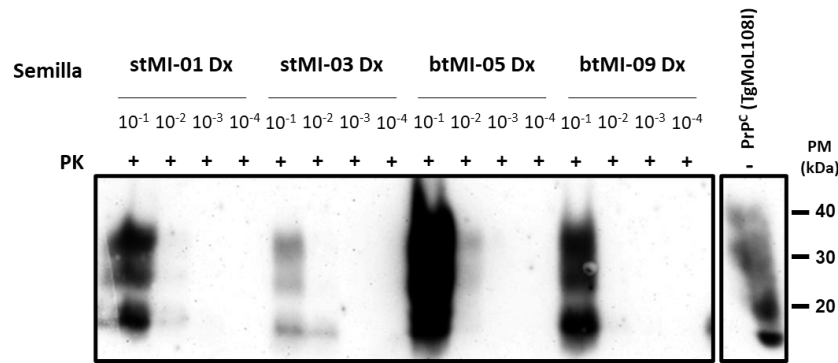


Figura 19. Determinación de la infectividad potencial *in vivo* de las rec-PrP^{res} murinas L108I evaluada mediante PMCA utilizando homogeneizado de encéfalo de ratones transgénicos TgMoL108I como sustrato. a) Western blot de los productos resistentes a PK obtenidos tras dos rondas de PMCA con las rec-PrP^{res} stMI-01 Dx, stMI-03 Dx, btMI-05 Dx y btMI-09 Dx como semilla y utilizando homogeneizado de encéfalo de ratones TgMoL108I que sobreexpresan la PrP^C murina L108I. Con el objetivo de testar la capacidad de las rec-PrP^{res} murinas L108I para malplegar PrP^C de encéfalo, estas se diluyeron 1:10, 1:10², 1:10³ y 1:10⁴ y sometieron a una ronda de PMCA de 6 h. Tras ese periodo, los productos de la primera ronda se diluyeron 1:10 en sustrato fresco y se sometieron a una nueva ronda de PMCA de la misma duración. La capacidad de propagación se evaluó mediante digestión con PK de los productos de cada ronda de PMCA, electroforesis y Western Blot utilizando el anticuerpo monoclonal D18 (1:5 000). Todas las rec-PrP^{res} diluidas 1:10 fueron capaces de malplegar *in vitro* la PrP^C presente en homogeneizado cerebral de TgMoL108I, indicando potencial infectividad *in vivo*. PrP^C (TgMoL108I): homogeneizado de encéfalo de ratones TgMoL108I sin digerir utilizado como sustrato, PM: marcador de peso molecular.

4.1.2. Determinación de la infectividad *in vivo* utilizando un modelo transgénico sobreexpresor de PrP^C murina L108I

La experiencia de este laboratorio con priones recombinantes obtenidos mediante PMSA ha permitido establecer una correlación directa entre la infectividad *in vitro* e *in vivo* utilizando proteínas recombinantes del topillo rojo (Erana et al., 2019), mientras que en priones recombinantes murinos obtenidos por PMSA, esta correlación no ha sido aún confirmada. Debido al éxito que mostraron los cuatro confórmeros rec-Ra L108I Dx malplegando *in vitro* la PrP^C procedente de encéfalos de ratones TgMoL108I (Figura 19), realizamos un ensayo *in vivo* utilizando este mismo modelo para determinar si estas proteínas malplegadas podían ser consideradas priones *bona fide*. Para ello, las cuatro proteínas malplegadas rec-Ra L108I Dx se inocularon intracerebralmente en ratones TgMoL108I, añadiendo un grupo de ratones sin inocular. Los ratones TgMoL108I acaban por desarrollar una EET atípica de manera espontánea, por lo que la inclusión de un grupo de animales sin inocular permite controlar el tiempo de aparición de enfermedad espontánea en esta línea transgénica. No fue necesario incluir un grupo control que demostrase la susceptibilidad de esta línea a la infección de priones, ya que en trabajos previos de este laboratorio se comprobó el éxito de la cepa clásica RML (del inglés, *Rocky Mountain Laboratory*) para infectar al 100% de los animales mostrando unos tiempos de incubación de 93 ± 5 días post inoculación (dpi) ± SEM (Venegas, 2018).

Los cuatro inóculos fueron infecciosos *in vivo*, tras inducir una enfermedad priónica en el modelo transgénico con distintos periodos de incubación y con diferentes tasas de ataque (Tabla 3, Figura 20). Así, el inóculo stMI-01 Dx fue el único que mostró una tasa de ataque incompleta (42.8%) y un tiempo de incubación de 277.5 ± 36.37 dpi. Este periodo fue lo bastante prolongado como para que algunos de los ratones transgénicos de este grupo comenzasen a desarrollar la enfermedad espontánea propia de este grupo. La clínica de esta patología es indistinguible de una enfermedad inducida y bioquímicamente se caracteriza por presentar un patrón atípico de PrP^{Sc} con una única banda de ~5 kDa, que permite distinguirlas fácilmente (Tabla 3, Figura 21 b). El inóculo stMI-03 Dx presentó una tasa de ataque del 100% y un tiempo de incubación de 206.8 ± 11.18 dpi. Por su parte, el inóculo btMI-05 Dx dio lugar a un periodo de incubación por debajo de los 200 días (173.2 ± 3.54 dpi), manteniendo una tasa de ataque completa y el inóculo btMI-09 Dx presentó también una tasa de ataque del 100% y un periodo de incubación de 158 ± 4.76 dpi, lo que lo convierte en el más rápido de los cuatro confórmers en provocar enfermedad priónica. El análisis de los cerebros de los animales afectados se realizó mediante digestión por PK y *Western blot*, mostrando acumulación de PrP^{Sc} resistente a proteasas en todos los casos. El patrón electroforético nos permitió distinguir entre los casos atípicos causados por el trasfondo genético de esta línea transgénica y casos de enfermedad priónica clásica, consecuencia de la inoculación con los confórmers murinos recombinantes (Tabla 3, Figura 21 b).

Tabla 3. Estudio de la infectividad de las cuatro rec-PrP^{res} murinas L108I Dx mediante inoculación en ratones TgMoL108I. Las cuatro rec-PrP^{res} murinas L108I seleccionadas se inocularon intracerebralmente en el modelo TgMoL108I, que sobreexpresa la PrP^C murina L108I. Se muestran los datos de tasa de ataque, periodo de incubación y resultado del análisis mediante *Western blot* de la presencia de PrP^{Sc} con patrón clásico, además de lesiones espongióticas y marcaje de PrP^{res} detectadas mediante el estudio anatomopatológico. WB: *Western blot*, H/E: tinción de hematoxilina – eosina, IHQ: inmunohistoquímica, N.D.: por determinar.

Cepa	Sustrato	1 ^{er} pase (TgMoL108I)				
		Tasa de ataque	Días post-inoculación	Patrón clásico de PrP ^{res} (WB)	Espongiosis (H/E)	PrP ^{res} (IHQ)
stMI-01 Dx	rec-MoL108I Dex	42.8% [⌘]	277.5 ± 36.37	3/7 [⌘]	2/7	5/7
stMI-03 Dx	rec-MoL108I Dex	100%	206.8 ± 11.18	6/6	N.D.	N.D.
btMI-05 Dx	rec-MoL108I Dex	100%	173.2 ± 3.54	9/9	9/9	9/9
btMI-09 Dx	rec-MoL108I Dex	100%	158 ± 4.76	5/5	1/5	5/5
No inoculado	-	0% [⌘]	349.83 ± 18.04	0/14 [⌘]	N.D.	N.D.

⌘: La tasa de ataque se calcula teniendo en cuenta únicamente a los animales sacrificados por efecto del inóculo de rec-PrP^{res} y que presentaron un patrón clásico de PrP^{Sc} en *Western blot* (⌘).

⌘: Los ratones TgMoL108I sufren de manera espontánea una EET caracterizada por una PrP^{res} de patrón atípico detectable mediante *Western blot*, por lo que la observación de PrP^{Sc} de patrón clásico descarta que los signos observados se debieran a la enfermedad espontánea que desarrolla este modelo.

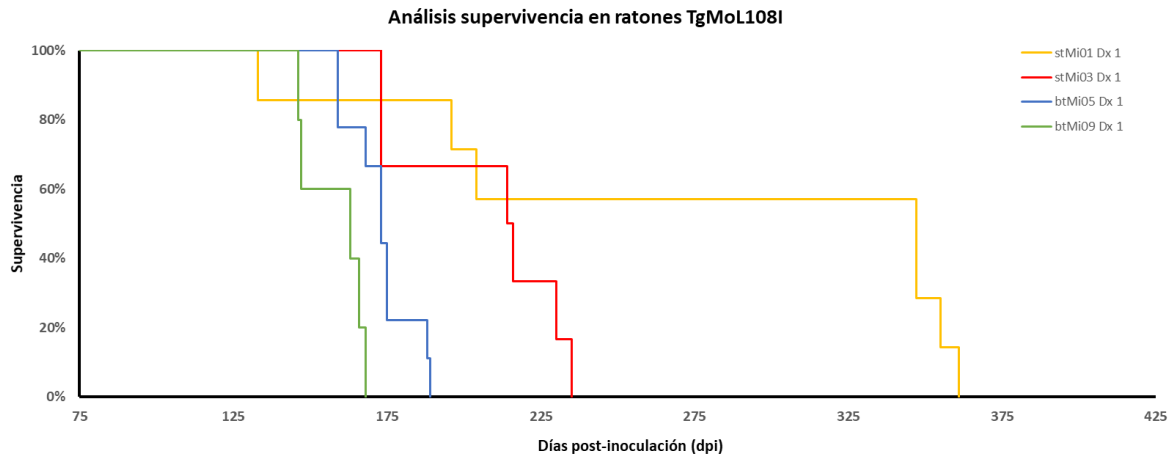


Figura 20. Estudio de la supervivencia de los ratones TgMoL108I inoculados con las cuatro rec-PrP^{res} murinas seleccionadas. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, que permiten la visualización de la dispersión en los tiempos de incubación incluidos en la Tabla 3, de los ratones TgMoL108I inoculados con stMI-01 Dx (amarillo), stMI-03 Dx (rojo), btMI-05 Dx (azul) y btMI-09 Dx (verde) que confirman su infectividad. Los inóculos btMI-05 Dx y btMI-09 Dx indujeron una EET en el modelo animal con los periodos de incubación más cortos. Mientras que el inóculo stMI-03 Dx mostró unos tiempos más largos y una dispersión mayor, y la cepa stMI-01 Dx destacó por presentar los tiempos de incubación más prolongados y la mayor dispersión. Un análisis detallado de los animales inoculados con stMI-01 Dx permitió detectar dos grupos entre los animales inoculados: un subgrupo de 3 animales sacrificados antes de los 210 dpi, que presentaron PrP^{Sc} con patrón clásico y cuya EET se debió por tanto al inóculo de rec-PrP^{res} y otro subgrupo de 4 animales sacrificados con periodos de incubación superiores a los 340 dpi que presentaron PrP^{Sc} con patrón atípico y que por consiguiente, sucumbieron a la EET espontánea propia de este modelo, considerándose por ello que la tasa de ataque de st-MI-01 resultó incompleta.

Los estudios anatomopatológicos de los cerebros de estos animales transgénicos revelaron las alteraciones propias de una enfermedad priónica a nivel histológico e inmunohistoquímico. Aunque se detectó PrP^{res} y cambios espongiiformes en los cerebros de los animales inoculados con cada una de las cuatro semillas recombinantes murinas, la distribución de estas lesiones podría ser diferentes según el inóculo de rec-PrP^{res} utilizado atendiendo a los resultados preliminares de los que se disponen. Algunos de los ratones TgMoL108I inoculados con la cepa stMI-01 Dx presentaron espongiosis, asociadas en su mayoría a una forma senil de deterioro causada por la edad avanzada que alcanzaron algunos de los animales de este grupo. Según observaciones preliminares, la inmunohistoquímica (IHQ) reveló pequeños depósitos de PrP^{res} (patrón de punteado fino) en cerebelo y placas extracelulares de PrP^{res} localizadas en el tálamo y distribuidas por todo el cerebelo, siendo observadas en corteza y vermis cerebelosas (imágenes pendientes de obtención). El inóculo btMI-05 Dx causó espongiosis en todos los ratones inoculados, en los que se observaron tanto pequeñas acumulaciones de PrP^{res} (punteado fino y grosero) como placas extracelulares muy evidentes, destacando de nuevo la presencia de estas formaciones en el cerebelo, concretamente en la sustancia blanca de la corteza cerebelosa. Las cortezas occipital y temporal de todos los animales mostraron lesiones, mientras que la frontal y parietal se presentaron prácticamente sin alteraciones.

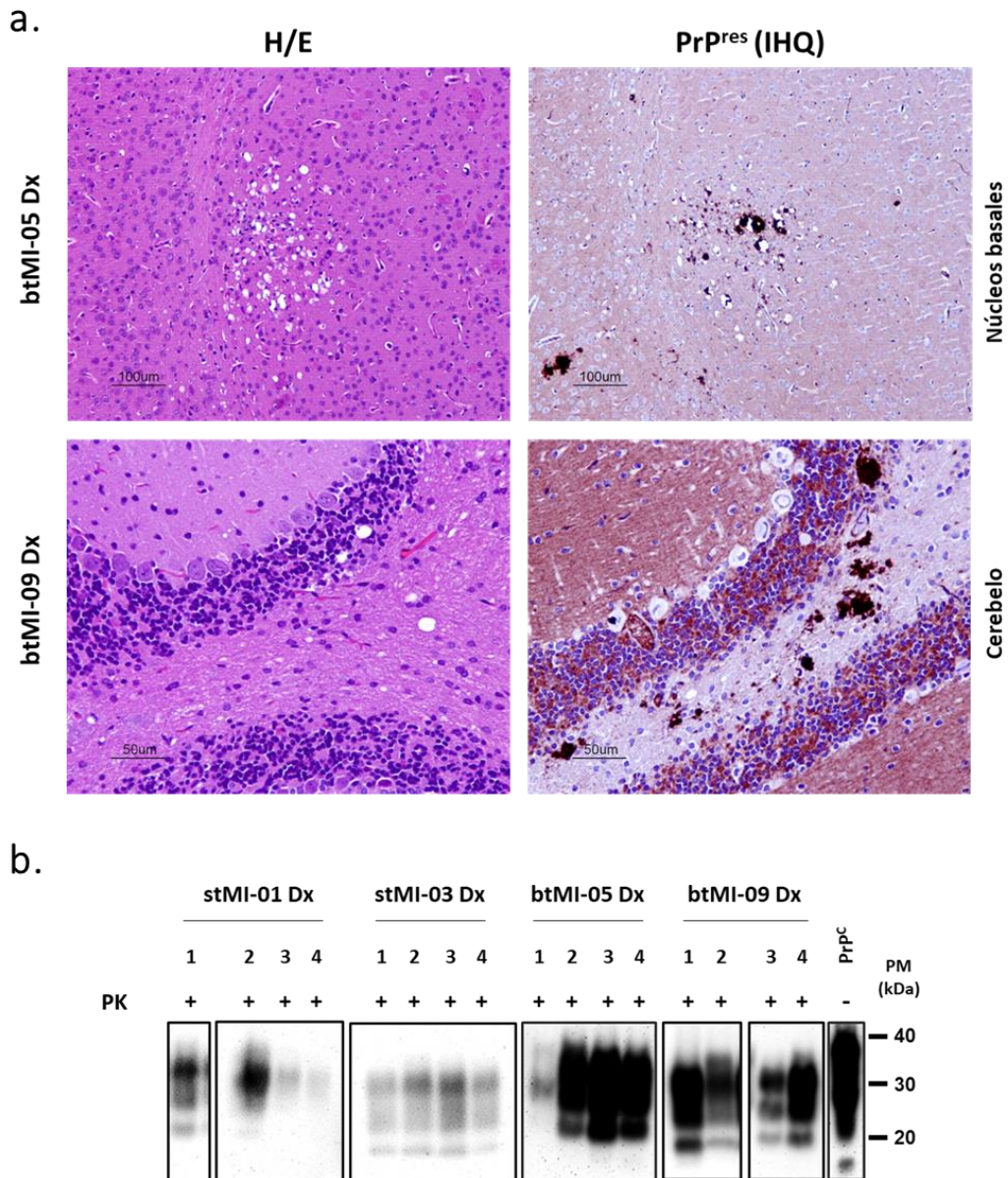


Figura 21. Análisis histopatológico para la evaluación de las lesiones causadas por dos de los inóculos rec-Ra L108I Dx en el modelo TgMol108I y estudio bioquímico de la PrP^{Sc} acumulada en el encéfalo de los animales tras su inoculación con las cuatro rec-PrP^{res} murinas L108I. a) Se realizó una evaluación de las lesiones espongiformes y de la presencia de depósitos de PrP^{res} en los animales TgMol108I inoculados con las cepas rec-Ra L108I Dx para confirmar el desarrollo de una EET en estos animales, de los que se muestran los correspondientes a btMI-05 Dx y btMI-09 Dx por carecer aún de imágenes definitivas para los otros dos inóculos. Una de las mitades de los encéfalos fue fijada con paraformaldehído y embebida en parafina, para posteriormente realizar cortes que se destinaron a la tinción con hematoxilina-eosina (H/E) para evaluar lesiones espongíóticas y al estudio inmunohistoquímico (IHQ) para la detección de PrP^{res}, utilizando el anticuerpo 2G11 (1:1 000). Los animales inoculados con btMI-05 Dx presentaron colocalización de lesiones espongíóticas y depósitos de PrP^{res} en ciertas de las áreas de estudio, como los núcleos basales. Este tropismo no fue observado en el caso de la cepa btMI-09 Dx que, aunque causó una vacuolización moderada en los animales de experimentación, indujo la formación de grandes depósitos de PrP^{res} de tipo placa. **b)** Tras el sacrificio de los ratones TgMol108I que presentaron signos compatibles con una EET, la otra mitad del encéfalo de cada animal fue homogeneizada y digerida con PK para la posterior detección de PrP^{Sc} mediante electroforesis y *Western blot*, utilizando para ello el anticuerpo D18 (1:5 000). Pudo detectarse PrP^{Sc} en todos los animales inoculados con stMI-01, stMI-03, btMI-05 y btMI-09, confirmando la infección priónica y observándose un patrón de movilidad electroforética clásica claramente distinguible del patrón atípico que caracteriza la patología espontánea que desarrolla este modelo. PM: Marcador de peso molecular.

Las alteraciones espongiiformes y los depósitos de PrP^{res} colocalizaron en ciertas áreas observadas, como podemos observar en la Figura 21 a, donde se muestra la coincidencia de espongiosis y depósitos de PrP^{res} en regiones concretas de la sustancia blanca de los núcleos basales, apuntando a un posible tropismo de esta cepa por esta región. A diferencia de la cepa anterior, los animales inoculados con btMI-09 Dx presentaron espongiosis de manera minoritaria, estando ausente en la mayoría de ellos. Sin embargo, todos ellos mostraron acúmulos de PrP^{res} muy intensos, pudiéndose apreciar placas extracelulares incluso sin la tinción de la técnica IHQ. Dichas acumulaciones se distribuyeron por todo el encéfalo, especialmente en la región del tálamo, los núcleos basales y todo el cerebelo, incluyendo corteza, vermis y médula cerebelosa. Aunque es necesaria la realización de un análisis más exhaustivo a nivel histológico e inmunohistoquímico de los encéfalos de estos ratones que permita elaborar un perfil lesional de distribución por áreas, las observaciones preliminares aquí descritas nos permitieron confirmar la presencia de enfermedad priónica en los ratones TgMoL108I inoculados con las cuatro semillas recombinantes. Dichas observaciones apuntan además a que los cuatro confórmeros rec-Ra L108I Dx inoculados pueden ser considerados cepas priónicas diferentes. La tasa de ataque incompleta de uno de los confórmeros, los distintos periodos de incubación y los datos obtenidos en los estudios neuropatológicos, apoyaron el hecho de que los confórmeros recombinantes de PrP L108I Dx generados espontáneamente mediante PMSA son cuatro cepas diferentes.

4.2. Infectividad en un modelo murino silvestre

Uno de los principales problemas a los que se ha enfrentado la generación de priones recombinantes, es que muchas preparaciones de rec-PrP malplegadas *in vitro* únicamente eran capaces de inducir una EET *in vivo* en modelos que sobreexpresaban PrP^C y que acaban por desarrollar una enfermedad priónica independientemente de si eran inoculados o no con PrP^{res} exógena. Este hecho llevó a considerar que estas rec-PrP^{res} podían no ser capaces de causar una enfermedad priónica *de novo*, sino que únicamente aceleraban un proceso que ocurriría igualmente debido a la condición preexistente de sobreexpresión de la PrP^C. Las cuatro cepas recombinantes murinas L108I Dx descritas en los apartados anteriores de esta tesis doctoral se han comportado como un prion *bona fide*, causando una prionopatía en ratones TgMoL108I. No obstante, este modelo sobreexpresa la PrP^C L108I murina y desarrolla eventualmente enfermedad priónica de manera espontánea. Aunque la EET que desarrollan dichos ratones es atípica y puede distinguirse fácilmente por su tiempo de incubación y el patrón electroforético atípico de la PrP^{res}, para despejar cualquier duda acerca de la infectividad de las cepas recombinantes murinas, realizamos diferentes ensayos utilizando un modelo animal silvestre, valiéndonos para ello de ratones C57BL/6.

4.2.1. Inoculación en un modelo murino silvestre de homogeneizados de encéfalos de TgMoL108I previamente infectados con las semillas recombinantes

La primera aproximación para evaluar si las cuatro cepas rec-Ra L108I Dx podían propagarse en un modelo murino silvestre, fue utilizar como inóculo los homogeneizados cerebrales de los ratones TgMoL108I que habían sucumbido en el bioensayo anterior. La realización de un segundo pase en estudios *in vivo* en el campo de los priones se utiliza para confirmar la transmisibilidad de los aislados utilizados, así como para estudiar la estabilidad y/o adaptabilidad de las cepas priónicas. Esto es particularmente importante cuando se desean evaluar aislados o preparaciones que presentan alguna peculiaridad distintiva respecto al hospedador, como es el caso de utilizar inóculos basados en proteínas recombinantes que difieren de la PrP^C de encéfalo por carecer de glicosilación y del GPI para el anclaje a la membrana. Por este motivo, cuatro encéfalos de ratones TgMoL108I que habían sido inoculados con cada una de las cepas rec-Ra L108I Dx fueron homogeneizados e inoculados intracerebralmente en ratones C57BL/6, añadiendo un grupo de ratones sin inocular.

En la fecha en la que se escribe esta tesis doctoral, se han reportado signos clínicos o realizado algunos sacrificios tras la inoculación del segundo pase en todos los grupos de experimentación excepto uno (Tabla 4, Figura 22). Estos ratones no manifiestan signos tras más de 400 días desde la fecha de inoculación, está compuesto por animales inoculados con el producto stMI-01 Dx>TgMoL108I, cuyo inóculo original (stMI-01 Dx) fue el único en presentar una tasa de ataque incompleta, además del periodo de incubación más largo (Tabla 3). El 100% de los animales inoculados con el homogeneizado encefálico previamente inoculado con stMI-03 Dx mostró signos de enfermedad a 133 ± 5.01 dpi, lo que supuso una disminución en el tiempo de incubación de más del 30% respecto al primer pase. El aislado btMI-05 Dx>TgMoL108I se inoculó más tarde y aún no se dispone de los resultados finales. Sin embargo, 2/5 animales mostraron signos clínicos recientemente y fueron sacrificados, siendo su periodo de incubación hasta la fecha de 274.4 ± 27.41 dpi y suponiendo un retraso de al menos 100 días respecto al primer pase. Una situación similar detectamos con el inóculo btMI-09 Dx>TgMoL108I, que presentó una tasa de ataque del 100% y un periodo de incubación de 190.71 ± 15.18 dpi. La prolongación de los tiempos de incubación en ambos grupos de animales con respecto al primer pase puede explicarse por el nivel de expresión de PrP^C de los ratones TgMoL108I utilizados, en comparación con los niveles de PrP^C que presentan los ratones C57BL/6 y que suponen un modelo de experimentación más cercano a la realidad de la enfermedad. El análisis preliminar de los cerebros de los animales afectados hasta la fecha se ha realizado mediante digestión por PK y observación por *Western blot*, mostrando un patrón clásico de PrP^{Sc} resistente a proteasas. Los estudios anatomopatológicos de estos animales se encuentran actualmente en curso, aunque se

espera que revelen diferencias que nos permitan distinguir estas cuatro cepas de priones recombinantes de manera aún más clara que en el primer pase en el modelo de sobreexpresión.

Tabla 4. Estabilización de las cepas rec-Ra L108I Dx mediante un segundo pase en ratones de genotipo silvestre tras su inoculación en el modelo TgMoL108I. Cuatro encéfalos de TgMoL108I que habían desarrollado enfermedad priónica tras su inoculación con las cuatro semillas rec-Ra L108I Dx fueron homogeneizados y utilizados como inóculo en un segundo pase en ratones silvestres C57BL/6. Se muestran los datos de tasa de ataque, periodo de incubación y resultado del análisis mediante *Western blot* de la presencia de PrP^{Sc} con patrón clásico, además de lesiones espongióticas y marcaje de PrP^{Res} detectadas mediante el estudio anatomopatológico. WB: *Western blot*, H/E: tinción de hematoxilina – eosina, IHQ: inmunohistoquímica, N.D.: por determinar.

Cepa	Sustrato	2° pase (C57BL/6)				
		Tasa de ataque	Días post-inoculación	Patrón clásico de PrP ^{Res} (WB)	Espongiosis (H/E)	PrP ^{Res} (IHQ)
stMI-01 Dx>TgMoL108I	rec-MoL108I Dex	0/7 [†]	400>	N.D	N.D.	N.D.
stMI-03 Dx>TgMoL108I	rec-MoL108I Dex	100%	133 ± 5.01	8/8	N.D.	N.D.
btMI-05 Dx>TgMoL108I	rec-MoL108I Dex	2/5 [†]	274.4 ± 27.41	1/2 [†]	N.D.	N.D.
btMI-09 Dx>TgMoL108I	rec-MoL108I Dex	100%	190.71 ± 15.18	4/7	N.D.	N.D.
No inoculado	-	0/7	360>	N.D.	N.D.	N.D.

†: Resultados provisionales debido a que para los grupos señalados el estudio sigue en curso a fecha de depósito de esta tesis doctoral

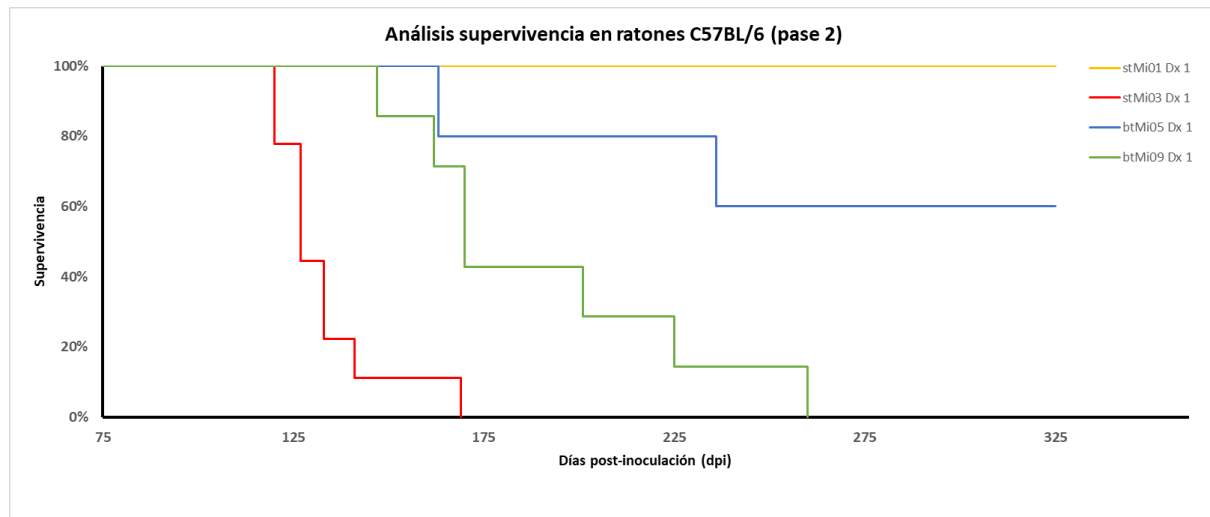


Figura 22. Estudio de la supervivencia de los ratones C57BL/6 inoculados con encéfalos de ratones TgMoL108I previamente infectados con las cuatro cepas rec-Ra L108I Dx. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier que permiten la visualización de la dispersión en los tiempos de incubación incluidos en la Tabla 4, de los ratones C57BL/6 inoculados con encéfalos de ratones TgMoL108I infectados previamente con los inóculos stMI-01 Dx (amarillo, actualmente en curso), stMI-03 Dx (rojo), btMI-05 Dx (azul, actualmente en curso) y btMI-09 Dx (verde). Tras su paso por el modelo sobreexpresor TgMoL108I, las cepas stMI-03 Dx y btMI-09 Dx fueron las que indujeron una EET de forma más rápida en un segundo pase en ratones de genotipo silvestre. Mientras que la cepa stMI-05 Dx, una de las más rápidas en TgMoL108I, muestra una prolongación del tiempo de incubación en este modelo, estando hoy en día el estudio en curso. La cepa stMI-01 Dx que mostró tasas de ataque incompletas y los tiempos de incubación más prolongados mantiene la tendencia, no habiéndose observado tras más de 350 días post-inoculación signos de enfermedad priónica en ninguno de los animales inoculados.

4.2.2. Determinación de la capacidad de propagación *in vitro* de las semillas recombinantes mediante PMCA en modelo murino silvestre

Una vez comprobamos que los inóculos rec-Ra L108I Dx son capaces de infectar un modelo silvestre tras un primer pase en TgMoL108I, valoramos la posibilidad de que tuviesen potencial para inducir una enfermedad priónica directamente en ratones silvestres C57BL/6. Antes de evaluar la infectividad de nuestros inóculos en un modelo murino silvestre, realizamos un ensayo *in vitro* para determinar su capacidad de malplegar la PrP^C de ratones silvestre mediante PMCA. Para ello, las rec-PrP^{res} murinas L108I Dx se utilizaron como semillas para inducir el malplegamiento de un sustrato basado en homogeneizados de encéfalos de ratones C57BL/6. De la misma manera que en el ensayo del Resultado 4.2 A, las cuatro cepas recombinantes fueron diluidas 1:10², 1:10³ y 1:10⁴ en homogeneizado cerebral de C57BL/6 y se sometieron a dos rondas seriadas de PMSA de 24 h cada una por duplicado. Como controles de la aparición de PrP^{Sc} espontánea y de contaminación cruzada, se incluyeron en ambas rondas cuatro muestras sin semilla, pero con la misma cantidad final de dextrano sulfatado (0.05% (p/v)) que los demás tubos de experimentación.

Los resultados se evaluaron mediante digestión con PK y posterior *Western blot*, revelando en primer lugar que las cuatro cepas rec-Ra L108I Dx eran capaces de malplegar *in vitro* la PrP^C de encéfalo de C57BL/6, existiendo diferencias entre cepas. En la Figura 23 podemos observar el resultado del malplegamiento inducido por las cuatro cepas recombinantes diluidas tras dos rondas de PMCA. El inóculo stMI-01 Dx es el menos eficiente, mostrando apenas señal correspondiente a PrP^{res} en la dilución mínima y en su segunda ronda de PMCA. El inóculo stMI-03 Dx presenta un comportamiento similar, aunque la dilución 1:10² malpliega de manera clara la PrP^C de C57BL/6 tras dos rondas de PMCA. Los resultados de ambos inóculos en el malplegamiento de la PrP^C de un modelo silvestre *in vitro* concuerdan con el comportamiento que presentaron *in vivo* en el modelo TgMoL108I (Tabla 3), en los que mostraban los tiempos de incubación más largos y, en el caso del inóculo stMI-01 Dx, una tasa de ataque incompleta. Esta correlación se observó también para las otras dos semillas, que demostraron ser las más eficientes a la hora de malplegar PrP^C *in vitro* y presentaron a su vez, los tiempos de incubación más cortos en el bioensayo con TgMoL108I. Como podemos ver en la parte inferior de la Figura 23, la cepa btMI-05 Dx dio lugar a PrP^{res} aun diluida hasta 1:10⁴ tras dos rondas de PMCA. En cuanto a la cepa btMI-09 Dx, presenta el mismo comportamiento en su segunda ronda de PMCA con el añadido de que es el único confórmero capaz de malplegar la PrP^C de un homogeneizado de C57BL/6 en tan solo 24 h de PMCA, tras ser diluido 1:10² veces. Estos resultados indican que las cuatro cepas espontáneas rec-Ra L108I Dx tienen la capacidad de convertir la PrP^C de un homogeneizado encefálico silvestre en PrP^{Sc}, presentando distintos grados de eficacia que

correlacionan con los tiempos de incubación observados en los estudios *in vivo* realizados anteriormente en modelo sobreexpresor.

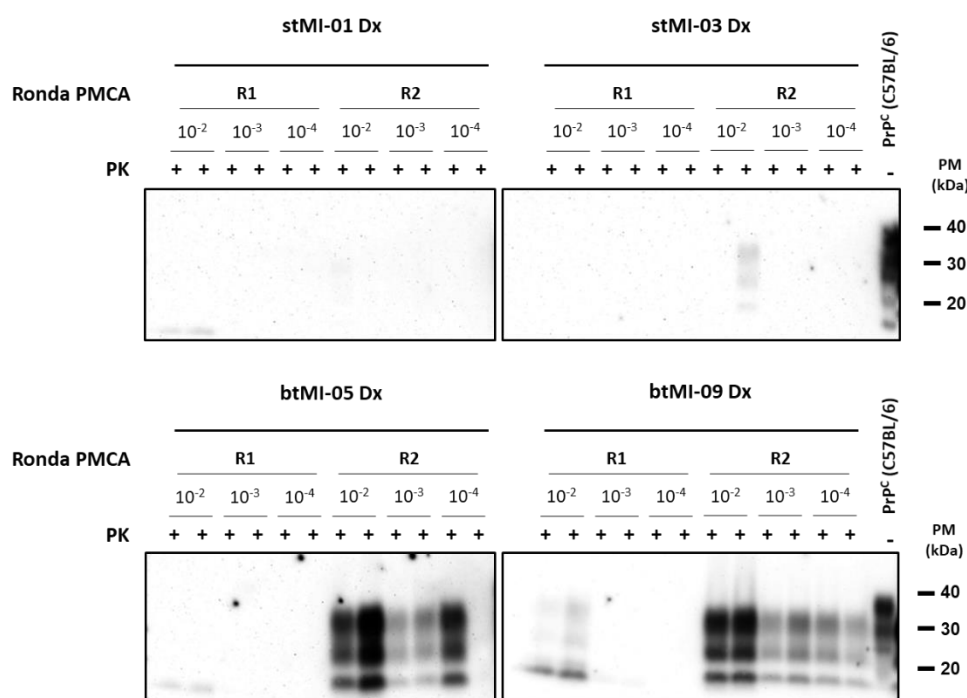


Figura 23. Determinación de la infectividad potencial *in vivo* mediante PMCA basada en sustrato con PrP^C de ratones silvestres C57BL/6 de las PrP recombinantes murinas malplegadas espontáneamente por PMSA. *Western blot* de los productos obtenidos tras dos rondas de PMCA con las semillas stMI-01 Dx, stMI-03 Dx, btMI-05 Dx y btMI-09 Dx en sustrato basado en homogeneizado cerebral de ratones silvestres C57BL/6. Con el objetivo de testar la capacidad de las PrP recombinantes malplegadas (rec-PrP^{res}) murinas L108I para malplegar la PrP^C murina cerebral de un modelo más cercano a la realidad que presenta niveles normales de expresión de PrP^C, estas semillas fueron diluidas 1:10², 1:10³ y 1:10⁴ y se sometieron a una ronda de PMCA de 24 h. Tras ese periodo, los productos de la primera ronda se diluyeron 1:10 en sustrato fresco y se sometieron a una nueva ronda de PMCA de la misma duración. La evaluación de los resultados se llevó a cabo mediante la digestión con proteinasa K (PK) de los productos de cada ronda de PMCA, electroforesis y *Western Blot* utilizando el anticuerpo monoclonal D18 (1:5 000). La semilla stMI-01 Dx fue la única incapaz de malplegar *in vitro* la PrP^C de este modelo murino silvestre, mientras que la cepa stMI-03 Dx únicamente lo hizo en la segunda ronda de PMCA. Por el contrario, las cepas btMI-05 Dx y btMI-09 Dx demostraron ser más eficaces a la hora de malplegar la PrP^C de ratones C57BL/6, destacando la cepa btMI-09 Dx como la potencialmente más infectiva en este modelo. PrP^C (C57BL/6): homogeneizado de encéfalo de ratones C57BL/6 sin digerir utilizados como sustrato para mostrar las diferencias con la rec-PrP^{res} obtenida en PMCA, PM: marcador de peso molecular.

4.2.3. Determinación de la infectividad *in vivo* en modelo murino silvestre

La experiencia de este laboratorio en la evaluación de la infectividad de inóculos, tanto de origen encefálico como recombinantes, mediante PMCA ha resultado siempre en una correlación entre los estudios *in vitro* e *in vivo* (Fernandez-Borges et al., 2017a, Erana et al., 2019). Partiendo de esa premisa y, tras haber comprobado que las cuatro cepas rec-Ra L108I Dx eran capaces de inducir enfermedad en ratones silvestres C57BL/6 tras un primer pase en TgMoL108I y que podían malplegar PrP^C de ratón silvestre de manera directa *in vitro*, decidimos evaluar la infectividad de las semillas recombinantes en un tercer bioensayo en ratones de genotipo silvestre, eliminando cualquier duda sobre una posible aceleración de una patología preexistente en TgMoL108I y demostrando definitivamente que se trata

de priones *bona fide* con características distintivas de cepa. Las cuatro cepas recombinantes fueron inoculadas intracerebralmente en ratones silvestres C57BL/6 siguiendo el mismo protocolo que en los anteriores experimentos *in vivo*. A fecha de depósito de esta tesis doctoral, este bioensayo se encuentra aún en curso, ya que al utilizar en este caso un modelo silvestre que no sobreexpresa PrP^C, se esperan tiempos de inoculación más largos que los obtenidos tras la inoculación directa en TgMoL108I (Tabla 3). Además, en este caso existe una barrera polimórfica entre las cepas recombinantes a testar (L108I) y la PrP^C receptora de los ratones silvestres (L108), que podría incrementar aún más la duración de este bioensayo. A pesar de ello, hemos podido observar que el 100% de los animales inoculados con la cepa btMI-09 Dx presentó signos clínicos que posteriormente condujeron a su sacrificio, arrojando un periodo de incubación medio de 178.83 ± 13.3 dpi. El análisis de los cerebros de este grupo se realizó detectando PrP^{res} mediante *Western blot* tras una digestión con PK, mostrando un patrón clásico de PrP^{Sc} en cinco de los seis cerebros analizados, lo que confirma la presencia de enfermedad priónica en estos ratones. Por otra parte, aunque se han realizado sacrificios en los grupos de experimentación inoculados con las cepas stMI-03 Dx y btMI-05 Dx, únicamente se ha detectado PrP^{res} en dos animales que recibieron la cepa btMI-05 Dx (Figura 24). No han podido realizarse estudios anatomopatológicos hasta la fecha al encontrarse el bioensayo en una fase muy temprana.

Tabla 5. Estudio de la infectividad de las cuatro cepas rec-Ra L108I Dx mediante inoculación en ratones de genotipo silvestre. Las cuatro rec-PrP^{res} murinas L108I seleccionadas, se inocularon intracerebralmente en ratones silvestres C57BL/6. Se muestran los datos de tasa de ataque, periodo de incubación y resultado del análisis mediante *Western blot* de la presencia de PrP^{Sc} con patrón clásico, además de lesiones espongióticas y marcaje de PrP^{res} detectadas mediante el estudio anatomopatológico. WB: *Western blot*, H/E: tinción de hematoxilina – eosina, IHQ: inmunohistoquímica, N.D.: por determinar.

Cepa	Sustrato	1 ^{er} pase (C57BL/6)				
		Tasa de ataque	Días post-inoculación	Patrón clásico de PrP ^{res} (WB)	Espongiosis (H/E)	PrP ^{res} (IHQ)
stMI-01 Dx	rec-MoL108I Dex	0/7 [†]	250>	N.D.	N.D.	N.D.
stMI-03 Dx	rec-MoL108I Dex	1/6 [†]	218	0/1 [†]	N.D.	N.D.
btMI-05 Dx	rec-MoL108I Dex	5/6 [†]	150.3 ± 15.68	2/5 [†]	N.D.	N.D.
btMI-09 Dx	rec-MoL108I Dex	100%	178.83 ± 13.3	5/6	N.D.	N.D.
No inoculado	-	0/7	360>	N.D.	N.D.	N.D.

†: Resultados provisionales debido a que para los grupos señalados el estudio sigue en curso a fecha de depósito de esta tesis doctoral

Pese a que la infectividad *in vivo* de todos los inóculos murinos no ha podido ser testada al encontrarse el bioensayo aún en desarrollo, los resultados preliminares obtenidos para los inóculos btMI-05 Dx y btMI-09 Dx nos confirman que al menos dos de los confórmeros obtenidos espontáneamente por PMSA son capaces de infectar un modelo murino silvestre. Atendiendo al ambiente en que se han generado estas cepas recombinantes y comparándolas con otros estudios de generación espontánea de priones, atribuimos la versatilidad del sustrato rec-Ra L108I Dx para originar diferentes confórmeros a la combinación de isoleucina en su secuencia de PrP y a la presencia del cofactor dextrano sulfatado en el medio. Ambos factores serán estudiados de manera individual, profundizando en el posible papel que pueden desempeñar en el evento espontáneo de malplegamiento y en la obtención de distintos confórmeros.

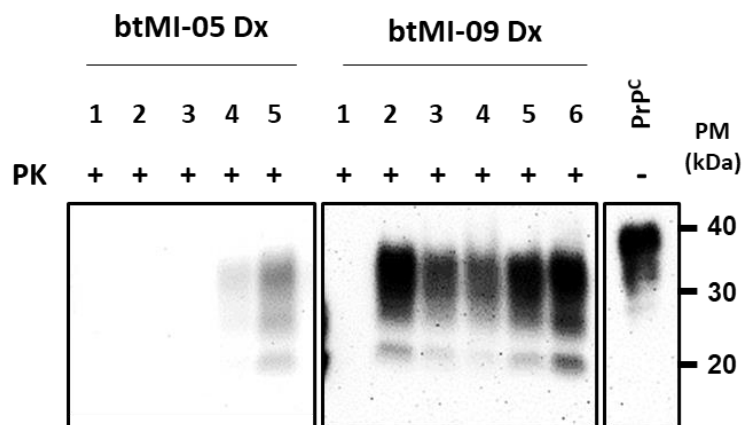


Figura 24. Estudio bioquímico de la PrP^{Sc} acumulada en el encéfalo de ratones de genotipo silvestre inoculados con las cepas btMI-05 Dx y btMI-09 Dx. Tras el sacrificio de los ratones C57BL/6 que presentaron signos compatibles con una EET, una mitad del encéfalo de cada animal fue homogeneizada y digerida con PK para la posterior detección de PrP^{Sc} mediante electroforesis y *Western blot*, utilizando el anticuerpo SAF83 (1:400). Pudo detectarse PrP^{Sc} en 2 de los 5 animales sacrificados hasta la fecha tras ser inoculados con btMI-05 Dx y en 5 de los 6 animales inoculados con la cepa btMI-09 Dx, confirmando que estas semillas pueden ser infecciosas en el modelo murino silvestre. PM: Marcador de peso molecular.

5. Papel del cofactor: ausencia y presencia de dextrano

Tras demostrar que los priones recombinantes murinos producidos *in vitro* espontáneamente presentan las características de cuatro cepas diferentes de priones *bona fide* capaces de inducir una EET en modelos animales, se evaluó el rol que desempeñaba el cofactor en el malplegamiento espontáneo y en las propiedades de dichas cepas. Los datos recopilados por este laboratorio en los últimos años apuntan a que el dextrano puede ser un elemento de capital importancia a la hora de generar formas malplegadas infecciosas *in vivo* de manera homogénea o dar lugar a determinados confórmeros, pero no imprescindible para el evento de malplegamiento. Esta información, nos llevó a profundizar en el análisis de las cuatro semillas rec-Ra L108I Dx que ya observamos que eran capaces de propagar en sustrato carente de cofactor en el apartado 3.3. (Figura 18), en el que se detectó además un cambio en el patrón electroforético de las proteínas malplegadas resultantes. La detección de un patrón de peso molecular único por parte de unas de las rec-PrP^{res} nos condujo a profundizar más en las consecuencias que puede desencadenar la ausencia de dextrano en las formas malplegadas de rec-Ra L108I, prolongando así el ensayo expuesto anteriormente en la caracterización bioquímica y permitiendo estudiar posibles alteraciones en las características bioquímicas de las semillas utilizadas ante la adición de nuevo del cofactor y el efecto que estos cambios pueden suponer en la infectividad de los nuevos confórmeros adaptados a un entorno sin cofactor respecto a las cepas originales.

5.1. Análisis de las propiedades bioquímicas tras la propagación en ausencia de cofactor

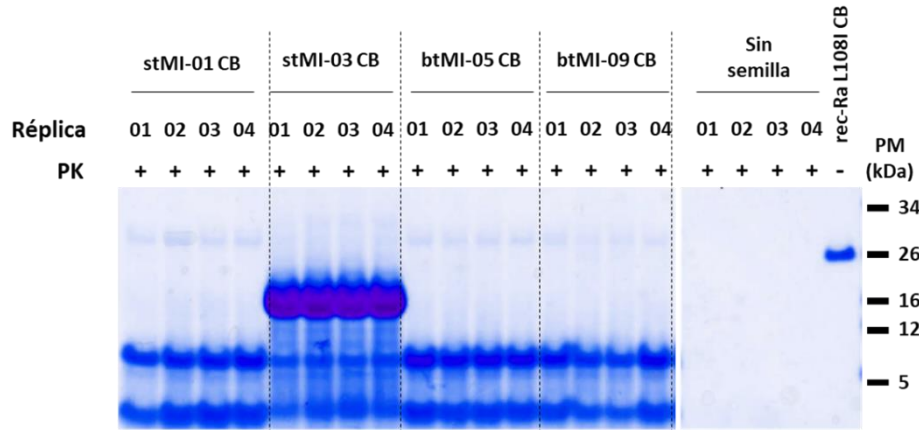
De la misma manera que en la caracterización bioquímica de los cuatro confórmeros rec-Ra L108I Dx originales, en los siguientes ensayos utilizamos como semillas partículas esféricas de zirconia – sílice con los nuevos confórmeros adaptados a la ausencia de cofactor adsorbidos a su superficie.

5.1.1. Mantenimiento de la propagación sin dextrano y adsorción a partículas esféricas de zirconia – sílice

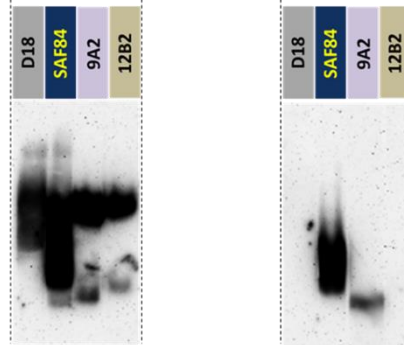
Se tomó como punto de partida la propagación preliminar presentada en el apartado 3.3. (Figura 18), donde las cuatro semillas rec-Ra L108I Dx fueron propagadas con éxito durante una ronda de PMSA en un sustrato basado en rec-PrP Ra-L108I sin dextrano sulfatado añadido (sustrato rec-Ra L108I CB). Utilizando como semilla los productos generados en la tercera ronda de PMSA, realizamos dos pases adicionales bajo las mismas condiciones, esta vez diluyendo 1:10² cada una de las cuatro semillas en sustrato rec-Ra L108I CB y añadiendo a cada tubo partículas de zirconia – sílice de 1.0 mm de diámetro. El producto líquido de las réplicas de cada una de las semillas fue digerido con PK y

observado por tinción de proteína total, distinguiendo en todos ellos la presencia de rec-PrP^{res} a pesar de la ausencia de dextrano sulfatado en el medio. Las partículas de zirconia – sílice de los tubos correspondientes a cada semilla fueron recuperadas y lavadas en dos ocasiones con PBS y posteriormente, con H₂O estéril libre de nucleasas para eliminar cualquier resto de rec-PrP^{res} líquida no adherida y asegurar la eliminación total del cofactor. El siguiente paso fue comprobar que las nuevas rec-PrP^{res} adaptadas a solo CB seguían siendo capaces de adherirse a la superficie de las partículas de zirconia – sílice y mantener su capacidad propagativa y sus patrones de peso molecular estabilizados. Para ello, se realizó una ronda adicional de PMSA utilizando como semilla las partículas de zirconia – sílice lavadas y obtenidas del pase anterior. Se incluyeron cuatro réplicas técnicas de cada uno de los confórmeros a testar, cada una de ellas con 3 partículas esféricas con rec-PrP^{res} adherida y en presencia de sustrato fresco rec-Ra L108I CB. Para asegurar que las proteínas malplegadas que se observan en esta adaptación a sustrato sin dextrano sulfatado no son fruto de contaminación cruzada ni de la generación espontánea, se incluyeron cuatro tubos únicamente con sustrato y partículas de zirconia – sílice sin rec-PrP^{res} adsorbida, sirviendo como controles negativos del procedimiento. Con la excepción de los controles negativos, todas las muestras presentaron rec-PrP^{res} tras ser digeridas con PK y visualizadas mediante electroforesis y tinción de proteína total. Como puede observarse en la Figura 25 a, los patrones de peso molecular iniciales de los confórmeros originales (Figura 14 a), que empezaron a sufrir modificaciones durante la fase preliminar de adaptación a sustrato sin dextrano sulfatado (Figura 18), se han estabilizado tras la realización de rondas seriadas de PMSA dando lugar a patrones electroforéticos nuevos. Una vez adaptadas completamente las cuatro semillas rec-Ra L108I Dx al sustrato rec-Ra L108I CB, en tres de ellas se ha observado una convergencia de los patrones electroforético, mostrando como principal característica la ausencia de la banda de ~16 kDa. De esta manera, los confórmeros stMI-01 Dx, btMI-05 Dx y btMI-09 Dx adaptados a CB mantienen únicamente una banda correspondiente a un fragmento de ~9 kDa, además de las señales correspondientes a fragmentos de menor peso molecular, mostrando patrones idénticos tras tinción de proteína total (Figura 25 a). La cepa stMI-03 Dx es la única que evolucionó de manera diferente al resto de confórmeros en ausencia de dextrano sulfatado, manteniendo una señal única y bien definida en torno a los ~16 kDa y presentando una menor intensidad de señal en la región correspondiente a los fragmentos de ~9 kDa. Tras la propagación preliminar en ausencia de cofactor y este posterior procedimiento de adsorción, se eliminó completamente el dextrano sulfatado en el medio, denominando a los nuevos confórmeros recombinantes obtenidos como stMI-01 CB, stMI-03 CB, btMI-05 CB y btMI-09 CB (Figura 25 a), sustituyendo en su nomenclatura el término Dx que hacía referencia a la presencia de dextrano como cofactor por solo CB.

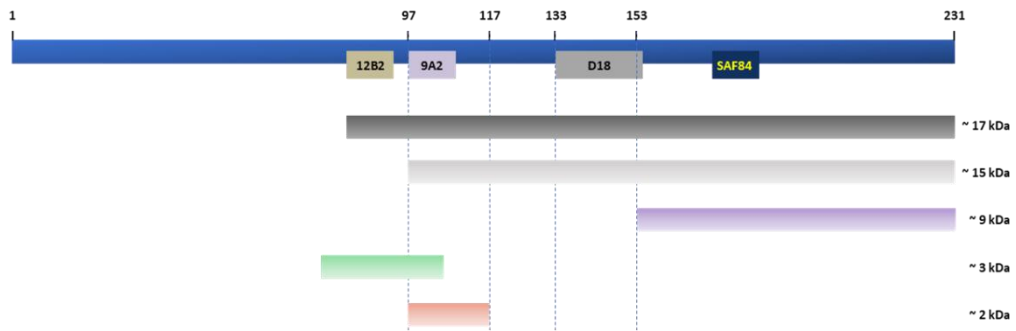
a.



b.



c.



d.

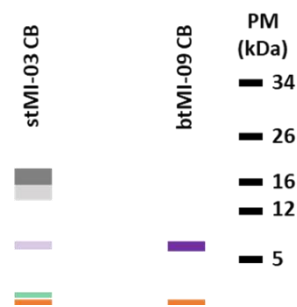


Figura 25. Análisis de los fragmentos proteolíticos de las distintas rec-PrP^{res} murinas L108I tras su propagación en ausencia de cofactor. **a)** Electroforesis y tinción de proteína total en el que se visualizaron cuatro réplicas de stMI-01 CB, stMI-03 CB, btMI-05 CB y btMI-09 CB propagadas en ausencia de dextrano sulfatado en el medio tras su digestión con PK y donde se analizaron los distintos perfiles electroforéticos de cada uno de los productos resultantes. Se incluyeron también cuatro muestras sin inocular como control de contaminación cruzada o de generación espontánea en ausencia de cofactor. stMI-01 CB, btMI-05 CB y btMI-09 CB mostraron patrones indistinguibles caracterizados por la ausencia de la banda correspondiente al fragmento de ~16 kDa. Por el contrario, stMI-03 CB mostró un patrón distinto con una banda predominante cercana a los 16 kDa y fragmentos de menor peso molecular de tipo escalera o *ladder*. **b)** Electrotransferencia de las áreas correspondientes a las réplicas de stMI-03 CB y btMI-09 CB (como representativa del patrón indistinguible de stMI-01 CB, btMI-05 CB) del gel del panel superior para su posterior mapeo epitópico utilizando cuatro anticuerpos primarios diferentes: 12B2 (1:2500), 9A2 (1:400), D18 (1:5000) y SAF84 (1:400). La banda de ~16 kDa típica de los priones *bona fide* y presente en las cuatro rec-PrP^{res} originales (obtenidas en presencia de dextrano sulfatado) solo se detectó en la cepa stMI-03 CB que al ser visible con el anticuerpo 12B2, indica que este fragmento es de mayor tamaño que el observado en stMI-03 Dx y que el corte en el extremo N-terminal de la PK se produciría antes del aminoácido 97 de la rec-PrP^{res}. La visualización de un fragmento ligeramente menor con el anticuerpo 9A2 sugiere además que la banda observada por tinción de proteína total contiene dos fragmentos diferentes. También destaca la conservación de los fragmentos de ~9 y ~3 kDa detectado en stMI-03 Dx. Por su parte, btMI-09 CB, también conserva los fragmentos de ~9 y ~2 kDa observados en btMI-09 Dx. **c)** Representación esquemática de la rec-PrP murina señalando los epítomos reconocidos por los anticuerpos utilizados en este análisis y de los distintos fragmentos proteolíticos detectados tras la electrotransferencia y el mapeo epitópico, incluyendo una estimación del peso molecular de cada uno de los fragmentos identificados **d)** Representación esquemática del perfil de movilidad electroforético de las dos rec-PrP^{res} analizadas. PM: marcador de peso molecular.

5.1.2. Identificación de los fragmentos proteolíticos de las rec-PrP^{res} adaptadas a CB mediante mapeo epitópico

De la misma manera que durante la caracterización bioquímica de las semillas rec-Ra L108I Dx, donde realizamos un mapeo con anticuerpos para obtener evidencias visuales más finas que nos permitieran distinguir entre las cuatro cepas recombinantes, en el caso de los confórmeros adaptados a sustrato carente de cofactor, observamos únicamente dos patrones de peso molecular diferentes. Por lo tanto, seleccionamos dos de los confórmeros que presenten dichos patrones para el estudio estructural mediante anticuerpos: el confórmero stMI-03 CB por ser el único con la banda de ~16 kDa y entre los tres de patrón de peso molecular idéntico, decidimos estudiar la proteína malplegada btMI-09 CB, debido a los periodos de incubación más cortos que demostró *in vivo* la semilla original generada en dextrano. Las cuatro réplicas de estos dos confórmeros tras su visualización mediante tinción de proteína total (Figura 25 a), fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con cuatro anticuerpos diferentes; 12B2, 9A2, D18 y SAF84, cuyos epítomos de reconocimiento aparecen representados de manera esquemática en la Figura 25 c. Como se aprecia en la Figura 25 b, ambos confórmeros presentan inmunoreactividad ante el anticuerpo SAF84, que mapea en la región más próxima al extremo C-terminal de la PrP. Aunque ambas semillas muestran señal frente a este anticuerpo, en el caso de la semilla stMI-09 CB se detectó una sola señal, correspondiente a un fragmento de ~9 kDa, mientras que el inóculo stMI-03 CB presentó la banda de ~16 kDa correspondiente al fragmento típico de los priones *bona fide*, además de compartir ese fragmento

adicional de ~9 kDa. El anticuerpo D18, cuyo epítipo se sitúa en la región central de la PrP, reveló una banda en el confórmero stMI-03 CB correspondiente al fragmento de ~16 kDa y ninguna señal para la semilla btMI-09 CB, ya que carece de dicho fragmento (Figura 25 a). Ambos confórmeros presentan una señal correspondiente a un fragmento de bajo peso molecular (~2 kDa) cuando son expuestos al anticuerpo 9A2, presentando el confórmero btMI-03 CB una señal adicional correspondiente al fragmento de ~16 kDa. El anticuerpo 12B2, que mapea en la región más cercana al extremo N-terminal, no reveló ninguna señal en el confórmero btMI-09 CB, mientras que en la semilla stMI-03 CB se detectaron dos señales; una de ellas correspondiente a un fragmento que podría superar los ~16 kDa y otra a un fragmento de ~7 kDa. Estos datos nos permitieron componer un esquema de los nuevos patrones de peso molecular de las dos proteínas malplegadas rec-Ra L108I tras ser adaptadas a CB (Figura 25 d), en el que se representa al confórmero btMI-09 CB sin la presencia del fragmento de ~16 kDa típico de los priones *bona fide*. Por su parte, la semilla stMI-03 CB presenta un patrón muy característico, siendo la única proteína malplegada adaptada a CB con fragmentos de peso molecular de ~16 kDa, pudiendo ser de un tamaño superior.

5.1.3. Caracterización de la capacidad de propagación de las semillas adaptadas a CB en sustrato con rec-PrP no homóloga y ante condiciones restrictivas

A la hora de distinguir confórmeros con propiedades diferenciales, la propagación en sustratos con rec-PrP no homólogas y en condiciones restrictivas como los cambios en el entorno de propagación, resultaron de los ensayos más informativos. El uso de la proteína rec-Ra L108 como parte del sustrato de la reacción de PMSA sirvió para discriminar entre los cuatro confórmeros, ya que permitió detectar un comportamiento distinto en el caso de la cepa stMI-03 Dx (Figura 17 a). Partiendo de ese dato previo, estudiamos el comportamiento de las semillas stMI-03 CB y btMI-09 CB ante una propagación *in vitro* con sustrato basado en la PrP recombinante de ratón silvestre de genotipo *a* (L108 T189) ante la ausencia o presencia de dextrano sulfatado, preparando para ello dos sustratos: rec-Ra L108 CB y rec-Ra L108 Dx. En ambos casos, la propagación se realizó utilizando partículas de zirconia – sílice con los dos confórmeros adheridos a su superficie como semillas en una primera ronda de PMSA en las condiciones habituales. Se realizaron dos rondas seriadas adicionales utilizando como semilla una dilución 1:10 del producto de la ronda anterior, añadiendo partículas esféricas de zirconia – sílice sin rec-PrP^{res} adherida y manteniendo las mismas condiciones PMSA. Los productos de la propagación en ambos sustratos fueron digeridos con PK para ser observados posteriormente mediante tinción total de proteínas.

Como puede observarse en la Figura 26, ninguna de las dos semillas rec-Ra L108I CB fue capaz de inducir la formación de rec-PrP^{res} en el sustrato rec-Ra L108 CB tras tres rondas de PMSA. Sin embargo, el confórmero btMI-09 CB dio lugar al malplegamiento de la PrP del sustrato rec-Ra L108 Dx desde la primera ronda de PMSA, pudiéndose detectar claramente la presencia de rec-PrP^{res} mediante tinción de proteína total. Tras su adaptación al sustrato rec-Ra L108I CB y la pérdida de la banda de ~16 kDa, el confórmero btMI-09 CB recupera su patrón original al volver a ser propagado *in vitro* en un sustrato rico en dextrano sulfatado, independientemente de que la PrP presente en dicho sustrato no sea idéntica en secuencia a la PrP del sustrato original (Figura 14 d, Figura 26). Sin embargo, el confórmero stMI-03 CB, de la misma manera que ocurrió con su homólogo stMI-03 Dx, no fue capaz de propagar en presencia del sustrato rec-Ra L108 Dx (Figura 17 a y Figura 26). Estos datos sugieren que las cepas pueden adquirir nuevas propiedades durante la propagación en ausencia de cofactor, pero también son capaces de mantener otras características que presentaban originalmente.

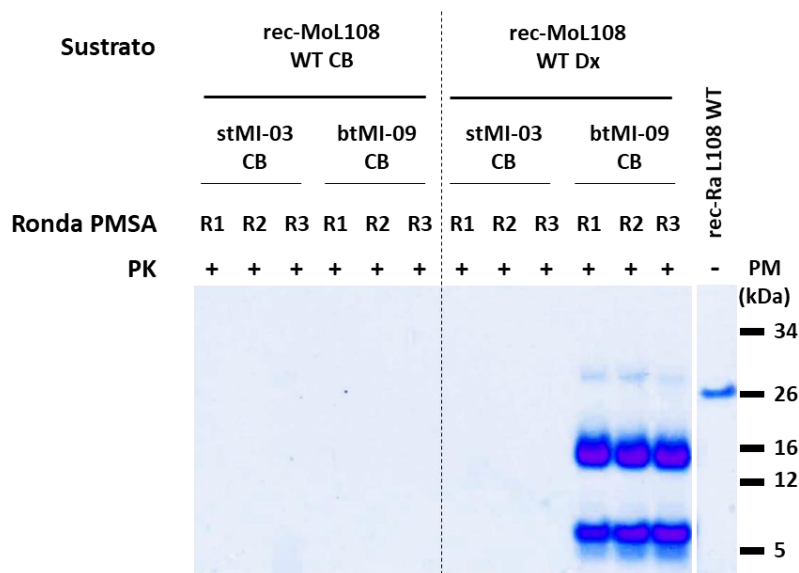


Figura 26. Propagación de dos rec-PrP^{res} murinas L108I CB en sustrato con rec-PrP no homóloga y ante condiciones restrictivas. Las dos rec-PrP^{res} murinas L108I previamente propagadas en CB y escogidas como representativas tras su análisis bioquímico se utilizaron como semillas para testar su capacidad de propagación en sustratos que contenían rec-PrP murina silvestre (genotipo *a*) y presencia (Dx) o ausencia (CB) de dextrano sulfatado, sometidos a tres rondas seriadas de PMSA. Mediante digestión con PK, electroforesis y tinción de proteína total de los productos resultantes se observó que ninguna de las rec-PrP^{res} pudo propagar su malplegamiento a la rec-PrP murina silvestre en ausencia de cofactor. No obstante, btMI-09 CB pudo propagar en presencia de dextrano sulfatado en el sustrato con cofactor a diferencia de stMI03 CB y además recuperó la banda correspondiente al fragmento de ~16 kDa, asemejándose al patrón de btMI-09 Dx. PM: marcador de peso molecular.

5.2. Estudio de las propiedades de las cepas recombinantes murinas ante variaciones de cofactor en el sustrato

Las proteínas malplegadas de rec-Ra L108I generadas mediante PMSA en un sustrato con dextrano sulfatado añadido mostraron las características propias de un prion *bona fide*. La caracterización bioquímica y biológica de estos conformeros de rec-PrP^{res} permitió además asignar a cada uno de ellos una serie de propiedades que permitieron distinguirlos como cuatro cepas diferentes. Sin embargo, el hecho de que las cuatro cepas de rec-Ra L108I Dx consiguieran formar nueva rec-PrP^{res} en un ambiente carente de dextrano, alterando algunas de sus propiedades, nos llevó a estudiar en mayor profundidad el rol que este cofactor puede desempeñar en la propagación de priones *in vitro*.

Con el propósito de indagar cómo afectaban a las propiedades de las cuatro cepas rec-Ra L108I la presencia y ausencia de dextrano sulfatado en el medio, realizamos una serie de adaptaciones mediante propagaciones seriadas *in vitro* utilizando la técnica PMSA. El esquema de la Figura 27 representa la forma en la que trabajamos para, en primer lugar, conseguir adaptar todas las cepas rec-Ra L108I originadas en dextrano (llamadas a partir de ahora Dx¹) a un sustrato libre de este cofactor, realizando rondas seriadas de PMSA utilizando un sustrato sin dextrano sulfatado añadido y generando un conjunto de potenciales nuevas cepas, denominadas rec-Ra L108I CB¹. Una vez demostramos que este nuevo conjunto de conformeros adaptados era capaz de ser adsorbido a partículas de zirconia – sílice y propagar de manera estable manteniendo su perfil electroforético (Figura 25 a), las semillas stMI-03 CB¹ y btMI-09 CB¹ fueron seleccionadas para realizar una segunda tanda de rondas seriadas de PMSA (Propagación 2) en la que devolvemos estos conformeros a su sustrato original con dextrano sulfatado en el medio produciendo un grupo de semillas Dx². De la misma manera, tras ser estas semillas adsorbidas a partículas de zirconia – sílice, fueron utilizadas para una última tanda de pases *in*

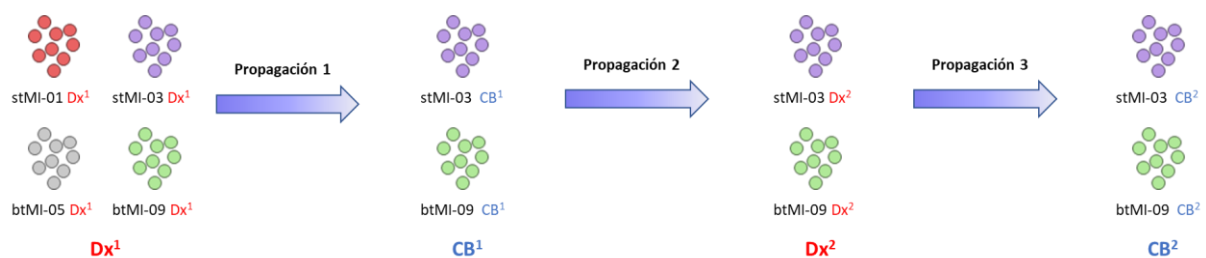


Figura 27. Representación esquemática del procedimiento propuesto para estudiar los cambios bioquímicos que se producen en las rec-PrP^{res} murinas ante la propagación en presencia o ausencia de cofactor en el sustrato. Flujo de trabajo seguido para las propagaciones seriadas en PMSA de las rec-PrP^{res} murinas L108I Dx alternando sustratos con rec-PrP murina L108I con (DX) y sin dextrano sulfatado (CB) como cofactor. Cada una de las tres propagaciones del esquema incluían al menos tres pases seriados y diluciones de semilla que garantizaban que los productos resultantes eran fruto de la propagación y no trazas de las semillas originales diluidas y que el cofactor se había eliminado por completo en las propagaciones a sustratos carentes del mismo.

in vitro en los que se retiró de nuevo el dextrano del medio para obtener el conjunto de confórmeros CB² (Propagación 3).

La Figura 28 recoge las tinciones de proteína total de las semillas originales (Dx¹) y de los productos de las tres propagaciones (CB¹, Dx² y CB²). La cepa stMI-03 Dx mantuvo una única banda intensa de ~16 kDa tras la primera propagación en un ambiente carente de dextrano, no llegando a recuperar nunca su patrón de peso molecular original al ser propagada en un sustrato con dextrano sulfatado durante la generación de la semilla stMI-03 Dx². De la misma forma, tras la Propagación 3, la semilla stMI-03 CB² no presentó el mismo patrón que la CB¹, caracterizado por la señal de alta intensidad correspondiente al fragmento de ~16 kDa. En cuanto a la cepa original btMI-09 Dx¹, perdió la banda típica de ~16 kDa propia de los priones *bona fide* durante la Propagación 1 al generar el confórmero adaptado btMI-09 CB¹, que presentaba únicamente una banda de ~9 kDa además de los fragmentos de bajo peso molecular. Al propagar la semilla btMI-09 CB¹ de nuevo en un sustrato rec-Ra L108I con dextrano sulfatado, el nuevo confórmero btMI-09 Dx² presentó de nuevo la banda de ~16 kDa (Figura 28).

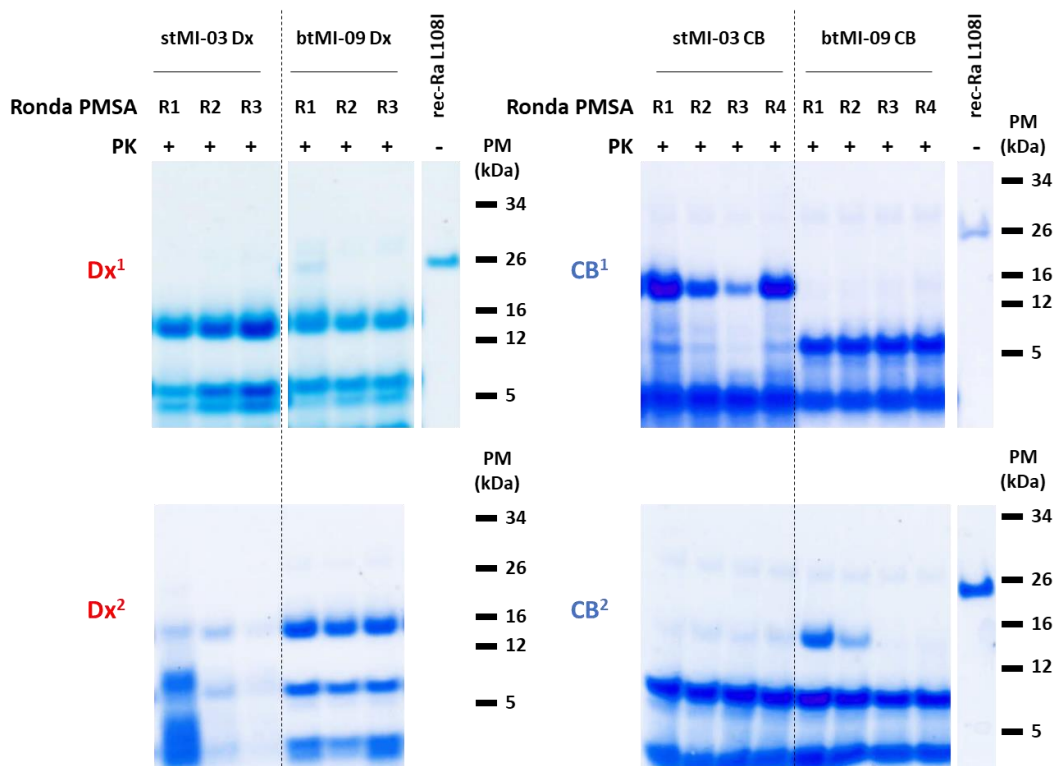


Figura 28. Propagación seriada de dos rec-PrP^{res} murinas L108I en sustratos con rec-PrP homóloga y en presencia o ausencia de dextrano. Siguiendo la metodología esquematizada en la Figura 27, las cepas stMI-03 Dx y btMI-09 Dx, denominadas como Dx¹ de las que se muestran tres rondas seriadas de PMSA para confirmar que no se dieran alteraciones durante la propagación en sustrato homólogo con cofactor, fueron propagadas en sustrato rec-Ra L108I CB (Propagación 1), originando las rec-PrP^{res} CB¹ de las que se muestran cuatro rondas seriadas de PMSA. Posteriormente estas fueron propagadas nuevamente mediante tres rondas seriadas en sustrato rec-Ra L108I Dx (Propagación 2) dando lugar a las rec-PrP^{res} Dx². Por último, estos productos fueron adaptados de nuevo a un ambiente sin dextrano (sustrato rec-Ra L108I CB) a través de 4 rondas adicionales, obteniendo las rec-PrP^{res} CB². Los productos resultantes de cada ronda de PMSA se digirieron con PK y se sometieron a electroforesis y tinción total de proteína, en las que se observó que ninguna de las dos cepas adaptadas al sustrato rec-Ra L108I CB tras la Propagación 1 fue capaz de recuperar posteriormente su perfil electroforético característico, ni en la Propagación 2 (Dx²) ni en la Propagación 3 (CB²). PM: marcador de peso molecular.

Sin embargo, cuando este confórmero adaptado volvió a propagarse en un sustrato carente de dextrano sulfatado, comienza a perder la banda de ~ 16 kDa, asemejándose en la mayoría de las réplicas técnicas a los productos observados tras la Propagación 2 (btMI-09 CB¹).

Este ensayo de propagaciones seriadas con alternancia de sustratos con o sin dextrano, permitió analizar el comportamiento de los patrones de peso molecular de dos de los confórmeros rec-Ra L108I a lo largo de los pases de PMSA. Sin embargo, los resultados de la Propagación 3 (Figura 28, esquina inferior derecha) en la cual los confórmeros stMI-03 Dx² y btMI-09 Dx² se utilizaron como semilla en sucesivos pases de PMSA utilizando sustrato rec-Ra L108I Dx, no fueron concluyentes. Ninguno de los dos confórmeros adaptados (stMI-03 CB² y btMI-09 CB²) recuperó el patrón electroforético esperado de sus homólogos generados durante la primera propagación en ausencia de dextrano sulfatado (stMI-03 CB¹ y btMI-09 CB¹). Así, con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos tras la Propagación 3, donde observamos un cambio en el patrón electroforético de la semilla stMI-03 CB² respecto a la original stMI-03 CB¹, repetimos la Propagación 3 en la que stMI-03 Dx² y btMI-09 Dx² fueron utilizadas como semillas, en esta ocasión mediante pases seriados de PMSA con concentraciones decrecientes de dextrano sulfatado. Para ello, se realizaron 8 pases seriados utilizando sustrato rec-Ra L108I con sus correspondientes concentraciones finales de dextrano: 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005 y 0 % (p/v). Utilizando como semilla partículas esféricas de zirconia – sílice con los confórmeros stMI-03 Dx² y btMI-09 Dx² adsorbidos a ellas por cuadruplicado, se realizó una primera ronda de PMSA con sustrato rec-Ra L108I con dextrano sulfatado al 0.05 % (p/v). Se incluyeron dos tubos con partículas de zirconia – sílice sin semillas adheridas como controles negativos de la propagación. Las sucesivas rondas fueron realizadas mediante diluciones 1:10 del pase anterior utilizando sustratos con concentraciones cada vez menores de dextrano sulfatado, hasta llegar a un último pase con ausencia total de dicho cofactor. Como puede observarse en la Figura 29, durante los primeros pases los confórmeros stMI-03 Dx² y btMI-09 Dx² fueron capaces de formar rec-PrP^{res} con el fragmento característico de ~ 16 kDa. Sin embargo, a medida que avanzaron las rondas de PMSA y disminuía la presencia de dextrano sulfatado en el medio, la intensidad de dicha banda disminuyó de manera progresiva, hasta desaparecer por completo en el último pase, realizado en ausencia total de cofactor. Las nuevas semillas stMI-03 CB² y btMI-09 CB² obtenidas tras ocho rondas de PMSA mostraron un patrón electroforético idéntico con una banda correspondiente a un fragmento de ~ 9 kDa y la desaparición de la banda de ~ 16 kDa, confirmando los resultados previos.

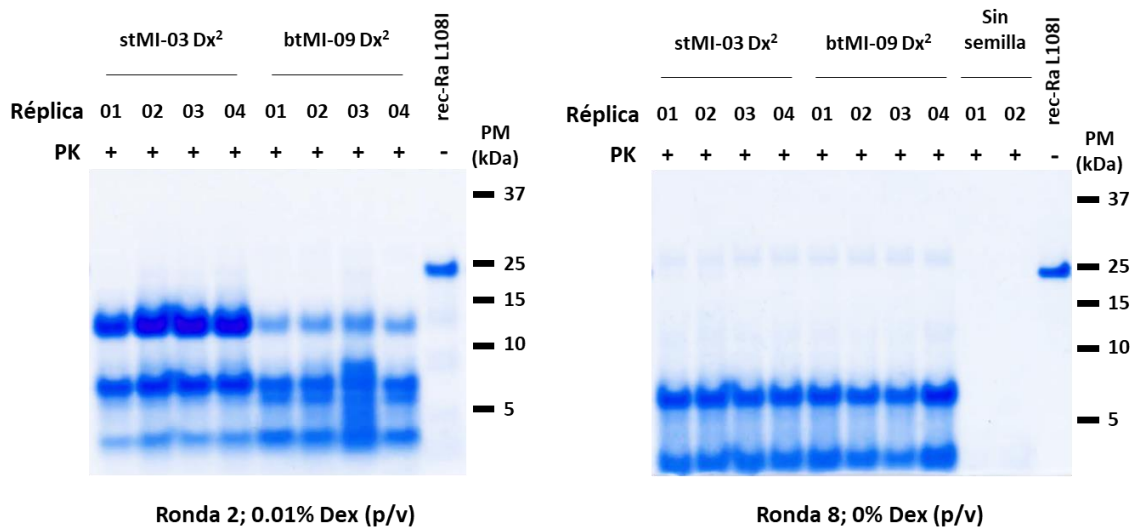


Figura 29. Propagación de las dos rec-Pr^{res} murinas L108I Dx² en sustratos con concentraciones decrecientes de dextrano sulfatado. Ante la posibilidad de que la propagación de rec-Pr^{res} con patrones de movilidad electroforética únicos en CB (como el caso del stMI-03 CB) por parte de rec-Pr^{res} murinas L108I Dx fuera un evento estocástico y no un evento fácilmente reproducible por la eliminación del cofactor, se realizó una propagación de las cepas stMI-03 Dx² y btMI-09 Dx² mediante 8 rondas seriadas de PMSA donde en cada ronda, el sustrato utilizado tenía una concentración de dextrano menor: 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005 y 0 % (p/v). Se observa una composición de dos geles de poliacrilamida tras electroforesis y tinción de proteína total en la primera fase de la adaptación (0.01% dextrano sulfatado en el medio) y al final del experimento (0% de dextrano sulfatado). La cepa stMI-03 Dx² no mostró el mismo cambio de patrón que stMI-03 Dx¹ al ser propagada directamente en un sustrato carente de CB. PM: marcador de peso molecular.

5.3. Infectividad en modelo transgénico sobreexpresor de PrP^C murina

El ensayo de adaptación a diferentes sustratos con presencia o ausencia de cofactor sirvió para adaptar las semillas originales stMI-03 Dx¹ y btMI-09 Dx¹ y producir *in vitro* mediante PMSA confórmeros derivados de las mismas denominados como CB¹, Dx² y CB². Sin embargo, a pesar de los cambios observados en los patrones de movilidad electroforética de estas semillas que sugieren un cambio estructural dependiente de la presencia de cofactor, no se obtuvo información adicional acerca de la adquisición de nuevas propiedades o el mantenimiento de otras ya existentes. Por tanto, se desconoce si el cambio que sufren los nuevos confórmeros adaptados puede afectar tanto a las características de priones *bona fide* que presentaban las cepas originales de Dx¹ como a sus propiedades específicas de cepa. Para ello, se testó la infectividad de los dos confórmeros recombinantes obtenidos tras su primera adaptación a CB (CB¹) utilizando el modelo TgMol108I, similar en secuencia a las ocho semillas recombinantes utilizadas.

5.3.1. Determinación de la capacidad de propagación *in vitro* de las semillas recombinantes mediante PMCA en modelo transgénico sobreexpresor de PrP^C murina L108I

Utilizamos la técnica PMCA para evaluar *in vitro* la potencial capacidad infectiva de los inóculos de rec-PrP^{res} Ra-L108I adaptados a la presencia o ausencia de dextrano. Para esta aproximación se utilizó un sustrato basado en homogeneizados de encéfalos de ratones TgMoL108I. Para comprobar si las adaptaciones de los priones recombinantes murinos son capaces de malplegar la PrP^C de este sustrato, los productos generados a partir de la PMSA de las semillas stMI-03 CB² y btMI-09 CB² fueron diluidos 1:10¹, 1:10², 1:10³ y 1:10⁴ en el sustrato derivado de TgMoL108I y se sometieron a dos rondas seriadas de PMSA de 6 h cada una. Para controlar la formación de PrP^{Sc} espontánea y asegurar que las condiciones de experimentación se mantienen libres de contaminación, se incluyeron cuatro muestras sin semilla que contenían únicamente sustrato complementado con la misma cantidad final de dextrano sulfatado (0.05% (p/v)) que los tubos con semilla. Estos controles negativos se sometieron al mismo proceso de PMCA. Los resultados se evaluaron mediante digestión con PK y posterior *immunoblot*, comprobando en primer lugar la ausencia de PrP^{Sc} en los controles negativos, confirmando así la ausencia de contaminación. Tras dos rondas de PMCA, el confórmero stMI-03 CB² no fue capaz de malplegar la PrP^C de TgMoL108I a diferencia del btMI-09 CB² (Figura 30).

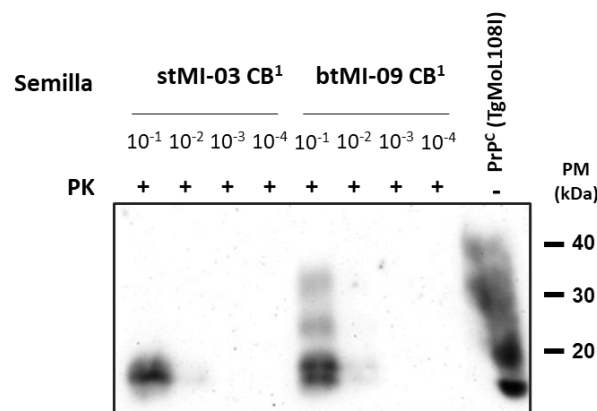


Figura 30. Determinación de la infectividad potencial *in vivo* de las rec-PrPres murinas L108I propagadas en ausencia de dextrano, evaluada mediante PMCA utilizando homogeneizado de encéfalo de ratones TgMoL108I. a) Western blot de los productos obtenidos tras dos rondas de PMCA con las semillas stMI-03 CB¹ y btMI-09 CB¹ en homogeneizado de encéfalo de ratones TgMoL108I como sustrato. Para comprobar si pese a la ausencia de dextrano sulfatado, estas semillas adaptadas eran capaces de malplegar la PrP^C murina L108I, los dos productos se diluyeron 1:10, 1:10², 1:10³ y 1:10⁴ y se sometieron a una ronda de PMCA de 24 h. Tras ese periodo, los productos de la primera ronda se diluyeron 1:10 en sustrato fresco y se sometieron a una segunda ronda de PMCA de la misma duración. La capacidad de propagación se evaluó mediante digestión con PK de los productos de cada ronda de PMCA, electroforesis y Western Blot utilizando el anticuerpo monoclonal D18 (1:5 000). La semilla btMI-09 CB¹ indujo el malplegamiento de la PrP^C del modelo TgMoL108I, a pesar de carecer de la banda de ~16 kDa que mostraban las precursoras obtenidas en sustrato con dextrano (Figura 25). Por su parte, la cepa stMI-03 CB¹, que presentaba un perfil electroforético inusual con un fragmento de unos 17 kDa, no indujo el malplegamiento de esta misma PrP^C. PrP^C (TgMoL108I): homogeneizado de encéfalo de ratones TgMoL108I sin digerir, PM: marcador de peso molecular.

5.3.2. Determinación de la infectividad *in vivo* utilizando distintos modelos murinos

Las cuatro cepas rec-Ra L108I Dx demostraron ser capaces de inducir una enfermedad priónica en el modelo sobreexpresor TgMoL108I y, algunas de ellas, también en ratones silvestres C57BL/6 tras un primer pase en TgMoL108I e incluso de manera directa en el modelo murino no sobreexpresor. Aunque los exámenes bioquímicos realizados *in vitro* apuntan a que algunas propiedades de cepa pueden verse alteradas ante la ausencia de dextrano sulfatado (perfil electroforético), también sugieren que la presencia de cofactor no es esencial para que una cepa sea infecciosa y, por tanto, considerada como prion *bona fide*. Teniendo en cuenta los resultados *in vitro* de la PMCA en la que se testó la capacidad de malplegar PrP^C de ratones TgMoL108I por parte de las semillas stMI-03 CB¹ y btMI-09 CB¹, se decidió evaluar la infectividad de estas semillas recombinantes en un bioensayo en ratones TgMoL108I. En el momento en el que se deposita esta tesis doctoral, parte del estudio *in vivo* ha sido completada; la cepa btMI-09 CB¹ ha causado una EET en el 100% de los ratones TgMoL108I inoculados, arrojando un periodo de incubación de 170.13 ± 4.21 dpi, mientras que ningún animal inoculado con la cepa stMI-03 CB¹ ha mostrado signos clínicos compatibles con una EET tras más de 130 dpi. Hasta ahora, ambos resultados coinciden con las observaciones realizadas *in vitro* (Figura 30), reforzando una vez más la correlación existente entre los resultados *in vitro* obtenidos mediante PMCA y los posteriores estudios *in vivo* (Fernandez-Borges et al., 2017a, Erana et al., 2019). El análisis de los cerebros de inoculados con la cepa btMI-09 CB¹ se realizó detectando PrP^{res} mediante *Western blot* tras una digestión con PK, lo que permitió observar PrP^{res} con patrón clásico en todos los animales que recibieron esta semilla, confirmando así que la aparición de signos se debe a la acción del inóculo y no a la enfermedad esporádica propia de este modelo (Figura 31) y demostrando que la presencia de cofactor no es necesario para causar una enfermedad priónica, al menos, en un modelo murino que sobreexpresa la PrP^C como es el ratón TgMoL108I.

Con el objetivo de dilucidar el potencial infeccioso de la cepa btMI-09 CB¹, se seleccionó uno de los ratones TgMoL108I que había sucumbido por efecto de la inoculación con esta cepa, se homogeneizó su cerebro y se utilizó como semilla para un segundo pase en ratones silvestres C57BL/6, de manera similar a la realizada en el segundo pase de las semillas rec-Ra L108I Dx (Tabla 4). Esperando que esta semilla sea capaz de inducir una EET en un modelo no sobreexpresor tras su paso por TgMoL108I, decidimos ampliar el bioensayo e inocular de manera directa la cepa btMI-09 CB¹ en ratones C57BL/6. En ambos casos, las inoculaciones se realizaron recientemente y no se han realizado sacrificios de ratones con signos clínicos compatibles con una EET.

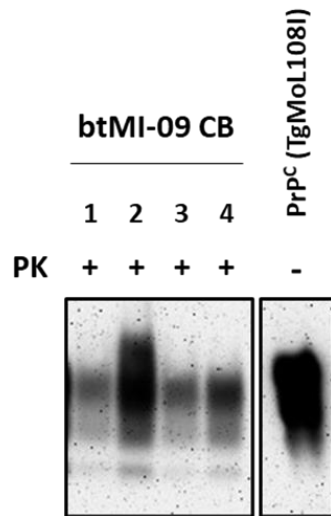


Figura 31. Estudio bioquímico de la PrP^{Sc} acumulada en el encéfalo de ratones TgMoL108I inoculados con la cepa btMI-09 CB¹. Una mitad de cada encéfalo de los ratones TgMoL108I que presentaron signos compatibles con una EET, se homogeneizó y digirió con PK para la posterior detección de PrP^{Sc} mediante electroforesis y *Western blot*, utilizando el anticuerpo SAF83 (1:400). Pudo detectarse PrP^{Sc} en todos los animales inoculados con la cepa btMI-09 CB¹, confirmando que esta semilla mantiene un comportamiento de prion *bona fide* también en ausencia de dextrano sulfatado en el medio o de la banda de ~16 kDa. PrP^C (TgMoL108I): homogeneizado de encéfalo de ratones TgMoL108I sin digerir, PM: Marcador de peso molecular.

6. Generación espontánea de priones recombinantes murinos silvestres

Las cuatro rec-PrP^{res} murinas L108I Dx generadas *in vitro* de manera espontánea, demostraron ser cepas diferentes de priones *bona fide* capaces de inducir una EET, tanto en modelos animales que sobreexpresaban la PrP^C murina como en ratones silvestres. Algunas de estas cepas que presentaban el polimorfismo L108I en su rec-PrP pudieron, además, malplegar *in vitro* sustratos basados en proteína recombinante de ratón silvestre (rec-PrP L108). Por otra parte, el hecho de que la mayoría de estas cepas recombinantes, tras su paso por ratones TgMoL108I, causase enfermedad en ratones silvestres C57BL/6, sumado a que al menos una de ellas (btMI-09 Dx) fue infecciosa de manera directa en este modelo silvestre, sugerían que podría ser posible estudiar el malplegamiento espontáneo de priones *bona fide* en un modelo más cercano a la realidad. Por ello, para estudiar el evento de espontaneidad que nos atañe en esta tesis doctoral, decidimos tratar de producir *de novo* priones recombinantes con PrP murina silvestre. Las aproximaciones iniciales basadas en PMSA para la generación *in vitro* este tipo de priones no resultaron exitosas (Figura 9 a), por lo que fue necesaria una modificación adicional de las condiciones de experimentación. Tras ello, se realizaron ensayos *in vitro* e *in vivo* orientados a testar la capacidad infecciosa de los nuevos priones recombinantes murinos silvestres, buscando confirmar que presentaban las características propias de prion *bona fide* y que son aptos para estudiar en detalle el evento de malplegamiento espontáneo.

6.1. Adaptación de la PMSA para generar priones recombinantes murinos silvestres

La optimización del sistema de PMSA para favorecer el malplegamiento espontáneo de la PrP de ratón con la variación L108I requirió un aumento de los volúmenes de reacción, así como el cambio de partículas esféricas utilizadas que, junto con la temperatura y agitación previamente definidos, resultaron óptimos para la formación de priones recombinantes *in vitro*. Por ello, con el objetivo de favorecer también el malplegamiento espontáneo de la PrP recombinante murina silvestre, decidimos modificar la concentración de rec-PrP en el sustrato, por considerarlo también un parámetro crítico. La concentración inicial utilizada para la producción *de novo* de priones rec-Ra L108I Dx fue de 0.8 mg/ml de rec-PrP en el sustrato (Figura 10), lo que condujo a la formación de rec-PrP^{res} en el 100% de los tubos de experimentación tras 24 horas de PMSA, no obteniendo proteínas malplegadas en las muestras de rec-Ra L108 Dx sin la isoleucina presente (Figura 11). En este ensayo de generación espontánea, utilizamos las proteínas recombinantes de ratón tanto con el polimorfismo del topillo rojo (rec-Ra L108I) como sin él (rec-Ra L108) para preparar sustratos añadiendo dextrano sulfatado al 0.5 % (p/v) como cofactor y con tres concentraciones finales de rec-PrP diferentes: 0.4 mg/ml, 0.8 mg/ml y de 1.6 mg/ml, originando seis preparaciones distintas que fueron sometidas por duplicado a una única ronda de PMSA. Todas las muestras fueron digeridas con PK para la posterior detección de rec-PrP^{res} mediante tinción de proteína total. No observamos formación espontánea de rec-PrP^{res} en ninguno de los dos sustratos cuando la concentración de rec-PrP era de 0.4 mg/ml. El sustrato rec-Ra L108I Dx a una concentración de 0.8 mg/ml de rec-PrP final, fue capaz de malplegarse con el mismo éxito que en anteriores ocasiones (Figura 11 b), mientras que no se detectó rec-PrP^{res} en ausencia del polimorfismo L108I. Sin embargo, al aumentar la concentración final de rec-PrP en el sustrato al doble, la digestión con PK reveló la presencia de rec-PrP^{res} en ambos sustratos de experimentación (Figura 32 a). Este resultado confirmó la posibilidad de obtener confórmeros de proteína malplegada partiendo de sustrato rec-Ra L108 Dx, sin la presencia del polimorfismo del topillo rojo y demostrando el potencial de la PMSA para la obtención de PrP^{res} de forma espontánea.

Una vez definida la concentración de PrP idónea para la generación de priones recombinantes murinos silvestres *in vitro*, se realizaron repeticiones variando parámetros técnicos como el volumen de sustrato añadido, el tubo de experimentación o el diámetro de las partículas esféricas de vidrio para, de la misma manera que ocurrió al utilizar la PrP murina con el polimorfismo L108I (Figuras 10 c y 10 d), tratar de generar rec-PrP^{res} bioquímicamente diferentes. Las nuevas formas de rec-PrP^{res} fueron denominadas siguiendo la misma nomenclatura que para las cepas de priones con el polimorfismo del topillo rojo, con la única diferencia del sustrato utilizado (ML en este caso, del inglés, *Mouse Leucine*). De esta manera, obtuvimos y seleccionamos las formas malplegadas stML-01 Dx, btML-89 Dx y btML-90 Dx que, a diferencia de sus homólogos rec-PrP L108I, resultaron presentar el

mismo patrón de movilidad electroforética al ser observadas mediante tinción de proteína total tras su digestión con PK (Figura 32 b), muestra de la aparente homogeneidad de las rec-PrP^{res} obtenidas con la proteína silvestre. Como recoge el esquema de la Figura 32 c, los tres confórmeros presentaron señales intensas correspondientes a fragmentos de rec-PrP^{res} entre los que destacan la presencia de la banda de ~16 kDa y un fragmento de menor peso molecular en la región de ~9 kDa.

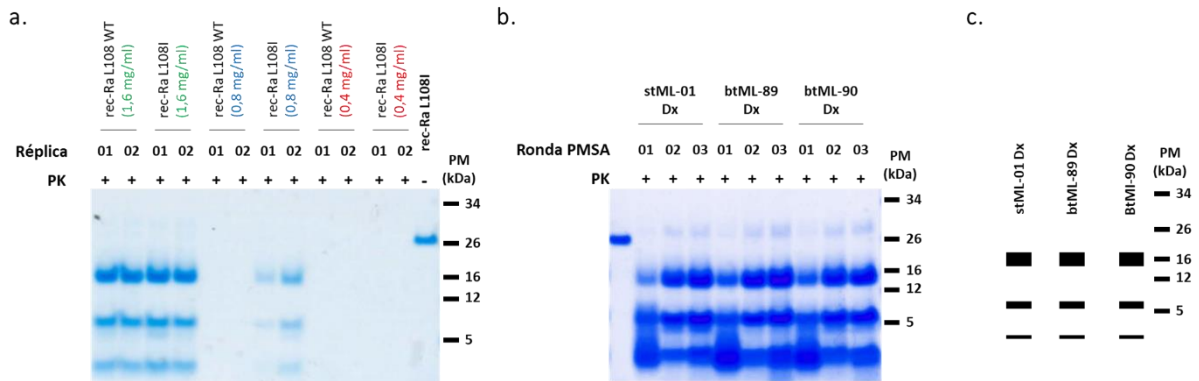


Figura 32. Obtención de rec-PrP^{res} murina silvestre malplegada espontáneamente utilizando condiciones optimizadas de PMSA. a) Digestión con PK, electroforesis y tinción de proteína total de los productos obtenidos en una única ronda de PMSA con concentración variable de rec-PrP en el sustrato. Se prepararon dos tipos de sustratos de PMSA; uno con rec-PrP murina silvestre L108 y otro con la rec-PrP murina L108I. La concentración de rec-PrP en ambos sustratos se ajustó durante su preparación para obtener tres sustratos diferentes de cada con: 0.4, 0.8 y 1.6 mg/ml. Ninguna de las dos proteínas se malplegó de manera espontánea cuando la concentración era de 0.4 mg/ml, mientras que sí fue posible para el caso de rec-Ra L108I a 0.8 mg/ml. No obstante, para malplegar espontáneamente la rec-PrP murina silvestre L108 se necesitaron 1,6 mg/ml de rec-PrP en el sustrato. **b)** Electroforesis y tinción de proteína total que muestra la estabilidad en cuanto a patrón de movilidad electroforética de tres confórmeros de rec-Ra L108 seleccionados de diferentes experimentos, tras su propagación en tres rondas seriadas de PMSA utilizando partículas esféricas de zirconia – sílice para evitar la formación de rec-PrP^{res} espontáneas. Aunque todos ellos demostraron ser resistentes a la digestión con PK y presentaron el fragmento de ~16 kDa típico de los priones *bona fide*, resultaron indistinguibles en sus perfiles electroforéticos. **c)** Representación esquemática del perfil electroforético común a las tres rec-PrP^{res} murinas L108 seleccionadas. PM: marcador de peso molecular.

Se realizó la adsorción de los tres nuevos confórmeros de rec-Ra L108 Dx a partículas esféricas de zirconia – sílice de 1.0 mm en las mismas condiciones descritas con anterioridad. Esto permitió realizar una breve caracterización bioquímica de las tres semillas mediante los experimentos de propagación que habían permitido distinguir entre las cuatro cepas rec-Ra L108I Dx (Resultado 3). Para ello se realizaron dos experimentos de propagación utilizando dos sustratos diferentes; uno de ellos en ausencia de cofactor (rec-Ra L108 CB) y otro utilizando una rec-PrP de secuencia no homóloga (rec-Ra F108 V189 Dx). La elección del sustrato rec-Ra L108 CB se basó en los resultados previos obtenidos para las cepas *bona fide* rec-Ra L108I Dx, que demostraron comportamientos variables ante la ausencia de dextrano. Por otro lado, la inclusión del sustrato rec-Ra F108 V189 Dx basado en la PrP murina de genotipo *b*, permitió el estudio de estos nuevos confórmeros de rec-PrP^{res} ante la restricción de una barrera polimórfica natural. De esta manera, utilizando como semillas las partículas de zirconia – sílice con los confórmeros stML-01 Dx, btML-89 Dx y btML-90 Dx adsorbidas a ellas, se realizó una única

ronda de PMSA con los distintos sustratos. Todas las muestras fueron digeridas con PK para revelar la presencia de rec-PrP^{res}, siendo observadas mediante tinción de proteína total.

Ninguno de los tres confórmeros silvestres fue capaz de malplegar la PrP de un sustrato carente de cofactor (Figura 33 a). Por el contrario, los tres dieron lugar a rec-PrP^{res} a expensas de un sustrato basado en la PrP murina de genotipo *b* tras 24 h de PMSA (Figura 33 b). Estos ensayos no revelaron comportamientos diferenciales entre las tres proteínas malplegadas murinas silvestres de estudio, no pudiendo distinguirlas bioquímicamente entre sí. Esta situación, sumada a los idénticos patrones de movilidad electroforética que presentaron los tres confórmeros, condujo al desarrollo de otros abordajes para discernir si los tres confórmeros generados, aparte de presentar las propiedades de un prion *bona fide*, podían presentar características de cepa distintivas.

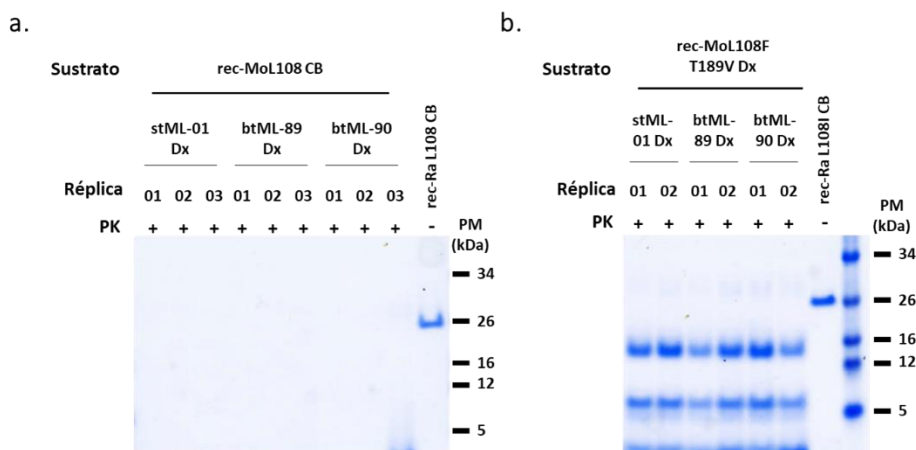


Figura 33. Propagación de rec-PrP^{res} murinas L108 en sustratos con rec-PrP no homóloga o sin cofactor. Electroforesis y tinción de proteína total tras la gestión con PK de los productos obtenidos tras una única ronda de PMSA en la que las tres rec-PrP^{res} murinas L108 Dx fueron utilizados como semilla en **a)** sustrato con rec-PrP homóloga, pero sin dextrano sulfatado. Ninguna de las semillas testadas indujo malplegamiento sin cofactor. **b)** sustrato con rec-PrP no homóloga (genotipo *b*; F108 T189V) con dextrano sulfatado. En este caso, los tres confórmeros fueron capaces de malplegar rec-PrP del sustrato, manteniendo sus perfiles electroforéticos indistinguibles. PM: marcador de peso molecular

6.2. Determinación de la capacidad de propagación *in vitro* de las semillas recombinantes silvestres mediante PMCA en modelo murino silvestre

Antes de comprobar que los confórmeros de rec-PrP^{res} murina silvestre son capaces de inducir una EET en un modelo animal, realizamos un estudio previo de su capacidad para malplegar *in vitro* la PrP^C presente un homogeneizado cerebral. Como en anteriores ocasiones, nos basamos en el uso de la técnica PMCA para malplegar un sustrato basado en PrP^C procedente de encéfalos, en este caso, de ratones silvestres C57BL/6 que presentan niveles normales de PrP^C y son idénticos en secuencia a las semillas a testar. Por tanto, las rec-PrP^{res} murinas silvestres se utilizaron como semillas para inducir el malplegamiento de dicho sustrato, siendo diluidas 1:10, 1:10², 1:10³ y 1:10⁴ y sometidas a dos rondas seriadas de PMSA de 24 h cada una. Para controlar la aparición de PrP^{Sc} espontánea y asegurar ausencia de contaminación, se incluyeron en ambas rondas cuatro muestras sin semilla, que contenían únicamente sustrato y dextrano sulfatado a la misma concentración final que los tubos con semilla (0.05% (p/v)). Los tubos de experimentación y los controles negativos se sometieron al mismo proceso de PMCA, fueron digeridos con PK y visualizados mediante *Western blot*. Los tres confórmeros de rec-PrP^{res} fueron capaces de malplegar la PrP^C presente en el sustrato tras dos rondas de PMCA, a pesar de estar diluidos 1:10², mostrando un comportamiento indistinguible al final del ensayo. Sin embargo, en la primera ronda de PMCA la eficacia de los confórmeros fue ligeramente diferente; la semilla stML-01 Dx únicamente pudo formar rec-PrP^{res} al ser diluida 1:10, mientras que los confórmeros btML-89 Dx y btML-90 Dx lo hicieron tras ser diluidos 1:10² y sometidos a 24 h de PMCA (Figura 34). La capacidad de las tres semillas rec-Ra L108 Dx para malplegar *in vitro* la PrP^C presente en encéfalos de ratones C57BL/6 *in vitro*, fue un indicativo de la potencial efectividad que estos inóculos podían presentar en un ensayo *in vivo*, que determinaría en última instancia el comportamiento de prion *bona fide* de estas semillas y ayudaría a distinguir la posible presencia de distintas cepas priónicas.

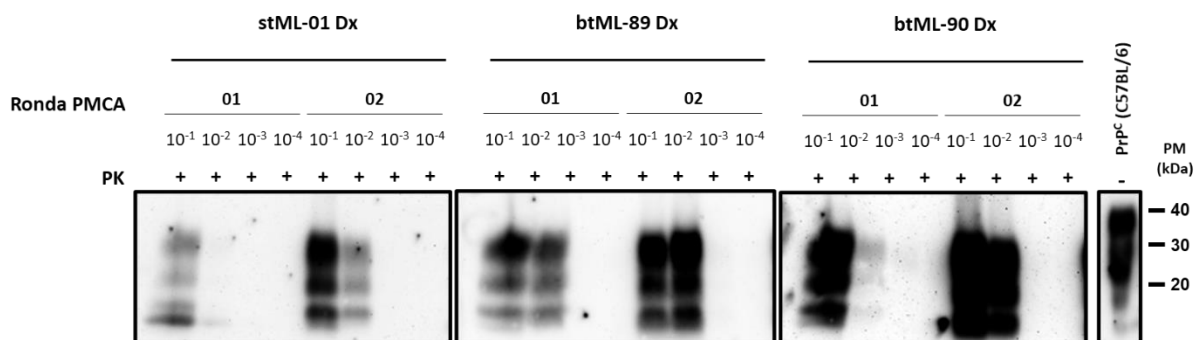


Figura 34. Determinación de la infectividad potencial *in vivo* de las rec-PrP^{res} murinas L108 mediante PMCA utilizando homogeneizado de encéfalo de ratones de genotipo silvestre como sustrato. a) Western blot de los productos obtenidos tras dos rondas de PMCA con las semillas stML-01 Dx, btML-89 Dx y btML-90 Dx en sustrato de homogeneizado cerebral de ratones C57BL/6. Con el objetivo de testar la capacidad de las rec-PrP^{res} murinas sin la variante L108I para malplegar la PrP^C de encéfalo, estas semillas se diluyeron 1:10, 1:10², 1:10³ y 1:10⁴ y se sometieron a una ronda de PMCA de 24 h. Tras ese periodo, los productos de la primera ronda se diluyeron 1:10 en sustrato fresco y se sometieron a una nueva ronda de la misma duración. La evaluación de los resultados se llevó a cabo mediante la digestión con PK, electroforesis y Western Blot utilizando el anticuerpo monoclonal D18 (1:5 000). Las tres semillas fueron capaces de malplegar *in vitro* la PrP^C de este modelo murino silvestre, no observándose diferencias significativas. PrP^C (C57BL/6): homogeneizado de encéfalo de ratones C57BL/6 sin digerir, PM: marcador de peso molecular.

6.3. Determinación de la infectividad *in vivo* en un modelo murino silvestre

La correlación reportada en varios estudios entre el comportamiento *in vitro* de priones recombinantes y su posterior efectividad induciendo una enfermedad priónica en un modelo animal (Fernandez-Borges et al., 2017a, Erana et al., 2019), fue reproducida por las cuatro cepas rec-Ra L108I Dx generadas de manera espontánea mediante PMSA en los resultados descritos previamente. Tras realizar una observación similar *in vitro* utilizando en esta ocasión las semillas rec-Ra L108 silvestres, efectuamos un bioensayo en el que estos confórmeros fueron inoculados de manera directa en un modelo murino silvestre. Para ello, los productos resistentes a PK stML-01 Dx, btML-89 Dx y btML-90 Dx fueron inoculados intracerebralmente en tres grupos de ratones silvestres C57BL/6. Se incluyó un cuarto grupo de experimentación con ratones silvestres C57BL/6 inoculados únicamente con sustrato rec-Ra L108 Dx, sin presencia de rec-PrP^{res} al no haber sido sometido a generación espontánea mediante PMSA. Ninguno de estos animales utilizados como controles negativos sufrió signos clínicos propios de una EET, mientras que los tres grupos de ratones C57BL/6 inoculados con los tres confórmeros de rec-PrP^{res} murina silvestre sí desarrollaron enfermedad priónica en el 100% de los casos (Tabla 6). El inóculo stML-01 Dx indujo una EET en el 100% de los animales de experimentación, presentando un periodo de incubación final de 199 ± 24.21 dpi. Por su parte, el grupo inoculado con la proteína malplegada btML-89 Dx, a pesar de presentar una tasa de ataque del 100%, exhibió un periodo de incubación más largo de 290.3 ± 10.51 dpi. El confórmero btML-90 Dx presentó también una tasa de ataque del 100% y un periodo de incubación de 194 ± 7.77 dpi. El análisis de los encéfalos de todos los animales inoculados se realizó detectando la presencia de PrP^{res} mediante Western blot tras una digestión con PK, mostrando un patrón clásico de PrP^{Sc} idéntico en los tres grupos que junto con los signos observados confirma la presencia de enfermedad priónica en todos los ratones inoculados con rec-Ra L108 Dx. Las diferencias en los tiempos de incubación sugirieron que btML-89 Dx podía ser una cepa diferente de stML-01 Dx y btML-90 Dx, que continuaron mostrando un comportamiento idéntico *in vivo*. Sin embargo, la detección de un signo clínico particular y poco frecuente en los animales inoculados con stML-01 Dx sugirió la posibilidad de que este confórmero pudiera ser una cepa diferente a btML-90 Dx. Se observó repetidamente cómo los ratones inoculados

con stML-01 Dx presentan una afección motora localizada en sus extremidades posteriores, limitando el movimiento de sus patas traseras y provocando una marcha inestable. A falta de un término más específico, definimos este fenotipo como “tambaleante” o anadeante, término utilizado con frecuencia en Neurología para hacer referencia a marchas anormales caracterizadas con movimientos laterales del tronco. Los ratones C57BL/6 inoculados con los confórmeros btML-89 Dx y btML-90 Dx sufrieron otros signos neurológicos propios de una enfermedad priónica, pero no se reportó en ningún caso esta peculiar afección motora.

Con el objetivo de encontrar diferencias en las propiedades biológicas de estos confórmeros que permitieran distinguirlos entre sí y determinar si se estabilizaban aquellas características ya detectadas, se realizó un segundo pase en el mismo modelo. Se seleccionaron tres encéfalos de ratones C57BL/6 previamente inoculados con cada una de las cepas rec-Ra L108 Dx, los cuales fueron homogeneizados e inoculados intracerebralmente en ratones C57BL/6 bajo las mismas condiciones que en anteriores bioensayos. Tal y como recoge la Tabla 6, los tres inóculos fueron infecciosos en el segundo pase en ratones silvestres, siendo de nuevo la cepa btML-89 Dx la más lenta en causar la enfermedad, con un periodo de incubación de 142.5 ± 1.31 dpi que lo distinguió de los otros dos confórmeros. Tras el segundo pase, stML-01 Dx y btML-90 Dx presentaron tasas de ataque completas y unos periodos de incubación muy similares (de 125.9 ± 1.29 dpi y de 119.7 ± 2.01 dpi respectivamente). Sin embargo, los ratones inoculados en segundo pase con stML-01 Dx volvieron a presentar un fenotipo tambaleante, distinguiéndose así de su homólogo btML-90 Dx. Este fenotipo volvió a repetirse incluso tras realizar un tercer pase con este inóculo en el mismo modelo de experimentación, obteniendo una tasa de ataque completa y un periodo de incubación de 130.1 ± 0.9 dpi.

Tabla 6. Estudio de la infectividad de las tres cepas rec-Ra L108 Dx mediante inoculación en ratones de genotipo silvestre. Las tres semillas recombinantes generadas espontáneamente a partir de sustrato con dextrano con rec-PrP murina silvestre, fueron inoculadas intracerebralmente en ratones C57BL/6. Se muestran los datos de tasa de ataque, periodo de incubación y resultado del análisis mediante *Western blot* de la presencia de PrP^{Sc} con patrón clásico, además de lesiones espongióticas y marcaje de PrP^{Res} detectadas mediante el estudio anatomopatológico. WB: *Western blot*, H/E: tinción de hematoxilina – eosina, IHQ: inmunohistoquímica, N.D.: por determinar.

Cepa	Sustrato	1 ^{er} pase (C57BL6)					2 ^º pase (C57BL6)	
		Tasa de ataque	Días post-inoculación	Patrón clásico de PrP ^{Res} (WB)	Espongiosis (H/E)	PrP ^{Res} (IHQ)	Tasa de ataque	Días Post-inoculación
stML-01 Dx	rec-MoL108 Dx	100%	199 ± 24.21	5/5	5/5	5/5	100%	125.9 ± 1.29
btML-89 Dx	rec-MoL108 Dx	100%	290.3 ± 10.51	6/6	N.D.	6/6	100%	142.5 ± 1.31
btML-90 Dx	rec-MoL108 Dx	100%	194 ± 7.77	3/4	N.D.	4/4	100%	119.7 ± 2.01
Control	rec-MoL108 Dx	0/9	>370 [†]	0/4	0/4	0/4		

†: Resultados provisionales debido a que, para los grupos señalados, el estudio sigue en curso a fecha de depósito de esta tesis doctoral

Los estudios anatomopatológicos de los cerebros de estos animales realizados hasta la fecha revelaron las características propias de enfermedad priónica a nivel histológico e inmunohistoquímico. Se detectaron depósitos de PrP^{res} y cambios espongiiformes en los cerebros de los animales inoculados con las tres semillas recombinantes de PrP murina silvestre (Figura 35). Con el objetivo de aportar evidencias que sirvieran para diferenciar aún más estas tres cepas recombinantes entre sí, se realizó un estudio detallado de la distribución de estas lesiones. De esta manera, el inóculo stML-01 Dx causó en todos los animales de experimentación espongiosis evidente y acumulaciones de PrP^{res}, que presentaron un patrón sináptico de punteado fino restringido a los núcleos talámicos laterales y a la corteza cerebelosa. Algunos de estos animales sufrieron de hidrocefalia no relacionada con la presencia de PrP^{res}, distinguiendo entre la espongiosis generada por esta condición y localizada en los ventrículos laterales y las vacuolas causadas por la acción del inóculo y distribuidas por todo el encéfalo. Los ensayos biológicos en ratones C57BL/6 confirmaron que los priones silvestres rec-Ra L108 Dx generados de manera espontánea *in vitro* presentaban las propiedades de un prion *bona fide*. De manera adicional, el estudio detallado de las propiedades biológicas de estos inóculos permitió la distinción de tres cepas recombinantes de priones las cuales se mostraron indistinguibles a nivel bioquímico. Las modificaciones realizadas en el protocolo de PMSA para la obtención espontánea de proteínas malplegadas facilitó la obtención de priones recombinantes murinos basados en una secuencia silvestre de PrP, proporcionando un modelo de estudio más cercano a la realidad con el que investigar el evento de malplegamiento espontáneo.

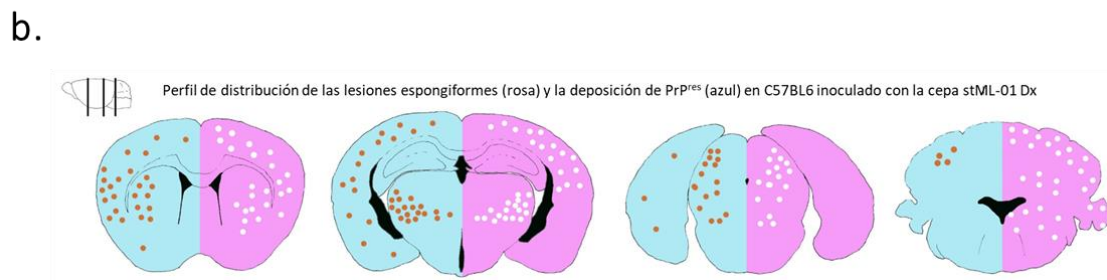
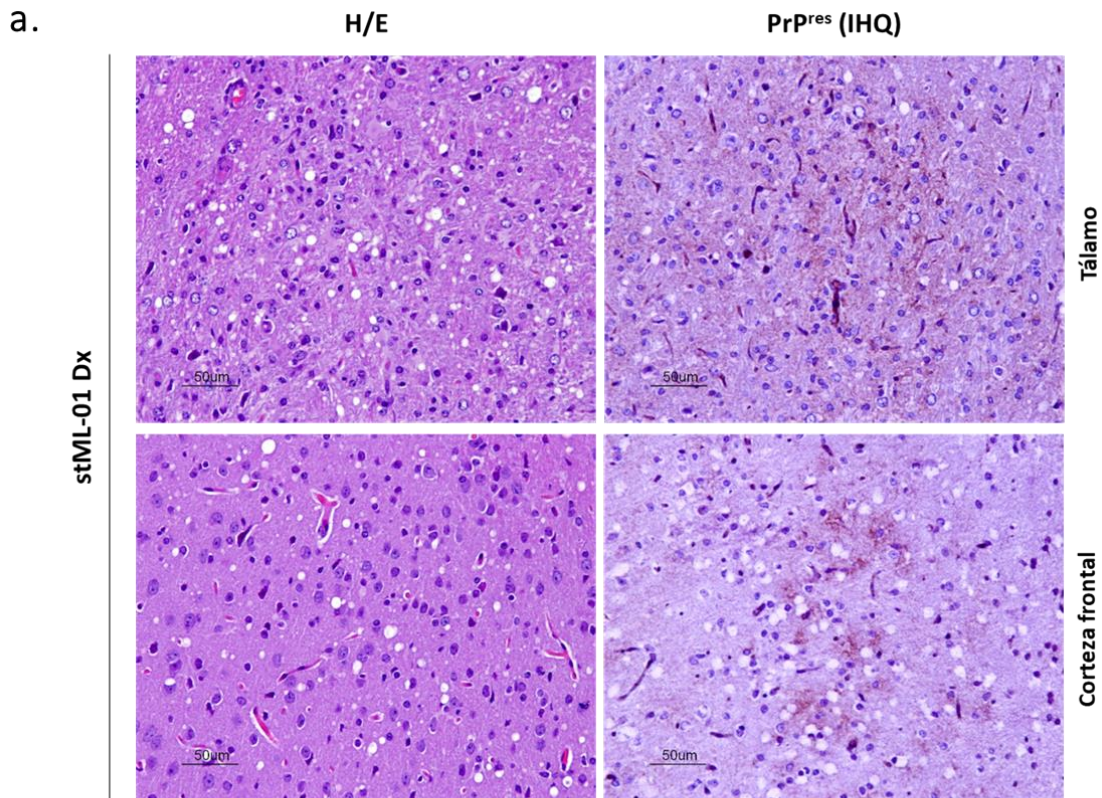


Figura 35. Análisis histopatológico para la evaluación de las lesiones causadas por los inóculos rec-Ra L108 Dx en ratones de genotipo silvestre. a) Se realizó una evaluación de las lesiones espongiiformes y de la presencia de depósitos de PrP^{res} en los animales C57BL/6 inoculados con las cepas rec-Ra L108 Dx para confirmar el desarrollo de una EET en estos animales. Una de las mitades de los encéfalos fue fijada con paraformaldehído y embebida en parafina, para posteriormente realizar cortes que se destinaron a la tinción con hematoxilina-eosina (H/E) para evaluar lesiones espongióticas y al estudio inmunohistoquímico (IHQ) para la detección de PrP^{res}, utilizando el anticuerpo 2G11 (1:1 000). Todos los grupos de ratones inoculados mostraron algunas de las características histopatológicas propias de una EET, pudiendo detectar en algunos casos ciertas particularidades. La cepa stML-01 Dx presentó colocalización de lesiones espongióticas y depósitos de PrP^{res} en algunas de las áreas de estudio, como el tálamo, mientras que en áreas como la corteza frontal no se observaron fenómenos de colocalización tan claros. b) Perfil lesional de ratones C57BL/6 inoculados intracerebralmente con stML-01 Dx donde aparece representada la distribución de lesiones espongiiformes (rosa) y depósitos de PrP^{res} (azul) en las distintas áreas de estudio del encéfalo de estos animales. PM: Marcador de peso molecular.

7. Estudio de la cinética del fenómeno de malplegamiento espontáneo utilizando la proteína recombinante murina silvestre como modelo

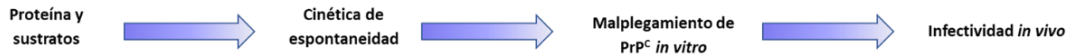
La capacidad de la herramienta PMSA para producir *in vitro* y de manera rápida, priones recombinantes espontáneos de ratón sin la necesidad de una semilla priónica exógena ni la presencia de una mutación en la secuencia de la PrP, permitió el diseño de una estrategia para caracterizar el evento de malplegamiento de la PrP recombinante a lo largo del tiempo. Tras observar que la generación espontánea de priones murinos silvestres con propiedades *bona fide* era posible tras 24 h de PMSA, intentamos determinar dentro de ese intervalo de tiempo y de manera aproximada, el momento en el que un confórmero de rec-PrP comienza a adquirir su capacidad de resistencia a PK y sus propiedades de infección *in vivo*. Para ello se programó un estudio cinético basado en la generación espontánea de formas resistentes a PK utilizando proteína recombinante de ratón silvestre, con leucina en la posición 108 de su PrP (L108). Siguiendo el esquema de trabajo que aparece en la Figura 36 a, en primer lugar, se produjeron diferentes lotes (denominados *batches*, el plural en inglés de *batch*) independientes de proteína recombinante silvestre de ratón (rec-Ra L108), con los que se prepararon tres sustratos diferentes. De cada uno de los tres sustratos preparados y sometidos a PMSA, se fueron retirando muestras a distintas horas, comprobando la presencia de rec-PrP^{res} en cada caso. Se observó presencia de PrP recombinante malplegada resistente a proteasa a distintos tiempos, cuya capacidad de malplegar PrP^C *in vitro* fue comprobada y su potencial infectividad específica fue estimada mediante diluciones y pases seriados en PMCA. Tras ello, se completó el estudio de la cinética de malplegamiento espontáneo con un bioensayo en ratones de genotipo silvestre.

7.1. Estudio de la formación de rec-PrP^{res} murina a diferentes tiempos de PMSA

En apartados previos, hemos mostrado cómo pueden obtenerse distintas PrP murinas silvestres malplegadas con características de priones *bona fide* (Tabla 6) *in vitro* tras 24 h de PMSA, sin embargo, los estudios descritos hasta ahora en esta tesis doctoral no cubren los eventos acaecidos durante esta primera ronda de PMSA. Como refleja la Figura 36 a, el estudio cinético comenzó con la preparación independiente de tres *batches* distintos de proteína rec-Ra L108, utilizados para preparar tres sustratos con una concentración final de dextrano sulfatado del 0.5%, de la misma manera que en anteriores ocasiones. La concentración de PrP recombinante de los tres sustratos fue igualada utilizando para ello mediciones de absorbancia a 280 nm, y comprobando mediante diluciones seriadas y tinción de proteína total que los tres sustratos partían de la misma cantidad de PrP inicial. Como podemos observar en la Figura 36 b, los tres sustratos rec-Ra L108 Dx fueron diluidos 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8 para ser observados mediante tinción de proteína total sin ser tratados con PK. Todos los sustratos presentaron

una banda de señal intensa correspondiente a la rec-PrP sin digerir, cuya señal disminuía al mismo nivel en los tres sustratos a medida que las diluciones aumentaban.

a.



b.

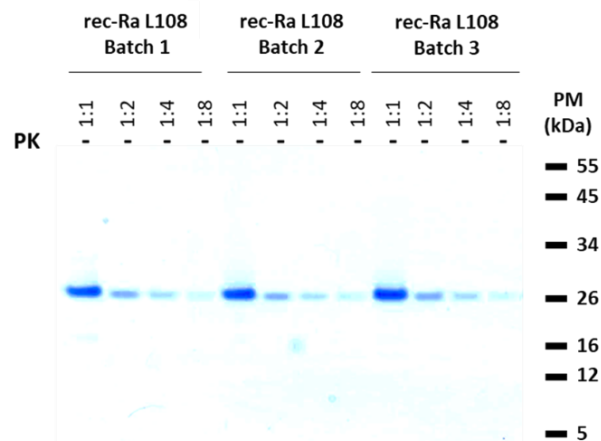


Figura 36. Representación esquemática del procedimiento para el estudio de la cinética de malplegamiento espontáneo de la rec-PrP murina silvestre. a) Representación esquemática del flujo de trabajo seguido en el estudio cinético de la generación espontánea de rec-PrP^{res} murina silvestre. Sustratos preparados a partir de tres *batches* independientes de rec-PrP de ratón L108 fueron sometidos a PMSA para el análisis cinético de la formación de rec-PrP^{res}. Las muestras extraídas a diferentes puntos horarios fueron sometidas a PMCA para evaluar su capacidad de malplegar la PrP^c *in vitro* para luego, ser inoculadas en un bioensayo que confirmase su infectividad *in vivo*. b) Visualización de sustratos preparados para el estudio. Con el objetivo de confirmar que la concentración inicial de rec-PrP en los tres sustratos preparados era similar, se diluyeron 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8 y visualizaron mediante electroforesis y tinción de proteína total. Los tres sustratos presentaron una cantidad similar de rec-PrP. PM: marcador de peso molecular.

Una vez se aseguró la misma concentración inicial de rec-PrP en los tres sustratos rec-Ra L108 Dx, se estudió la cinética del malplegamiento espontáneo mediante la monitorización de la formación de rec-PrP^{res} (Figura 36 a). Los tres sustratos fueron depositados por duplicado en tubos Falcon de 50 ml y puestos en contacto con una cantidad de partículas esféricas de vidrio proporcional a la utilizada en los experimentos de espontaneidad con tubos de 2 ml (Figura 9 d). Para asegurar un volumen lo suficientemente grande que permitiese la posterior extracción de muestras a diferentes tiempos, se utilizaron 25 ml de sustrato en cada una de las dos réplicas técnicas realizadas por cada *batch* de sustrato rec-Ra L108 Dx preparado. De esta manera, un total de 6 tubos Falcon con sustratos basados en PrP recombinante de ratón silvestre, fueron sometidos a PMSA en presencia de partículas esféricas

de vidrio de 0.1 mm de diámetro para favorecer la formación espontánea de rec-PrP^{res}. Se extrajeron muestras de cada réplica para su análisis a distintos tiempos horarios tras 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas de PMSA, partiendo siempre del mismo tubo de experimentación. De esta manera, se eliminó la posible variabilidad intra-experimental que en ocasiones se ha observado en tubos independientes dentro de un mismo experimento. Se detectó rec-PrP^{res} formada *de novo* en las dos réplicas técnicas de uno de los *batches* de sustrato rec-Ra L108 Dx en todas las muestras extraídas tras 1 h de PMSA, mientras que el resto de *batches* mostraron espontaneidad a partir de las 2 h de PMSA en todas sus réplicas.

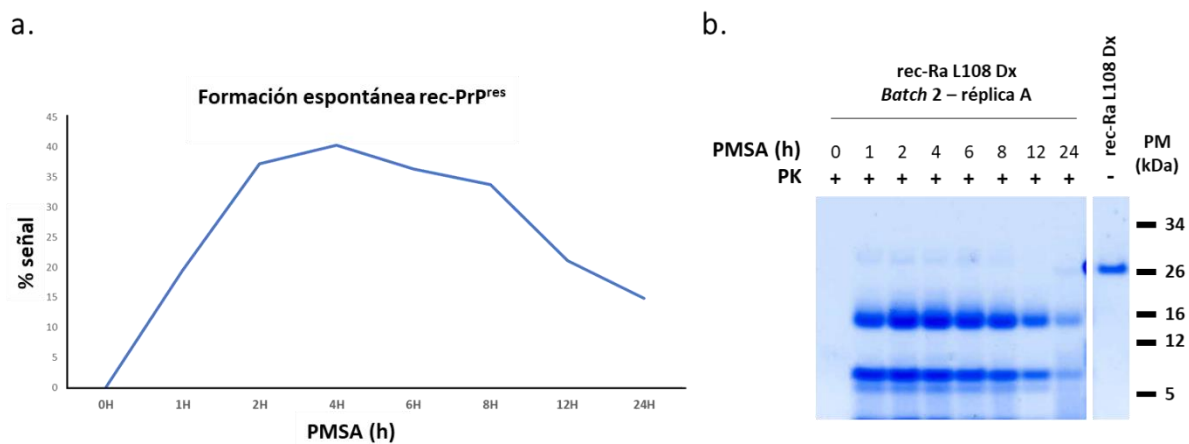


Figura 37. Estudio de la formación espontánea de rec-PrP^{res} murina silvestre a diferentes tiempos de PMSA. Cada uno de los tres *batches* se ensayó por duplicado en PMSA en presencia de partículas esféricas de vidrio y con un volumen inicial de sustrato que permitió la extracción de muestras a distintos tiempos (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24) de PMSA. Todas las muestras fueron digeridas con PK y visualizadas mediante electroforesis y tinción de proteína total para evaluar la presencia de rec-PrP^{res}. **a)** Gráfico de la monitorización de la formación espontánea de rec-PrP^{res} murina. La línea azul representa la intensidad de señal observable tras un análisis de densitometría de cada una de las muestras extraídas a distintos tiempos de PMSA. Esta representación revela que la cantidad máxima de rec-PrP^{res} se alcanza a partir de las 2 h y que, pasado un período de estabilización de señal de rec-PrP^{res}, la intensidad de la señal decrece a partir de las 8 h. **b)** Electroforesis y tinción de proteína total de uno de los *batches* de sustrato rec-Ra L108 Dx sometido a PMSA. En este caso, se observa que la formación de rec-PrP^{res} es clara tras 1 h de PMSA (pocillo 2), siendo la señal muy intensa hasta la muestra extraída a las 12 h, momento en el cual la señal de la PrP^{res} comienza a decaer (pocillos 7 y 8). PM: marcador de peso molecular.

La Figura 37 b muestra un ejemplo representativo de las tinciones de proteína total realizadas para detectar el momento en el comienza la formación de rec-PrP^{res}. Todas las proteínas malplegadas generadas en cada uno de los *batches* presentaron un patrón de movilidad electroforética indistinguible, con la señal correspondiente al fragmento de ~16 kDa y un doble bandeo en la región cercana a los ~9 kDa. No se detectó presencia de rec-PrP^{res} en las muestras correspondientes a los sustratos antes de someterse a PMSA (Figura 37 a y b, 0 h) y en todas las tinciones de proteína total realizadas, se apreció un decaimiento progresivo de la señal correspondiente a la rec-PrP^{res} en muestras que habían sido sometidas a más horas de PMSA. Este resultado se confirmó mediante un análisis densitométrico, cuyos datos se encuentran representados en la Figura 37 a, donde podemos

observar que las nuevas rec-PrP^{res} formadas en las muestras extraídas entre las 4 y las 6 horas de PMSA son las que presentaron una mayor intensidad de señal tras ser digeridas con PK. Estos resultados corroboraron la formación *in vitro* de confórmeros murinos silvestres resistentes a PK tras 24 horas de PMSA, señalando además que la generación espontánea de estas nuevas formas malplegadas es un evento muy rápido que comienza a ser detectable entre la primera y la segunda hora a partir del inicio del proceso.

7.2. Estudio de la potencial infectividad de las rec-PrP^{res} espontáneas obtenidas a distintos tiempos de PMSA *in vitro* e *in vivo*

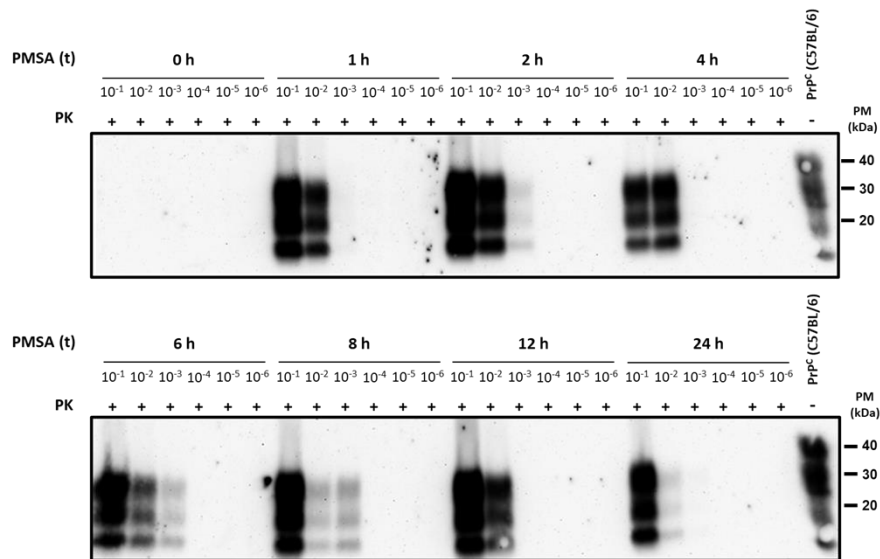
Tras determinar la cinética de formación de rec-PrP^{res} a lo largo de 24 h de PMSA, quisimos comprobar si se observaban diferencias en las propiedades biológicas de las proteínas malplegadas obtenidas a distintos tiempos. Además de estudiar si la detección de rec-PrP^{res} correlaciona con la capacidad infectiva *in vivo*, si se observan alteraciones de las propiedades de cepa a lo largo del tiempo o si por el contrario solo se detectan cambios en el título de priones recombinantes generados a distintos tiempos, se realizó un estudio de titulación con las muestras obtenidas en cada punto horario. Esta cuantificación de las unidades infectivas en cada muestra y su correlación con la señal de rec-PrP^{res} detectada y analizada por densitometría podrían permitir una mejor comprensión del evento de malplegamiento espontáneo y de su propagación, pudiendo incluso establecer una posible relación entre el tamaño de los agregados formados por la PrP malplegada a lo largo del tiempo y su relativa capacidad infectiva como han sugerido algunas investigaciones (Caughey and Lansbury, 2003).

7.2.1. Determinación de la capacidad de propagación *in vitro* de las semillas recombinantes mediante PMCA en modelo murino silvestre

Con el propósito de determinar la potencial infectividad y además cuantificar el título de priones en cada muestra, decidimos analizar la infectividad específica de las mismas. Este concepto hace referencia a las unidades necesarias de priones en una muestra para inducir una EET en un modelo animal concreto, para lo que se mide la dosis letal 50 (LD50) mediante la dilución seriada de la muestra y su posterior inoculación en el modelo. Como en apartados previos, antes de realizar los estudios *in vivo*, estimamos la potencial infectividad específica de cada muestra evaluando su capacidad de malplegar PrP^C de encéfalo de ratón de genotipo silvestre mediante PMCA. Las muestras extraídas tras 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas de PMSA por duplicado de cada uno de los tres sustratos fueron tratadas como inóculos independientes, por lo que se realizaron diluciones seriadas (desde 1:10 hasta 1:10⁶) de cada uno de ellos para después, someterlos a cuatro rondas de PMCA con el objetivo de estimar la infectividad específica en cada punto horario seleccionado. La razón de realizar un mayor

número de rondas de PMCA fue asegurar la detección de la dilución máxima de cada inóculo, comprobando así que se alcance el límite de capacidad de malplegamiento *in vitro* que no aumenta con la realización de rondas adicionales de propagación. Para controlar la aparición de PrP^{Sc} espontánea y posibles eventos de contaminación cruzada, se incluyeron cuatro muestras sin semilla. Además, todos los productos extraídos a las 0 horas de PMSA, fueron tratados igualmente como inóculos, siendo diluidos y sometidos a PMCA como controles negativos adicionales. Los tubos de experimentación y los controles negativos fueron digeridos con PK y observados mediante *Western blot*. Tal y como muestra la Figura 38 a, todos los productos en los que se había observado previamente la presencia de rec-PrP^{res} fueron capaces de malplegar la PrP^C presente en el sustrato encefálico, con eficiencias variables según el tiempo de PMSA de los inóculos iniciales. Atendiendo a la dilución máxima de semilla en la que se detecta PrP malplegada tras las cuatro rondas de PMCA en todas las réplicas de las muestras extraídas a cada tiempo, observamos que las de 2, 4, 6 y 8 h muestran mayor capacidad de malplegamiento que el resto, pudiendo ser diluidas hasta 1:10³, mientras que las muestras obtenidas durante la primera hora de PMSA dan lugar a PrP malplegada únicamente en alguna de las réplicas, con una dilución media de 1:10. También las semillas sometidas a tiempos de PMSA más prolongados de 12 y 24 h muestran una capacidad de malplegamiento de PrP^C encefálica reducida (Figura 38 a). La correlación de la capacidad de propagación de las muestras de cada punto horario (media de las diluciones máximas alcanzadas por las muestras de cada punto horario indicadas por la línea naranja) con la presencia de rec-PrP^{res} detectada previamente (intensidad de señal determinada por densitometría representada en columnas azules) puede verse en la Figura 38 b, que revela una buena correlación entre la cantidad de rec-PrP^{res} detectada en cada muestra mediante tinción de proteína total (figura 37 b) y la potencial infectividad específica estimada *in vitro* (ejemplo representativo en la figura 38 a) con el máximo para ambos parámetros entre las 2 y 8 horas de PMSA y una disminución a tiempos más prolongados.

a.



b.

Aparición de la capacidad infectiva *in vitro*

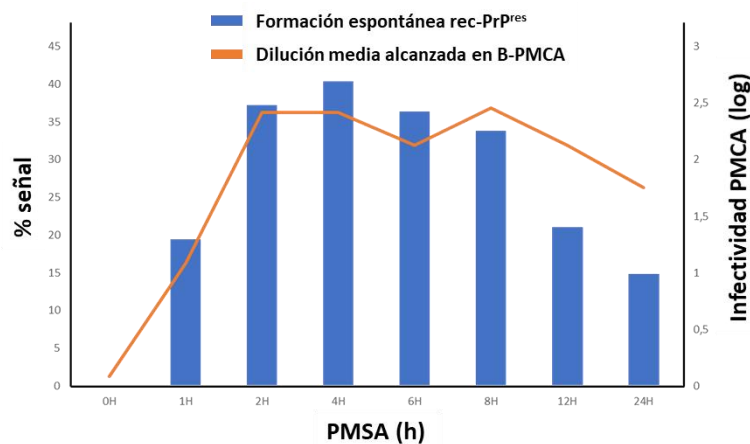


Figura 38. Determinación de la infectividad potencial *in vivo* de las rec-PrP^{res} murinas obtenidas a distintos tiempos de PMSA mediante PMCA utilizando homogeneizado de encéfalo de ratones silvestres. a) *Western blot* de los productos obtenidos tras cuatro rondas de PMCA con homogeneizado cerebral de ratones C57BL/6 como sustrato y utilizando como semillas las muestras de rec-PrP^{res} extraídas a distintos tiempos de PMSA durante la generación espontánea. Con el objetivo de testar la capacidad de las rec-PrP^{res} murinas L108 para malplegar la PrP^C murina de encéfalo se diluyeron 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵ y 1:10⁶ y se sometieron a una ronda de PMCA de 24 h. Tras ese periodo, los productos de la primera ronda se diluyeron 1:10 en sustrato fresco y se sometieron a una nueva ronda de la misma duración. El proceso se repitió hasta alcanzar las cuatro rondas seriadas. La evaluación de los resultados se llevó a cabo mediante la digestión con PK, electroforesis y *Western Blot* utilizando el anticuerpo monoclonal D18 (1:5 000). Las muestras obtenidas tras 2, 4, 6 y 8 h de PMSA mostraron mayor capacidad para malplegar la PrP^C encefálica, pudiendo ser diluidas hasta 1:10³. Las semillas sometidas a 1, 12 y 24 h de PMSA mostraron menor capacidad de malplegamiento. b) Gráfico que correlaciona la detección de rec-PrP^{res} malplegada de forma espontánea con su capacidad de malplegar PrP^C de encéfalo. Superposición de los resultados en forma de barras del análisis densitométrico de la formación espontánea de rec-PrP^{res} (Figura 37 a) y los resultados de la capacidad de cada fracción para malplegar PrP^C *in vitro* mediante PMCA. El eje vertical izquierdo representa la intensidad media de la señal de las rec-PrP^{res}, mientras que el eje vertical derecho representa la media de la dilución máxima alcanzada en PMCA con las semillas de cada punto horario. El eje horizontal recoge los distintos puntos horarios de PMSA: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h en los que se recogió cada muestra. Las muestras extraídas tras tiempos más largos de PMSA muestran menor capacidad para malplegar la PrP^C encefálica coincidiendo con la intensidad de señal de las rec-PrP^{res} generadas. PrP^C (C57BL/6): homogeneizado de encéfalo de ratones C57BL/6 sin digerir utilizados como sustrato, PM: marcador de peso molecular.

7.2.2. Determinación de la infectividad específica *in vivo* en modelo murino silvestre

De nuevo fue necesario recurrir a un bioensayo que permitiese corroborar los resultados observados *in vitro*, seleccionándose para ello ratones C57BL/6. El estudio previo nos permitió anticipar los posibles resultados dada la alta correlación observada entre la capacidad de malplegamiento de PrP^C de encéfalo *in vitro* y la infectividad *in vivo*, y por consiguiente seleccionar las muestras de mayor interés para el estudio *in vivo*, tratando de incluir todos los escenarios posibles en base a la distinta capacidad de malplegamiento mostrada por las semillas obtenidas en cada punto horario. De esta manera, seleccionamos los productos horarios, todos procedentes de la misma réplica de uno de los *batches*: 0, 1, 4 y 24 h. La elección del producto de 0 h respondía a la necesidad de demostrar que no existió contaminación durante la preparación de los sustratos, y que no tenía lugar malplegamiento espontáneo previo al procedimiento de PMSA. Se seleccionó el producto de 4 h por ser el inóculo que alcanzaba valores máximos en cuanto a señal de rec-PrPres y capacidad de malplegar PrP^C de encéfalo, obtenido tras un menor tiempo de PMSA. Los productos de 1 y 24 h fueron escogidos por flanquear los valores máximos de infectividad específica (Figura 38 a). Estas semillas fueron nombradas siguiendo una nomenclatura similar a las anteriores, de nuevo haciendo referencia a las condiciones de PMSA (c, de cinética), manteniendo también el sustrato utilizado (ML, del inglés, *Mouse Leucine*) y en este caso, en lugar del número de réplica técnica, se añadió el tiempo de PMSA de dicho producto (0, 1, 4 o 24 h). Todas ellas aparecen como Dx, al haber sido originadas en sustratos con una concentración final del 0.5 %, dando lugar a las semillas cML-0h Dx, cML-1h Dx, cML-4h Dx y cML-24h. Atendiendo a los resultados de propagación de PrP^C *in vitro*, en los que observamos que la dilución máxima a la que un inóculo podía ser diluido dando lugar a PrP malplegada fue de 1:10³, las semillas seleccionadas fueron diluidas para comprobar si este resultado era extensible a un modelo *in vivo* y determinar así la infectividad específica. Cada uno de los productos cML-1h Dx, cML-4h Dx y cML-24h fue testado en tres grupos de animales de experimentación, cada uno con una dilución diferente: 1:10, 1:10³ y 1:10⁴, originando un total de nueve grupos de ratones C57BL/6. Se añadió un décimo grupo de ratones que fueron inoculados de únicamente con el producto cML-0h Dx a una dilución 1:10, ya que al actuar como control negativo no se consideró necesario el uso de diluciones más altas.

De esta manera, se llevó a cabo un bioensayo con ratones C57BL/6 en el que las semillas cML-0h Dx, cML-1h Dx, cML-4h Dx y cML-24h Dx y sus correspondientes diluciones fueron inoculadas de intracerebralmente siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito. Ninguno de los ratones que recibieron el inóculo cML-0h Dx, exhibió signos clínicos propios de una EET, aunque se realizaron algunos sacrificios debidos a enfermedades intercurrentes. Como puede observarse en la Tabla 5, todas las semillas resultaron infecciosas cuando fueron diluidas 1:10 en ratones C57BL/6, obteniendo en los tres casos una tasa de ataque del 100% aunque con tiempos de incubación diferentes. Los

animales inoculados con cML-1h Dx desarrollaron signos neurológicos tras un periodo de incubación de 187.4 ± 6.42 dpi, la semilla cML-4h Dx fue la más rápida (146.6 ± 3.85 dpi), mientras que el producto cML-24h presentó el tiempo de incubación más largo (205.2 ± 13.15 dpi). La dilución $1:10^3$ del producto espontáneo generado tras 1 h de PMSA (inóculo cML-1h Dx) mantuvo su tasa de ataque del 100%, arrojando en esta ocasión un periodo de incubación de 383 ± 41.78 dpi. El inóculo cML-4h Dx, tras ser diluido $1:10^3$, indujo una EET en todos los ratones C57BL/6 del grupo experimental, siendo de nuevo el más rápido al hacerlo en un periodo de 284 ± 16.96 dpi. Por su parte, el producto cML-24h volvió a presentar el periodo de incubación más lento (489.5 ± 47.4 dpi), aunque siguió manteniendo una tasa de ataque completa. No se han observados signos clínicos asociados a EET en los ratones inoculados con las diluciones $1:10^4$ tras más de 550 días desde la fecha de inoculación. Sin embargo, uno de los ratones inoculados con cML-24h diluido $1:10^4$, fue sacrificado recientemente debido a signos compatibles con una EET, sugiriendo la posibilidad de que estas semillas aún puedan inducir enfermedad en sus respectivos grupos de experimentación. Al realizar una segunda inoculación utilizando como tres homogeneizados de tres encéfalos de los ratones afectados en el primer pase por cada producto horario diluido 1:10, los periodos de incubación se igualaron en torno a los 145 dpi, siendo en todos los casos la tasa de ataque del 100% (Tabla 7).

Tabla 7. Estudio de la infectividad de cuatro muestras de rec-Ra L108 Dx extraídas a distintos puntos horarios de PMSA mediante inoculación en ratones de genotipo silvestre. Las cuatro rec-Pr^{res} murinas obtenidas tras 0, 1, 4 y 24 h de PMSA fueron diluidas 1:10, $1:10^3$ y $1:10^4$ e inoculadas intracerebralmente en ratones C57BL/6 para determinar su infectividad específica. A partir de animales de esta primera inoculación, se realizó un segundo pase para estabilizar los tiempos de incubación. Se muestran los datos de tasa de ataque y periodo de incubación. N.D.: por determinar.

Cepa	Sustrato	PMSA (t)	1 ^{er} pase (C57BL6)						2 ^o pase (C57BL6)	
			10 ⁻¹		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻¹	
			Tasa de ataque	Días Post-inoculación	Tasa de ataque	Días Post-inoculación	Tasa de ataque	Días Post-inoculación	Tasa de ataque	Días Post-inoculación
cML-0h Dx	rec-MoL108 Dx	0h	0/7	>385 [†]	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
cML-1h Dx	rec-MoL108 Dx	1h	100%	187.4 ± 6.42	100%	383 ± 41.78	0/6	569.8 ± 55.7	100%	144.7 ± 2.74
cML-4h Dx	rec-MoL108 Dx	4h	100%	146.6 ± 3.85	100%	284 ± 16.96	0/6 [†]	>679.1 ± 32.4	100%	148.7 ± 2.55
cML-24h Dx	rec-MoL108 Dx	24h	100%	205.2 ± 13.15	100%	489.5 ± 47.4	0/6	598.83 ± 22.7	100%	140.8 ± 2.44

†: Resultados provisionales debido a que, para los grupos señalados, el estudio sigue en curso a fecha de depósito de esta tesis doctoral

Los cerebros de todos los animales sacrificados con signos clínicos o hallados muertos fueron analizados de manera rutinaria mediante técnicas de *immunoblot*, tras digerir con PK para revelar la existencia de PrP^{res} y observar los resultados mediante *Western blot* (Figura 39). Todos los cerebros de los animales sacrificados con signos clínicos propios de una EET presentaron un patrón clásico de PrP^{Sc} en *Western blot*. Los estudios anatomopatológicos de los cerebros de estos animales revelaron en todos ellos la presencia de alteraciones espongiiformes y depósitos de PrP^{res} que presentaban un patrón de punteado fino, sin llegar a observarse placas ni grandes agregados. En todos ellos las lesiones fueron muy similares, debido a que todos los inóculos procedían en última instancia del mismo material generado espontáneamente mediante PMSA a pesar de observarse diferencias en los periodos de incubación. Dichas variaciones no se observan en el segundo pase realizado a partir de los encéfalos de animales afectados tras la primera inoculación, lo que apunta a que los distintos periodos de incubación observados radican en una diferencia en el título infectivo de los productos horarios de rec-PrP^{res}.

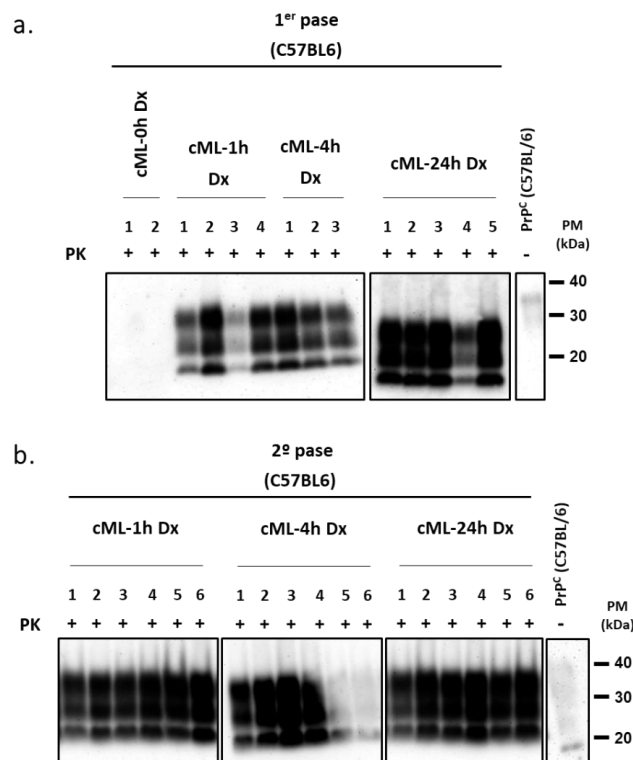


Figura 39. Estudio bioquímico de la PrP^{Sc} acumulada en el encéfalo de ratones C57BL/6 inoculados con las rec-PrP^{res} murinas obtenidas durante el estudio de la cinética del malplegamiento espontáneo. Una mitad del encéfalo de cada animal que presentó signos compatibles con una EET se homogeneizó y digirió con PK para la posterior detección de PrP^{Sc} mediante electroforesis y *Western blot*, utilizando el anticuerpo SAF83 (1:400). **a)** En los animales del primer pase pudo detectarse PrP^{Sc} en los inoculados con cML-1h Dx, cML-4h Dx y cML-24h Dx, que no mostraron diferencias en la PrP^{Sc} detectada ni en la tasa de ataque, indicando que todas ellas conforman la misma cepa de prion *bona fide*. Por el contrario, los animales inoculados con cML-0h Dx, que no presentaba rec-PrP^{res} detectable, no mostraron signos asociados a EET y al ser sacrificados por enfermedades intercurrentes, no se detectó PrP^{Sc} en sus encéfalos. **b)** En los animales del segundo pase se detectó PrP^{Sc} en todas las muestras analizadas, sin observar tampoco diferencias de patrón de movilidad electroforética. PrP^C (C57BL/6): homogeneizado de encéfalo de ratones C57BL/6 sin digerir, PM: Marcador de peso molecular.

7.3. Propagación *in vitro* de las rec-PrP^{res} obtenidas a distintos tiempos de PMSA y posterior estudio *in vivo* en modelo murino silvestre

El estudio *in vitro* e *in vivo* de los productos de PMSA extraídos a diferentes tiempos de reacción, reveló posibles diferencias de título, reflejados en diferencias en los tiempos de incubación de la inoculación directa de las semillas recombinantes. No obstante, es poco probable que las diferencias observadas se deban a que las semillas obtenidas a distintos tiempos de PMSA sean distintos confórmeros con características únicas, como indican la homogeneización de los tiempos de incubación en un segundo pase, así como la ausencia de diferencias detectables en las lesiones histopatológicas de los animales inoculados con estas semillas.

Para confirmar si las diferencias biológicas observadas en los distintos productos de la cinética pueden deberse a que presentan distinta cantidad de formas rec-PrP^{res} infecciosas o por el contrario a la generación de diferentes confórmeros con características de cepa distintivas, realizamos pases seriados de PMSA con el objetivo de homogeneizar los títulos de PrP recombinante malplegada y evaluar posteriormente sus características *in vivo*. De esta manera, utilizando como semilla los productos cML-1h Dx, cML-4h Dx y cML-24h Dx, se realizaron tres rondas seriadas de PMSA de 24 h cada una en sustrato basado en rec-Ra L108 Dx. Los productos obtenidos fueron digeridos con PK y los resultados se observaron mediante tinción de proteína total. Como puede apreciarse en la Figura 40, todos los productos dieron lugar a rec-PrP^{res} con una intensidad de señal y patrón de movilidad electroforética indistinguibles. Todos los productos de la propagación presentaron la señal correspondiente al fragmento de ~16 kDa y un doble bandeo en la región cercana a los ~9 kDa, de acuerdo con lo observado en las semillas originales provenientes del estudio cinético del malplegamiento espontáneo (Figura 37 b).

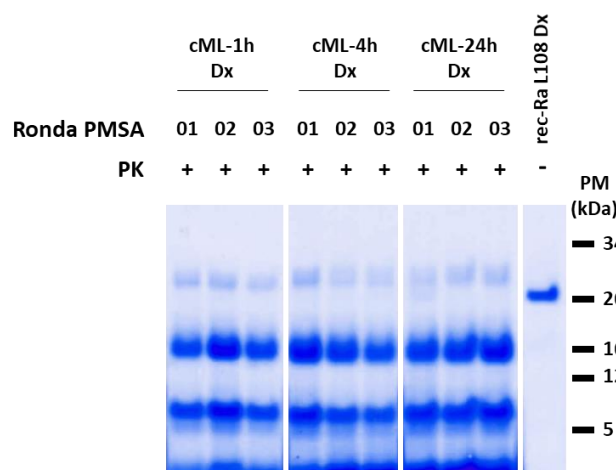


Figura 40. Propagación seriada en PMSA de las rec-PrP^{res} obtenidas a distintos tiempos en el estudio de la cinética del malplegamiento espontáneo. Electroforesis y tinción de proteína total tras la digestión con PK que muestra la estabilidad de los tres productos rec-Ra L108 Dx extraídos previamente de la cinética de espontaneidad mediante propagación en tres pases seriados de PMSA que tenían por objetivo homogeneizar los títulos de rec-PrP^{res}. Las muestras cML-1h Dx, cML-4h Dx y cML-24h Dx, propagadas conservaron sus perfiles electroforéticos originales (Figura 37 b) tras las rondas seriadas de PMSA, dando lugar a las muestras cML-1h Dx p3, cML-4h Dx p3 y cML-24h Dx p3 que presentan intensidades de señal similares. PM: marcador de peso molecular.

Para comprobar que la homogeneidad en intensidad de señal alcanzada por los tres productos horarios de rec-PrP^{res} tras tres pases seriados de PMSA, significó también que dichos productos igualaron sus títulos infectivos, se realizó un bioensayo utilizando de nuevo ratones C57BL/6. Los productos obtenidos a diferentes tiempos de PMSA y propagados en tres rondas seriadas, a los que se les denominó cML-1h Dx p3, cML-4h Dx p3 y cML-24h Dx p3, fueron inoculados intracerebralmente diluidos 1:10 en ratones C57BL/6 siguiendo el protocolo anteriormente descrito. La Tabla 8 muestra que los tres inóculos presentaron tasas de ataque completas y periodos de incubación muy similares en torno a los 160 dpi. El producto cML-1h Dx p3 indujo enfermedad priónica en los ratones C57BL/6 tras 155 ± 5.04 dpi, mientras que los productos cML-4h Dx p3 y cML-24h Dx p3 hicieron lo propio tras 165.2 ± 6.06 dpi y 161.8 ± 5.19 dpi respectivamente. Siguiendo el mismo protocolo que en el bioensayo anterior, los cerebros de todos los animales fueron analizados mediante técnicas de *immunoblot* para detectar la presencia de PrP^{res} (Figura 41). Todas las muestras analizadas fueron positivas al ensayo por ELISA, presentando también un patrón clásico de PrP^{Sc} en *Western blot*. Por otra parte, los estudios anatomopatológicos revelaron que todos los cerebros de los ratones inoculados en el bioensayo presentaron las características propias de una EET, observándose en todos ellos la presencia de espongiosis y depósitos de PrP^{res} similares a los del bioensayo anterior.

Las diferencias observadas entre los tiempos de incubación de los inóculos generados a distintos tiempos de PMSA utilizados en el primer bioensayo (Tabla 7), desaparecen tras las rondas de PMSA realizadas, lo que apunta a que se consiguió homogeneizar el título infectivo de los diferentes productos con el paso del tiempo. Este resultado confirmó la presencia de una única cepa de priones

recombinantes de ratón silvestre, apuntando a que las diferencias observadas en la infectividad específica *in vitro* e *in vivo* del primer pase no fueron causadas por distintos confórmers originados espontáneamente, sino por un único tipo de prion recombinante con diferentes propiedades intrínsecas relacionadas con el tiempo de PMSA. Ante un tiempo demasiado corto de PMSA (0-2 horas), la rec-PrP^{res} formada espontáneamente mostró una capacidad de propagación menor tanto *in vitro* como *in vivo* que cuando la reacción de malplegamiento resultaba más prolongada (4-8 horas). De la misma manera, un excesivo tiempo de PMSA (>24 horas) provocó que las rec-PrP^{res} generadas espontáneamente, potencialmente por la ultraestructura adquirida presente un menor título infectivo.

Tabla 8. Estudio de la infectividad de las muestras de rec-Ra L108 Dx extraídas a distintos tiempos y sometidas a tres rondas seriadas de PMSA mediante inoculación en ratones de genotipo silvestre. Tres de las cuatro rec-PrP^{res} obtenidas a distintos tiempos de PMSA (cML-1h Dx, cML-4h Dx y cML-24h Dx), fueron propagadas *in vitro* originando las cepas cML-1h Dx p3, cML-4h Dx p3 y cML-24h Dx p3, que fueron inoculadas intracerebralmente en ratones C57BL/6. Se muestran los datos de tasa de ataque, periodo de incubación y resultado del análisis mediante *Western blot* de la presencia de PrP^{Sc} con patrón clásico, además de lesiones espongióticas y marcaje de PrP^{res} detectadas mediante el estudio anatomopatológico. WB: *Western blot*, H/E: tinción de hematoxilina – eosina, IHQ: inmunohistoquímica, N.D.: por determinar.

Cepa	Sustrato	PMSA (t)	1 ^{er} pase (C57BL6)				
			Tasa de ataque	Días post-inoculación	Patrón clásico de PrP ^{res} (WB)	Espongiosis (H/E)	PrP ^{res} (IHQ)
cML-1h Dx p3	rec-MoL108 Dx	1h + 3p	100%	155 ± 5.04	4/4	N.D.	4/4
cML-4h Dx p3	rec-MoL108 Dx	4h + 3p	100%	165.2 ± 6.06	5/5	N.D.	5/5
cML-24h Dx p3	rec-MoL108 Dx	24h + 3p	100%	161.8 ± 5.19	5/5	N.D.	5/5

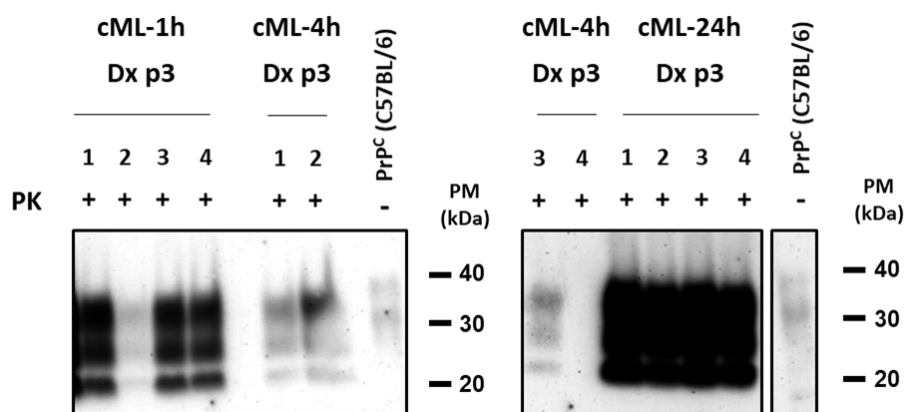


Figura 41. Estudio bioquímico de la PrP^{Sc} acumulada en el encéfalo de ratones C57BL/6 inoculados con las rec-PrP^{res} obtenidas a distintos tiempos de PMSA y propagadas de forma seriada. Una mitad del encéfalo de cada animal que presentó signos compatibles con una EET fue homogeneizada y digerida con PK para la posterior detección de PrP^{Sc} mediante electroforesis y *Western blot*, utilizando el anticuerpo SAF83 (1:400). En todos los animales pudo detectarse, sin observar diferencias en sus patrones de movilidad electroforética. Tras su propagación mediante tres rondas seriadas de PMSA, los periodos de incubación de las rec-PrP^{res} obtenidas a distintos tiempos de PMSA se igualaron. PrP^C (C57BL/6): homogeneizado de encéfalo de ratones C57BL/6 sin digerir, PM: Marcador de peso molecular

La PMSA ha demostrado ser una herramienta muy útil, tanto para la propagación de priones recombinantes ya existentes, como para la generación de nuevos priones espontáneamente. A lo largo de esta tesis doctoral, se han descrito los resultados obtenidos aplicando la técnica PMSA en diferentes secuencias de PrP recombinante murina. Los estudios de malplegamiento espontáneo de la PrP recombinante murina, han demostrado en conjunto, la posibilidad de malplegar mediante PMSA de forma consistente y dando lugar a proteínas malplegadas con características de priones *bona fide*, distintas PrP murinas en menos de 24 horas. Además, han revelado que pueden obtenerse distintos confórmeros a partir de un mismo proceso con determinadas características como la presencia de isoleucina en la posición 109 o la presencia de cofactor favoreciendo no sólo el evento de malplegamiento espontáneo, sino también la aparente variabilidad de confórmeros resultantes los cuales, tras una caracterización bioquímica y biológica, demostraron comportarse como cuatro cepas de priones *bona fide* diferentes. Entre las propiedades analizadas, algunos de estos priones recombinantes demostraron ser capaces de malplegar, tanto *in vitro* como *in vivo*, la PrP murina silvestre. Este dato condujo a la incorporación de ligeras modificaciones en el proceso que dieron lugar al malplegamiento sistemático de la PrP recombinante de ratón silvestre. A pesar de la aparente homogeneidad de las proteínas malplegadas resultantes, se observaron al menos dos confórmeros con características claramente distinguibles. El estudio de la cinética de malplegamiento de la PrP recombinante murina silvestre muestra además el potencial de la PMSA para analizar este fenómeno, al permitir trabajar con grandes volúmenes, utilizando un sustrato químicamente bien definido y dando lugar de forma consistente a malplegamiento espontáneo. Estas características hacen de la PMSA y su adaptación al estudio del malplegamiento espontáneo, una poderosa herramienta para generar modelos de estudio, aptos incluso para estudios estructurales mediante técnicas de alta resolución, que podrían ayudar a esclarecer los mecanismos que rigen el evento de malplegamiento proteico o la formación de confórmeros con propiedades variables.

8. Estudio de la cinética del fenómeno de malplegamiento espontáneo en otra especie

La obtención de priones recombinantes *bona fide* de forma espontánea en un modelo murino silvestre resulta de capital importancia para la investigación básica, siendo el modelo más ampliamente utilizado en la investigación de las EET. No obstante, la posibilidad de replicar en otras especies de mayor interés socioeconómico los resultados obtenidos con la PrP de ratón, sería de gran utilidad en el campo de los priones, ya que cada especie susceptible a EET presenta particularidades que probablemente no puedan trasladarse a los modelos de roedor más extendidos.

Por ello, se seleccionó la proteína priónica recombinante de oveja (rec-Ov) para tratar de reproducir los resultados de generación espontánea de priones *bona fide* obtenidos con la PrP de ratón silvestre. La elección de la oveja como especie en la que estudiar la generación espontánea *in vitro*, se basó en que es una de las especies en las que más casos de EET esporádica se han documentado, siendo además la primera especie en la que se reportaron casos de este tipo de enfermedad, conocida como scrapie en ovejas (Liberski, 2012). Por otra parte, fue la primera EET en la que se describió la existencia de cepas (Pattison and Millson, 1961b) y que demostró ser transmisible (Cuille and Chelle, 1936), lo que hizo que numerosos estudios de barrera de especie pivotaran en torno al uso de priones ovinos, dando lugar a numerosos aislados de priones distinguibles que componen las cepas clásicas más utilizadas en la actualidad (Zlotnik and Rennie, 1963, Chandler and Fisher, 1963). La oveja es también una especie de interés por las múltiples variaciones genéticas que presentan de manera natural en la secuencia que codifica su PrP, destacando sobre todos tres polimorfismos que han sido relacionados con diferente susceptibilidad al scrapie (VRQ (Val136 – Arg154 – Gln171), ARR (Ala136 – Arg154 – Arg171) y ARQ (Ala136 – Arg154 – Gln171) (Goldmann et al., 1994). El hecho de que los ejemplares que portan el polimorfismo VRQ sean los más susceptibles a scrapie, hizo que seleccionáramos esta variante génica como proteína recombinante ovina de estudio, esperando así que su mayor susceptibilidad *in vivo* se tradujera en una propensión aumentada para la formación espontánea de rec-PrP^{res} *in vitro*. Por lo tanto, se utilizó proteína priónica recombinante de oveja con el polimorfismo VRQ (rec-Ov VRQ) para realizar un estudio cinético similar al realizado utilizando rec-PrP murina silvestre y demostrar la capacidad de la PMSA para producir *in vitro* y de manera rápida, priones recombinantes espontáneos en otra especie. Dicho estudio, siguió un esquema de trabajo similar al de ratón silvestre (Figura 36 a), incluyendo preparación de diferentes *batches* de proteína, la formación de rec-PrP^{res} a diferentes tiempos de PMSA y los posteriores estudios *in vitro* e *in vivo* de los confórmeros generados.

8.1. Estudio de la formación de rec-PrP^{res} ovina a diferentes tiempos de PMSA

Operando de la misma manera que para el estudio de la cinética de malplegamiento de la PrP de ratón silvestre, se prepararon de manera independiente tres *batches* de proteína rec-Ov VRQ, utilizados para preparar tres sustratos con una concentración final de dextrano sulfatado del 0.5%. La concentración de PrP recombinante se igualó en función de la medición mediante absorbancia a 280 nm, lo que se comprobó posteriormente mediante diluciones seriadas, electroforesis y tinción de proteína total. La Figura 42 confirma que los tres sustratos contenían la misma cantidad de PrP, ya que al ser diluidos 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8 presentaron bandas de rec-PrP^{res} cuya señal disminuyó al mismo nivel en los tres sustratos.

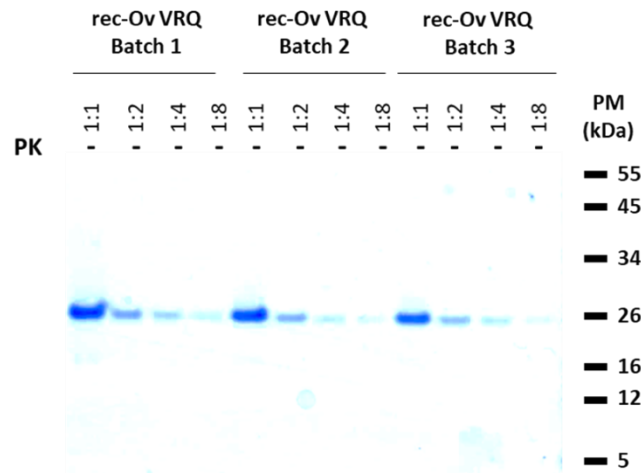


Figura 42. Visualización de sustratos preparados con distintos *batches* de rec-PrP ovina silvestre para el estudio de la cinética del malplegamiento espontáneo. Se utilizaron tres *batches* independientes de rec-PrP ovina con el polimorfismo VRQ (rec-Ov VRQ; Val136 – Arg154 – Gln171) para preparar los tres sustratos que posteriormente se utilizaron en el estudio de la cinética del malplegamiento espontáneo. Con el objetivo de confirmar que la concentración inicial de rec-PrP en los tres sustratos era similar, se diluyeron 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8 y se visualizaron mediante electroforesis y tinción de proteína total. Los tres sustratos presentaron una cantidad similar de PrP recombinante. PM: marcador de peso molecular.

Una vez se aseguró la misma concentración de rec-PrP en los tres sustratos de experimentación, se depositaron 25 ml de cada sustrato rec-Ov VRQ Dx por duplicado en dos tubos Falcon de 50 ml y se añadieron partículas esféricas de vidrio para favorecer el malplegamiento espontáneo de la PrP. Los seis tubos con rec-PrP ovina fueron sometidos a PMSA, tomando muestras de la misma fuente de sustrato a diferentes tiempos, tras 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas de PMSA. Las muestras extraídas fueron tratadas con PK para evaluar la presencia de rec-PrP^{res} a diferentes horas, observando los resultados mediante electroforesis y tinción de proteína total. Se detectó rec-PrP^{res} en casi todas las muestras extraídas tras 4 h de PMSA, alcanzando el 100% de los tubos positivos a las 6 h. En este caso, fue llamativo el hecho de que no todas las proteínas malplegadas *de novo* en cada uno de los *batches* presentaron un patrón de peso molecular idéntico, observándose diferencias inter-experimentales. Las Figuras 43 a y 43 c muestran la detección de rec-PrP^{res} ovina de uno de los duplicados de los *batches* 1 y 3, donde se aprecia la aparición de formas resistentes a PK en todas las muestras a partir de 4 h de PMSA. La señal detectada en estos *batches* a las 4 h es más leve que en el resto de las muestras tomadas con posterioridad, donde es intensa. Sin embargo, desde que se inicia la formación de rec-PrP^{res}, el patrón de movilidad electroforética de las proteínas malplegadas es el mismo en ambos casos, presentando una banda de ~16 kDa y un doble bandeo en la región cercana a los ~9 kDa, en el que la señal de la banda superior es más intensa que la inferior. No se observó el mismo perfil electroforético en las proteínas malplegadas generadas a partir del *batch* 2 de experimentación (rec-Ov Dx *Batch* 2), en el que la rec-PrP^{res} producida *de novo*, aunque igualmente detectada a partir de las

4 h de PMSA, presentaba un patrón de peso molecular diferente. En este caso concreto del *batch 2*, la señal de la banda ~16 kDa es particularmente intensa, pudiendo corresponder a dos fragmentos de tamaños muy similares. Por su parte, el doble bandeado de la región de ~9 kDa presentó una intensidad similar en sus dos bandas (Figura 43 b), a diferencia de lo observado para los *batches 1* y *3* de rec-Ov Dx. En ninguno de los casos se detectó rec-PrP^{res} en las muestras correspondientes a los sustratos antes de someterse a PMSA (0 h), ni en las muestras extraídas durante las primeras horas (1 y 2h), lo que significó un retraso del malplegamiento espontáneo por parte de la PrP ovina respecto a la PrP de ratón. Otra diferencia radicó en el hecho de que no observamos decaimiento de la señal de rec-PrP^{res} ovina tras 24 h de PMSA en las diferentes tinciones de proteína total, resultado observado en el caso de la PrP murina que posteriormente se reflejó en un decaimiento de su título infeccioso. Los resultados obtenidos en este segundo estudio cinético confirmaron que la formación de rec-PrP^{res} es un proceso que puede ser mimetizado de manera rápida gracias a la PMSA, existiendo ligeras diferencias dependiendo de la especie utilizada. A pesar de iniciarse más tarde en el tiempo, la generación espontánea rec-PrP^{res} ovina fue posible en todos los casos, detectándose además la presencia de diferentes patrones de movilidad electroforética que sugieren la obtención de distintas cepas de priones de oveja.

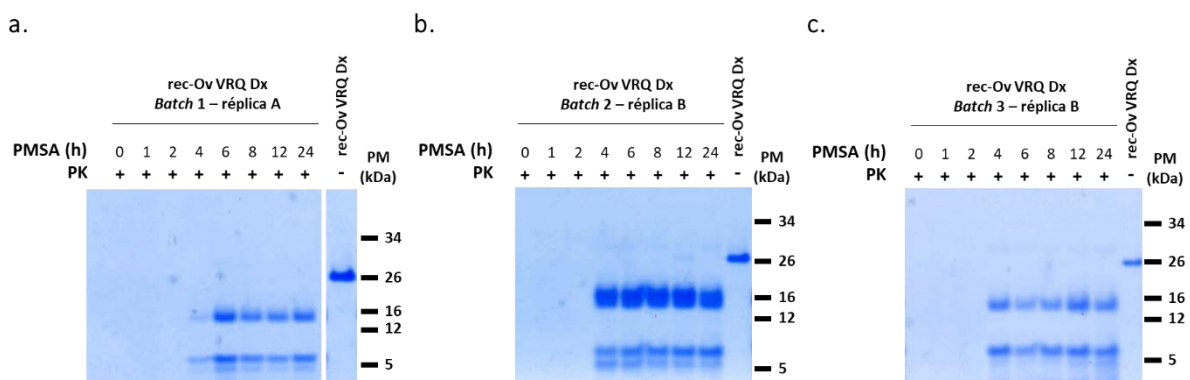


Figura 43. Estudio de la formación de rec-PrP^{res} ovina silvestre a diferentes tiempos de PMSA. Cada uno de los tres *batches* se ensayó por duplicado en PMSA en presencia de partículas esféricas de vidrio y con un volumen inicial de sustrato que permitió la extracción de muestras a distintos tiempos (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h) de PMSA. Se muestra la detección de rec-PrP^{res} mediante digestión con PK, electroforesis y tinción de proteína total de tres de las seis réplicas analizadas como representativas de los distintos patrones de movilidad electroforética identificados: **a)** la réplica A del *batch 1*, que presenta un patrón similar a los obtenidos en el *batch 3*, con una intensidad normal en la banda de 16 kDa. **b)** la réplica B del *batch 2*, que presenta un patrón diferente al del resto de réplicas, ya que la banda de aproximadamente 16 kDa es más intensa y sugiere que dicho fragmento proteolítico puede ser de un peso molecular mayor. **c)** la réplica B del *batch 3*, que presenta un patrón similar al *batch 1*, aunque con una banda de 16 kDa más intensa. En todos los casos se detectó rec-PrP^{res} tras 4h de PMSA, a pesar de observarse diferentes perfiles electroforéticos en determinadas réplicas con los distintos *batches*. PM: marcador de peso molecular.

8.2. Estudio de la potencial infectividad de las semillas recombinantes ovinas obtenidas a distintos tiempos de PMSA *in vitro* e *in vivo*

La detección de posibles confórmeros diferentes en la cinética de espontaneidad realizada con rec-PrP ovina condujo a que tratar de identificar propiedades que resultasen distintivas entre ellos. De esta manera, aunque el estudio cinético se enfocó igualmente en determinar en qué momento los confórmeros de rec-PrP^{res} ovina producidos adquirirían propiedades de prion *bona fide*, consideramos interesante la posibilidad de aislar potenciales cepas diferentes de priones ovinos. Para ello, en este punto, el protocolo a seguir varió en comparación con los procedimientos realizados en el estudio cinético de ratón silvestre, centrado únicamente en determinar las diferencias de título infectivo. De esta manera, la caracterización biológica semicuantitativa realizada *in vitro* mediante PMCA, se enfocó en la discriminación de posibles comportamientos de las rec-PrP^{res} generadas, para lo cual se utilizaron varios tipos de PrP^C encefálica con el objetivo de restringir la propagación de alguno de estos potenciales confórmeros.

8.2.1. Determinación de la capacidad de propagación *in vitro* de las semillas recombinantes mediante PMCA en modelo ovino transgénico

De la misma manera que en los estudios cinéticos realizados con la PrP murina silvestre, la determinación de la capacidad de malplegamiento de PrP^C encefálica *in vitro* de las rec-PrP^{res} ovinas generadas pretendían testar su potencial infectividad *in vivo* y estimar infectividad específica. Apoyándonos en los datos de infectividad específica de los priones silvestres de ratón previamente obtenidos (Figura 38) y teniendo en cuenta que la generación espontánea en oveja había sido menos eficiente en cuanto a tiempo necesario de PMSA, se limitaron las diluciones seriadas de cada producto extraído a diferentes tiempos a 1:10, 1:10², 1:10³ y 1:10⁴. Por otra parte, al haber observado que las mayores diferencias en la infectividad específica se centran al inicio y al final del proceso de generación espontánea, se seleccionaron únicamente las muestras extraídas tras 0, 2, 4, 6, y 24 horas de PMSA. En cuanto al sustrato de PMCA, se decidió utilizar cerebros de animales transgénicos Tg501, modelo sobreexpresor de la PrP^C ovina que presenta el polimorfismo ARQ que suponía una barrera polimórfica entre la PrP^C encefálica y los inóculos a testar, con la idea de detectar diferencias entre los potenciales confórmeros obtenidos. De esta manera, las muestras extraídas tras 0, 2, 4, 6, y 24 horas de PMSA por duplicado de cada uno de los tres sustratos fueron tratadas como inóculos independientes, siendo diluidas 1:10, 1:10², 1:10³ y 1:10⁴ en sustrato basado en homogeneizados cerebrales de ratones Tg501. Para controlar la aparición de PrP^{Sc} espontánea y descartar contaminaciones cruzadas, se incluyeron en ambas rondas cuatro muestras sin semilla, que contenían únicamente sustrato y dextrano sulfatado a la misma concentración final que los tubos con semilla. Los tubos de experimentación y los controles

negativos se sometieron a tres rondas seriadas de PMCA de 24 h cada una, fueron digeridos con PK y visualizados mediante *Western blot*.

La Figura 44 muestra los resultados obtenidos tras dos rondas de PMCA mediante *Western blot*, ejemplificando el diferente comportamiento observado en las rec-PrP^{res} ovinas generadas a partir de distintos *batches*. En ella se aprecia que los confórmeros de rec-PrP^{res} generados a partir del *batch* 1 y del *batch* 3 de rec-PrP ovina (réplicas A y B respectivamente), que presentaron un patrón de movilidad electroforética típico, son capaces de malplegar la PrP^C presente en el sustrato desde que la proteína malplegada es detectable, tras 4 horas de PMSA (Figuras 44 a y 44 c). Sin embargo, en la Figura 44 b observamos como las semillas del *batch* 2 (réplica B), que presentaron un patrón de movilidad electroforética particular, no son capaces de malplegar la PrP^C ovina tras dos rondas de PMCA. Estos resultados se corroboraron tras una ronda adicional de PMCA, confirmando las diferencias existentes entre los confórmeros de rec-PrP^{res} ovina. Todos los tubos sin semillas y las muestras extraídas a las 0 y 2 h resultaron negativas tras la digestión con PK y la observación de resultados mediante *Western blot* (Figura 44). Ninguna dilución superior a 1:10² dio lugar a proteína malplegada tras tres rondas de PMCA, independientemente del *batch* de procedencia del inóculo utilizado, siendo los inóculos extraídos tras 6 h de PMSA los que malplegaron con mayor eficacia la PrP^C disponible en el sustrato basado en encéfalos de ratones Tg501, al necesitar la mayoría de las veces únicamente 24 h de PMCA para su propagación.

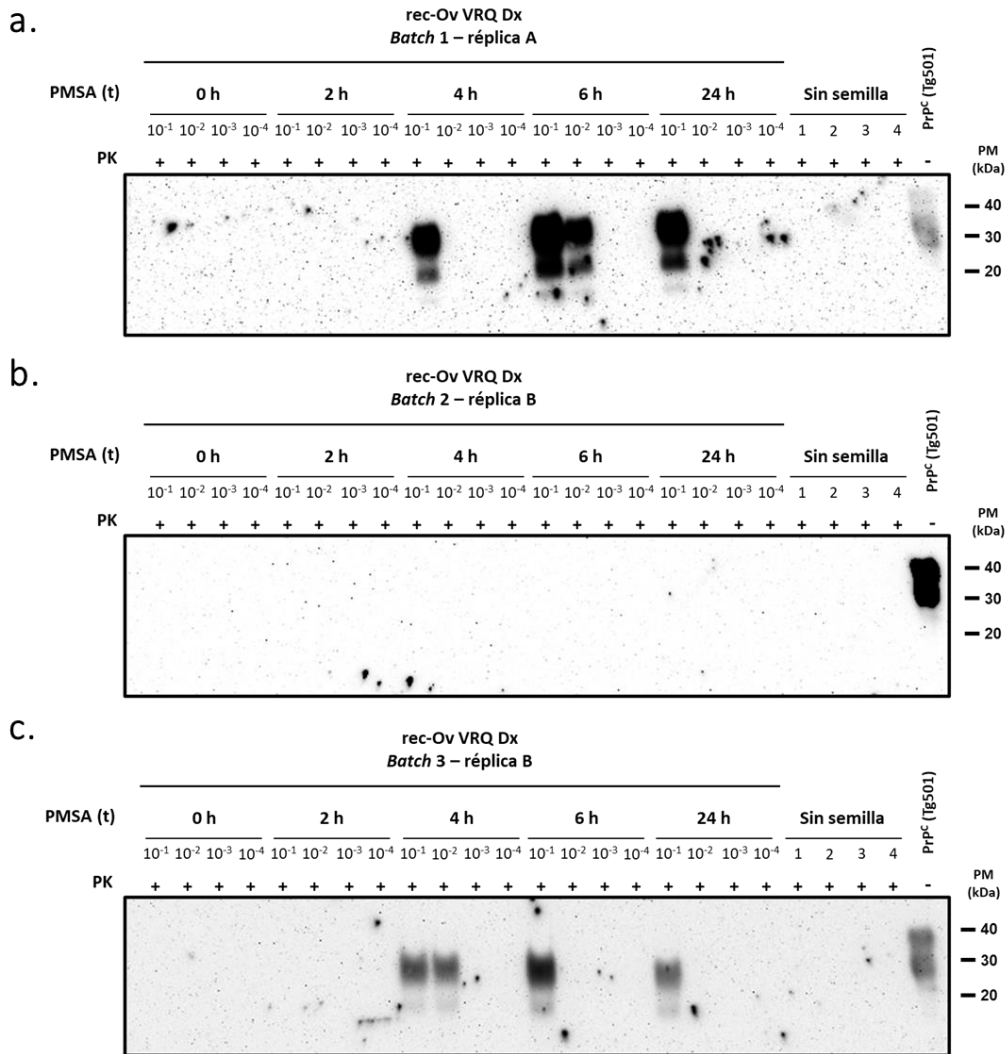


Figura 44. Determinación de la infectividad potencial *in vivo* de las rec-PrP^{res} ovinas obtenidas a distintos tiempos de PMSA mediante PMCA utilizando homogeneizado de encéfalo de ratones transgénicos que sobreexpresan la PrP^C ovina con el polimorfismo ARQ. *Western blot* de los productos obtenidos tras dos rondas de PMCA con homogeneizado cerebral de ratones transgénicos que sobreexpresan la PrP^C ovina con el polimorfismo ARQ (Tg501) como sustrato y utilizando como semillas las muestras de rec-PrP^{res} extraídas a distintos tiempos de PMSA durante la generación espontánea. Con el objetivo de testar la capacidad de las rec-PrP^{res} ovinas para malplegar la PrP^C ovina de encéfalo, se diluyeron las muestras de 0, 2, 4, 6 y 24 h a 1:10, 1:10², 1:10³ y 1:10⁴ y se sometieron a una ronda de PMCA de 24 h. Tras ese periodo, los productos de la primera ronda se diluyeron 1:10 en sustrato fresco y se sometieron a otra ronda de la misma duración. La evaluación de los resultados se llevó a cabo mediante digestión con PK, electroforesis y *Western Blot* utilizando el anticuerpo monoclonal D18 (1:5 000). **a)** Las muestras de la réplica A del *batch* 1 obtenidas tras 4, 6 y 24 h de PMSA mostraron la mayor capacidad para malplegar la PrP^C encefálica de ratones Tg501, pudiendo ser diluidas hasta 1:10². **b)** Ninguna de las muestras originadas a partir de la réplica B del *batch* 2 fue capaz de malplegar la PrP^C encefálica de ratones Tg501, sugiriendo que podría resultar no infecciosa *in vivo*. **c)** Las muestras de la réplica B del *batch* 3 obtenidas tras 4, 6 y 24 h de PMSA mostraron la mayor capacidad para malplegar la PrP^C encefálica de ratones Tg501, pudiendo ser diluidas hasta 1:10² de manera similar a las del *batch* 1. PrP^C (Tg501: homogeneizado de encéfalo de ratones Tg501 sin digerir utilizados como sustrato, PM: marcador de peso molecular).

Por ese motivo, se seleccionaron todas las muestras extraídas a las 6 h para realizar un ensayo adicional de propagación *in vitro* mediante PMCA, variando el sustrato utilizado. En este caso, se homogeneizaron cerebros de ratones transgénicos Tg338, modelo sobreexpresor de la PrP^C ovina que presenta el polimorfismo VRQ, idéntica en secuencia a los inóculos a testar, facilitando así su propagación *in vitro*. Los seis inóculos de rec-PrP^{res} ovina obtenidos tras 6 h de PMSA fueron sometidos a dos rondas de propagación *in vitro* de 12 h de duración, utilizando la herramienta PMCA en las condiciones habituales. De la misma manera que en el ensayo *in vitro* utilizando cerebros de Tg501, las semillas se diluyeron 1:10, 1:10², 1:10³ y 1:10⁴, esta vez en sustrato basado en homogeneizados cerebrales de ratones Tg338. De nuevo se incluyeron muestras sin semilla que contenían sustrato y dextrano añadido. Tras las dos rondas de PMCA, tanto los tubos con semilla como los controles negativos, fueron digeridos con PK y observados mediante *Western blot*. La Figura 45 muestra el resultado de este, en el que observamos que todos los inóculos ovinos generados espontáneamente mediante PMSA malpliegan de manera efectiva la PrP^C de ratón Tg338. Aunque los productos de algunos de los *batches* dan lugar a proteína malplegada aparentemente en menor cantidad, dada la menor intensidad de señal observada en *Western blot*, únicamente en el caso de la semilla del *batch* 2 (réplica B), no se observó presencia de PrP^{Sc}, confirmando la incapacidad para malplegar PrP^C de encéfalo que presentan los confórmeros generados en una de las réplicas de este *batch* y distinguiéndolos claramente del resto de semillas ovinas obtenidas.

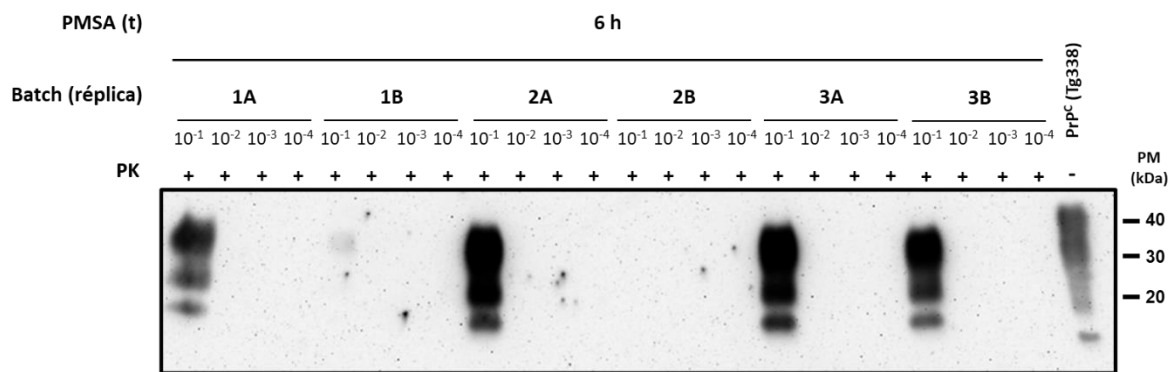


Figura 45. Determinación de la infectividad potencial *in vivo* de las rec-PrP^{res} ovinas obtenidas tras 6 h de PMSA mediante PMCA utilizando homogeneizado de encéfalo de ratones transgénicos que sobreexpresan la PrP^C ovina con el polimorfismo VRQ. *Western blot* de los productos obtenidos tras dos rondas de PMCA con homogeneizado cerebral de ratones transgénicos que sobreexpresan la PrP^C ovina con el polimorfismo VRQ (Tg338) como sustrato y utilizando como semillas las muestras de rec-PrP^{res} ovina extraídas tras 6 h de PMSA. Con el objetivo de observar diferencias entre los distintos *batches* a la hora de malplegar la PrP^C ovina encefálica que permitan identificar diferencias entre las rec-PrP^{res} ovinas, los productos de 6 h de las dos réplicas de cada *batch* se diluyeron 1:10, 1:10², 1:10³ y 1:10⁴ y se sometieron a una ronda de PMCA de 24 h. Tras ese periodo, los productos de la primera ronda se diluyeron 1:10 en sustrato fresco y se sometieron a otra ronda de la misma duración. La evaluación de los resultados se llevó a cabo mediante digestión PK, electroforesis y *Western Blot* utilizando el anticuerpo monoclonal D18 (1:5 000). Todas las muestras testadas fueron capaces de malplegar la PrP^C encefálica de ratones Tg338, con la excepción de la muestra procedente de la réplica B del *batch* 2, que no dio lugar al malplegamiento de la PrP^C de encéfalo de este modelo coincidiendo con lo observado previamente con la PrP^C ovina con polimorfismo ARQ. PrP^C (Tg338): homogeneizado de encéfalo de ratones Tg338 sin digerir utilizados como sustrato, PM: marcador de peso molecular.

8.2.2. Determinación de la infectividad *in vivo* en distintos modelos ovinos

Con el objetivo de confirmar que los priones recombinantes ovinos generados mediante PMSA presentaban el mismo comportamiento *bona fide* que los priones murinos de la cinética de espontaneidad, se diseñaron una serie de estudios *in vivo* los cuales se encuentran en curso actualmente. Mientras que el ensayo cinético basado en la PrP murina silvestre sirvió para caracterizar el evento de espontaneidad de manera detallada tanto *in vitro* como *in vivo*, la aplicación de esta misma estrategia utilizando PrP ovina con el polimorfismo VRQ condujo no solo a la formación de rec-PrP^{res} de forma espontánea, sino también a la aparición de diferentes confórmeros que demostraron tener un comportamiento distinguible *in vitro*. De la misma manera que ocurrió con los confórmeros de ratón silvestre, es necesario recurrir al bioensayo para confirmar las propiedades infecciosas *in vivo* de los priones recombinantes de oveja producidos *de novo*, así como para confirmar sus potenciales propiedades de cepas diferentes.

La elección de los inóculos se basó en los comportamientos distintivos observados tanto en el patrón de movilidad electroforética de las rec-PrP^{res} generadas, como en los resultados de la propagación *in vitro* utilizando PrP^c encefálica con el polimorfismo ARQ y VRQ. De esta manera, los confórmeros de 6 horas correspondientes al *batch* 1 (réplica A) y al *batch* 2 (réplica B), fueron seleccionados para los experimentos *in vivo*, siendo denominados inóculos cVRQ-1A Dx y cVRQ-2B Dx, haciendo referencia a la manera en la que se obtuvieron (c; cinética de espontaneidad), a su polimorfismo, al *batch* y réplica a la que pertenecen y a la presencia de dextrano en ambos. Siguiendo el protocolo anteriormente descrito, los productos cVRQ-1A Dx y cVRQ-2B Dx fueron inoculados intracerebralmente diluidos 1:10 tanto en ratones Tg501 como en ratones Tg338, que sobreexpresan la PrP con el polimorfismo ARQ y VRQ respectivamente. Este bioensayo fue iniciado recientemente, por lo que no se dispone de datos relacionados con la tasa de ataque o el periodo de incubación de las distintas semillas en estos animales. Sin embargo, debido a que hasta la fecha se ha observado una correlación total entre la capacidad de propagación *in vitro* e *in vivo* por parte de las cepas de rec-PrP murinas generadas de manera espontánea, se espera un comportamiento similar con los confórmeros ovinos inoculados.

Atendiendo a los resultados obtenidos en PMCA, solo el producto cVRQ-1A Dx debería ser capaz de inducir una EET en los ratones transgénicos de experimentación, por lo que fue seleccionado para realizar un bioensayo adicional en un modelo ovino que no sobreexpresaba PrP. De esta manera, el producto cVRQ-1A Dx fue inoculado 1:20 en dos corderos (macho y hembra) de 89 días de edad, genotipo VRQ/VRQ y de raza Rasa Aragonesa. Ninguna de las dos ovejas ha mostrado signos clínicos propios de una enfermedad priónica hasta el momento, tras 341 dpi, aunque el periodo de incubación de una EET en estos animales es habitualmente más largo. El desarrollo de una EET por parte de estos

animales supondría la confirmación de la infectividad de los priones recombinantes ovinos generados espontáneamente mediante PMSA, siendo la primera vez que se describiese dicho fenómeno y suponiendo modelos de experimentación de gran interés en el campo de los priones en relación con el evento de malplegamiento espontáneo.

DISCUSIÓN

Dificultades y relevancia del modelado de las enfermedades priónicas esporádicas

Mientras el malplegamiento proteico en las EET de origen genético y adquirido pueden llegar a comprenderse de forma intuitiva, el malplegamiento espontáneo que lleva a la aparición esporádica de una prionopatía es un tema completamente desconocido, aunque de gran interés para la comunidad científica, ya que suponen la gran mayoría de los casos de EET diagnosticados en humanos (Ironsides et al., 2017). Dentro de este grupo de enfermedades destaca el CJD esporádico (sCJD), síndrome caracterizado a nivel clínico por una rápida y progresiva demencia que alterna con mioclonías generalmente, además de presentar otros síntomas motores. La amplia horquilla de edad de aparición de los síntomas, sumado a la rapidez y letalidad de la enfermedad, dificultan el estudio de su etiología (Hill et al., 2003). Por otra parte, se han detectado numerosas formas atípicas de sCJD a lo largo de la historia, la amplia heterogeneidad clínica que caracteriza la forma esporádica del CJD (Gomori et al., 1973, Brown et al., 1984), dificultando enormemente la clasificación completa de todos los posibles subtipos asociados a ella (Parchi et al., 2012). Por ese motivo, además de las características clínicas estas clasificaciones atienden a aspectos moleculares de la PrP, como las diferentes intensidades en el patrón de glicosilación de la PrP^{Sc}, la distinta resistencia al tratamiento con proteasas o el aminoácido que ocupa la posición 129 de la PrP. Algunos autores defienden que una correcta clasificación molecular de las enfermedades priónicas tendría importantes implicaciones epidemiológicas que podrían ayudar, no sólo a correlacionar las características fenotípicas con los distintos conformeros de PrP^{Sc}, sino también a esclarecer la etiología de la variante esporádica de la enfermedad, posibilitando la asociación entre variables ambientales y distintas cepas priónicas (Hill et al., 2003). No obstante, todas estas clasificaciones se basaron en datos recopilados a través de aislados procedentes de pacientes que sufrieron CJD, lo que supone una limitación debido al bajo número de muestras de estudio y resultan además una constante fuente de heterogeneidad.

Debido a estas limitaciones, el estudio *in vivo* del evento de malplegamiento espontáneo se limitó al uso de animales transgénicos que portaban mutaciones en su gen *PRNP* o que expresaban la PrP^C desencadenando una neuropatía espontánea (Brandner and Jaunmuktane, 2017). Ninguno de estos casos conseguía emular de manera fidedigna la conversión espontánea de la PrP^C en PrP^{Sc} o la amplia heterogeneidad subyacente a este evento, lo que llevó al uso de PrP recombinante para tratar de reproducir y estudiar dichas características. La generación espontánea de priones sintéticos *bona fide* ha sido un objetivo perseguido en el campo de los priones prácticamente desde que se conoció la naturaleza exclusivamente proteica de este agente (Prusiner, 1982). Desde entonces, numerosos grupos de investigación han intentado con mayor o menor éxito, la producción *in vitro* de priones a partir de PrP recombinantes. Sin embargo, aunque gran parte de ellos obtuvieron proteínas malplegadas que no resultaron infecciosas *in vivo*, algunos de estos primeros productos sí consiguieron

inducir una enfermedad priónica en un modelo animal, con la desventaja de presentar periodos de incubación extremadamente largos o de la inducción de la enfermedad únicamente en modelos animales que sobreexpresaban PrP^C (Legname et al., 2004, Deleault et al., 2007). En otros casos, las proteínas malplegadas *in vitro* de manera espontánea eran autopropagables, presentaban resistencia al tratamiento con proteasas, pero no eran capaces de infectar un modelo animal silvestre en una primera inoculación, no pudiendo ser considerados priones *bona fide* (Makarava et al., 2010). Aunque en la pasada década se obtuvo mediante PMCA el primer prion recombinante capaz de inducir una EET en ratones silvestres con periodos de incubación similares a los de las cepas clásicas (Wang et al., 2010), este evento no ha sido reproducible de forma consistente por parte de otros grupos de investigación en más de diez años, obteniendo proteínas malplegadas recombinantes *de novo* con determinadas características de los priones, pero no infecciosos (Timmes et al., 2013). Esta metodología de generación espontánea de priones recombinantes *bona fide* resultó ser compleja y altamente variable, haciendo que la obtención de priones *bona fide* fuera un suceso prácticamente azaroso y de muy baja frecuencia, lo que ha hecho que la generación espontánea de priones *in vitro* continúe siendo uno de los temas de interés en el campo. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral vendrían a resolver este inconveniente, puesto que gracias a la herramienta PMSA, se obtienen priones sintéticos *de novo* de manera rápida y consistente, permitiendo un estudio sistemático de sus propiedades y del evento de malplegamiento.

A la dificultad de mimetizar *in vitro* el malplegamiento espontáneo se le suma el hecho de reproducir la heterogeneidad observada en el sCJD, que podría ser fruto de la existencia de diferentes formas de malplegamiento que originan conformeros ligeramente diferentes o llevan a la aparición de cuasi-especies y sub-cepas (Collinge and Clarke, 2007). Desde que la transmisibilidad de las enfermedades priónicas se demostró en ovejas (Cuille and Chelle, 1936), se sucedieron los experimentos para demostrar dicha característica en otras especies (Gajdusek et al., 1967, Gibbs et al., 1968, Gibbs and Gajdusek, 1972). Fruto de uno de esos ensayos, se detectó por primera vez la presencia de dos cepas priónicas diferentes en cabras de experimentación inoculadas con un mismo aislado de scrapie ovino. Estas dos cepas, *scratching* y *drowsy* en inglés (Pattison and Millson, 1961b), fueron las primeras descritas en el campo de los priones y abrieron la puerta a numerosos estudios destinados a comprender el fenómeno de cepa y la adquisición de diferentes propiedades por priones con la misma secuencia aminoacídica. Aunque la caracterización final de las propiedades de una cepa solo puede realizarse a través de un bioensayo, el uso de herramientas *in vitro* facilita enormemente su estudio, permitiendo un cribado de las posibles cepas atendiendo a sus propiedades bioquímicas distintivas. El grupo de Byron Caughey fue pionero en este aspecto, diseñando una herramienta denominada “ensayo libre de células” que les permitió malplegar PrP^C purificada de cerebro *in vitro*,

por inducción de priones de hámster de origen encefálico y manteniendo algunas de las características de dicha cepa clásica de hámster (Bessen et al., 1995). Posteriormente, la PMCA también demostró ser capaz de reproducir las características de cepa en sus productos amplificados *in vitro* a partir de PrP^C proveniente de encéfalo (Castilla et al., 2005). Esta herramienta resultó muy útil para estudiar propiedades de priones *in vitro* como su habilidad para superar barreras de transmisión (Fernandez-Borges et al., 2009), aunque en ocasiones permitió rebasar ciertas barreras que nunca pudieron superarse *in vivo* (Sigurdson et al., 2006), lo que conduce a la necesidad de otros estudios que complementen y permitan una mejor comprensión de las propiedades de cepa y su potencial transmisibilidad. Además, la PMCA resulta en una alta variabilidad probablemente por la dificultad de controlar todos los parámetros de operación (Piening et al., 2005), lo que supone un problema a la hora de obtener priones recombinantes espontáneos de forma consistente. Por el contrario, como se ha demostrado en los resultados de esta tesis doctoral, es posible generar diferentes cepas de priones recombinantes y mantener sus propiedades tras pases seriados de PMSA. La mayor simplicidad de la técnica y la presencia controlada de un único cofactor en el medio de reacción permite reducir la variabilidad de los resultados, ofreciendo un entorno más homogéneo que el de la PMCA, en que tradicionalmente se han utilizado homogeneizados de encéfalo, y permitiendo la propagación estable de cepas y una correcta caracterización de sus propiedades.

Demostrando la utilidad de la PMSA para el modelado del malplegamiento espontáneo de priones *in vitro*

El desarrollo de la PMSA como sistema de propagación *in vitro* basado en el uso de proteína recombinante sometida a agitación (Erana et al., 2019), supuso un mejor control de los parámetros de operación, lo que aumenta la consistencia de los resultados obtenidos, erigiéndose como una herramienta de enorme valor. Su uso para testar compuestos con posible actividad anti-priónica (Charco, 2018, González-Miranda, 2020) o para evaluar distintos métodos de descontaminación (Erana et al., 2020b), demuestran su gran versatilidad y permiten entrever el potencial que atesora la técnica. Esta tesis doctoral se ha basado precisamente en el uso de la PMSA para la generación espontánea de nuevos priones recombinantes, persiguiendo un conocimiento más completo del evento de malplegamiento espontáneo mediante la generación de las herramientas necesarias para modelarlo *in vitro*. Con ese objetivo principal y, teniendo en cuenta que la heterogeneidad observada en las cepas priónicas sugería la posibilidad de obtener variantes estructurales de la PrP fruto de varios tipos de malplegamiento, se incluyó un análisis bioquímico y biológico detallado de los priones generados espontáneamente en busca de posibles cepas recombinantes. La obtención *in vitro* de manera rápida

y robusta de diferentes priones recombinantes que presenten las características de un prion *bona fide*, supondría un avance notorio en el campo, facilitando modelos para estudios estructurales y mecánicos y permitiendo a través de una técnica robusta y fácil de implementar, una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que rigen la conversión de la PrP y que hasta el momento, permanecen desconocidos.

La experiencia de este laboratorio en la generación espontánea de priones recombinantes comenzó con el uso de la proteína priónica del topillo rojo (*Bank vole*), debido a la susceptibilidad que presenta esta especie tanto a la infección por priones exógenos (Watts et al., 2014), como para desarrollar una prionopatía en modelos transgénicos (Watts et al., 2012). Estos primeros ensayos por parte del laboratorio consiguieron de manera exitosa la obtención de priones espontáneos basados en la rec-PrP del topillo rojo (resultados pendientes de publicación), por lo que a continuación quisimos determinar si esa misma metodología podía aplicarse a secuencias de PrP de otras especies o si estaba limitada al topillo rojo por su gran tendencia al malplegamiento. La razón de elegir al ratón como especie candidata para la generación espontánea de priones, se basó en su universalidad como modelo de experimentación, siendo muy utilizado en el campo de los priones donde numerosas cepas de priones clásicos han sido adaptadas a esta especie (Zlotnik and Rennie, 1963, Chandler and Fisher, 1963). El polimorfismo I109 de la PrP del topillo rojo ha sido señalado como uno de los determinantes de sus propiedades únicas (Watts et al., 2016), por lo que, como parte de nuestra estrategia inicial para obtener priones recombinantes murinos malplegados espontáneamente, reprodujimos dicha variación en la posición correspondiente en la PrP de ratón, dando lugar a proteína recombinante Ra-L108I. Los primeros ensayos de generación espontánea mediante PMSA con la rec-PrP de ratón L108I no resultaron tan exitosos como con la proteína del topillo rojo, siendo completamente negativos cuando no se incluyó la mutación L108I. Para mejorar la eficiencia de malplegamiento espontáneo de esta proteína fue necesario modificar la metodología inicial, realizando cambios en el volumen de experimentación y en las partículas esféricas utilizadas. La presencia de partículas esféricas de entre 0.5 mm y 1.0 mm de diámetro han demostrado mejorar la propagación *in vitro* de priones, tanto en la técnica de PMCA (Fernandez-Borges and Castilla, 2010, Gonzalez-Montalban et al., 2011, Johnson et al., 2012) como en la de PMSA (Erana et al., 2019, Erana et al., 2020b). Sin embargo, los estudios preliminares realizados en este laboratorio señalaron que partículas con un diámetro menor facilitan la generación espontánea de rec-PrP^{res}, observando también que las partículas de vidrio eran más eficientes que las de otros materiales. Estas diferencias en los materiales respecto a la adsorción de rec-PrP y al comportamiento ante priones recombinantes ya ha sido reportada en la propagación en PMSA (Erana et al., 2020b). De esta manera, las partículas esféricas de vidrio de entre 0.1 y 0.2 mm fueron seleccionadas para la generación espontánea de priones recombinantes murinos, tras detectar

experimentalmente que facilitaban el malplegamiento espontáneo de distintas PrP recombinantes (resultados pendientes de publicación). Estas observaciones fueron puramente empíricas y en el momento en el que se redacta esta tesis doctoral, se desconocen los mecanismos que conducen a que ciertos materiales favorezcan procesos de malplegamiento espontáneo en la rec-PrP. Una posible explicación estaría relacionada con las cargas negativas presentes en cualquier superficie compuesta de vidrio en solución acuosa, posiblemente favoreciendo la aparición de interacciones electrostáticas con la PrP. Se ha reportado en varias ocasiones que el uso de polianiones cargados negativamente estimula la conversión *in vitro* de PrP a PrP^{res} (Deleault et al., 2003), incluyendo el dextrano sulfatado presente en los sustratos utilizados (Fernandez-Borges et al., 2017a), encontrando también algún ejemplo de propagación *in vivo* (Kovalchuk Ben-Zaken et al., 2015). Sin embargo, también se han detectado efectos similares con la adición de moléculas sin carga neta (Deleault et al., 2012a) o incluso de cationes como el Mn⁺² (Brazier et al., 2010). Otra explicación podría residir en el menor tamaño de las partículas esféricas utilizadas; la agitación mediante PMSA de partículas esféricas de 0.1-0.2 mm de diámetro podría causar un incremento de energía que facilitaría la formación de PrP^{res}. Uno de los primeros modelos propuestos se basaba en que ambas formas de la PrP se encontraban separadas por una barrera energética y que la transformación directa de PrP^C a PrP^{Sc} es un evento termodinámicamente desfavorecido (Prusiner, 1991). La vibración generada por las partículas de vidrio, moviéndose en un espacio mayor que el disponible en los tubos utilizados en los primeros intentos de generar espontáneamente rec-PrP^{res}, podría ocasionar la superación de dicha barrera energética y permitir el paso de rec-PrP a rec-PrP^{res}. Independientemente del mecanismo molecular responsable de favorecer el malplegamiento espontáneo en presencia de partículas esféricas de vidrio de 0.1-0.2 mm, los resultados obtenidos con esta nueva metodología fueron satisfactorios para la proteína recombinante de ratón con la mutación L108I. La aparición de formas resistentes a proteasa desde la primera ronda de PMSA, despejan prácticamente toda duda acerca de posibles contaminaciones con PrP^{Sc} exógenas que propicien el malplegamiento de la rec-PrP presente en los sustratos utilizados. Además, el uso de la agitación frente a la sonicación evita los picos de altas temperaturas proporcionando energía de manera más homogénea y disminuyendo la variabilidad experimental de esta técnica (Colby and Prusiner, 2011), lo que nos llevó a seleccionar la PMSA en estas condiciones como herramienta para la generación de priones recombinantes murinos. Los primeros resultados obtenidos con esta estrategia confirman que el efecto del aminoácido situado en la posición 109 en la PrP de topillo rojo para su mayor tendencia al malplegamiento espontáneo es extensible a la PrP murina.

Importancia de un solo cambio aminoacídico en la tendencia al malplegamiento espontáneo de la PrP murina

Al igual que el topillo rojo, los ratones también presentan un polimorfismo en esta posición que ha sido descrito como responsable de diferencias en la susceptibilidad a la transmisión de priones (Moore et al., 1998), por lo que no es descabellado pensar que la presencia de otros residuos en la posición 108 de la PrP murina podrían influir positivamente en la tendencia al malplegamiento espontáneo de la misma. La importancia de los polimorfismos presentes en la PrP ha sido ampliamente estudiada y ha demostrado ser clave tanto en el desarrollo de CJD en humanos (Collinge, 2001) como en la susceptibilidad ante las enfermedades priónicas en otros mamíferos (Carlson et al., 1988, Goldmann et al., 1994). De la misma manera, la posición en la que se encuentra dicha variante polimórfica puede originar diferencias estructurales, como las observadas en el giro rígido de la PrP^C de ciertas especies y que han sido relacionadas con el fenómeno de barrera de transmisión (Erana et al., 2017, Lysek et al., 2005). A diferencia de otros polimorfismos o mutaciones clave en la susceptibilidad a la infección priónica o relacionados de forma directa con la aparición de EET, el polimorfismo de topillo rojo se encuentra en el dominio flexible N-terminal en lugar de en el dominio globular C-terminal, que concentra gran parte de la variabilidad genética de la PrP. Aunque la presencia de isoleucina en la posición 109 ha demostrado estar relacionada con el desarrollo de EET *in vivo* en ratones transgénicos que sobreexpresan la PrP del topillo rojo (Watts et al., 2012) o la PrP murina con este polimorfismo (Venegas, 2018), lo cierto es que desconocemos si algún otro aminoácido en esa posición podría ser más efectivo en la generación espontánea de priones recombinantes murinos *in vitro*. Con el fin de despejar dicha incógnita, se sometieron a las mismas condiciones de PMSA 20 sustratos diferentes basados en PrP recombinantes murinas, cada uno de ellos con un aminoácido distinto en la posición 108. Este estudio nos permitió identificar la histidina (H), la lisina (K), la isoleucina (I) y la metionina (M) en la posición 108 como los aminoácidos con mayor influencia sobre el malplegamiento espontáneo, aunque un posterior ensayo bajo condiciones más restrictivas de tiempo nos permitió cribar entre estos cuatro polimorfismos y señalar la isoleucina como el aminoácido más eficaz para el malplegamiento espontáneo *in vitro* de la rec-PrP murina. Aunque el objetivo principal se cumplió al detectar el aminoácido más idóneo para la generación espontánea, merece la pena analizar la naturaleza del resto de aminoácidos que también indujeron el malplegamiento de la rec-PrP murina, con la idea de discernir si presentan alguna característica común. Dos de estos aminoácidos, histidina y lisina, presentan cadenas laterales cargadas positivamente, lo que podría dar lugar a un aumento de las interacciones electrostáticas entre dichas cargas y las del signo opuesto que aportan tanto las partículas de vidrio como el dextrano sulfatado presentes en el medio. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con la presencia de arginina (R) en la posición 108, aunque

al ser el aminoácido cargado positivamente de mayor tamaño, podría dar lugar a impedimentos estéricos que dificultasen el malplegamiento de la PrP. En el caso contrario, encontramos que ningún aminoácido situado en la posición 108 de la PrP murina que estuviese cargado negativamente indujo la formación espontánea de rec-PrP^{res}. Estos aminoácidos, ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E) en la posición 163, han sido señalados como los responsables de la resistencia natural que presentan los cánidos a la infección por priones, posiblemente debido a una alteración de la distribución de cargas en la superficie de la PrP (Fernandez-Borges et al., 2017c, Vidal et al., 2020). Al haber sido reproducida esta menor susceptibilidad en otras especies como el topillo rojo (Otero et al., 2019), podría resultar razonable no detectar generación espontánea en las rec-PrP murinas que portan alguno de estos dos aminoácidos por alteraciones drásticas en la distribución de cargas superficiales. Los otros dos polimorfismos que dieron lugar a la formación de PrP^{res} *de novo* fueron la isoleucina o la metionina en la posición 108 de la PrP murina, ambos aminoácidos presentes de manera natural en la posición 109 de la PrP del topillo rojo. La formación *in vitro* de PrP^{Sc} utilizando homogeneizados cerebrales de topillo rojo con ambos polimorfismos sin adición de PrP^{Sc} exógena ya fue reportada mediante el uso de PMCA (Cosseddu et al., 2011), coincidiendo con nuestros resultados de PMSA y con los datos recopilados *in vivo* donde se observó una mayor eficiencia debida a la presencia de isoleucina (Watts et al., 2012)

Utilidad de la PMSA para el estudio del fenómeno de cepa e identificación de potenciales variantes conformacionales

A lo largo de los diferentes ensayos de malplegamiento espontáneo realizados con sustrato rec-Ra L108I Dx detectamos diferencias en los perfiles de movilidad electroforética de las rec-PrP^{res} obtenidas. Resultó llamativo el hecho de que no observamos distintos patrones de peso molecular en las rec-PrP^{res} generadas con sustratos que presentaban otros aminoácidos en la posición 108, lo que sugiere que la presencia de isoleucina en dicha posición no solo facilita el malplegamiento espontáneo, sino que también favorece la variabilidad estructural. Identificamos diferentes patrones de peso molecular tras la digestión con proteasa mediante tinción de proteína total en las rec-PrP^{res} de Ra L108I Dx generadas, independientemente de si fueron producidas siguiendo la estrategia de PMSA inicial que utilizaba tubo pequeño (*st*, del inglés, *small tube*) y partículas de vidrio de 0.2-0.3 mm o un mayor volumen (*bt*, del inglés, *big tube*) y partículas de vidrio de menor tamaño, lo que no resultó sorprendente dado que ya se ha reportado la generación de distintos confórmeros en PMCA a pesar de utilizar condiciones idénticas (Wang et al., 2010, Timmes et al., 2013, Zhang et al., 2014). Además de las condiciones variables de PMSA, el hecho de que algunas formas de rec-PrP^{res} se detectaran tras varios pases seriados de PMSA, mientras que otras únicamente necesitaban 24 h, supuso otro factor

diferencial que podría explicar la variabilidad observada en los patrones de peso molecular. Fue en base a estos criterios de diversidad como seleccionamos hasta cuatro confórmeros bioquímicamente diferentes de rec-PrP^{res}, denominados stMI-01 Dx, stMI-03 Dx, btMI-05 Dx y btMI-09 Dx. Al ser observadas mediante tinción de proteína total tras su digestión con PK y electroforesis, todas estas formas presentaron una banda de entre 15 y 16 kDa típica de los priones *bona fide* (denominada como ~16 kDa a lo largo de esta tesis doctoral), similar a la observada en priones recombinantes infecciosos de topillo rojo propagados mediante PMSA (Erana et al., 2019). Dos de ellas, stMI-01 Dx y btMI-09 Dx, presentaron un perfil electroforético indistinguible y fueron seleccionadas por la metodología ligeramente diferente utilizada para su generación y por la ronda en la que aparecieron. Aunque presenten un patrón similar, no descartamos que fuesen distintos confórmeros, ya que algunos autores han reportado la formación de fibras amiloides de rec-PrP^{res} con distintas propiedades originadas a partir de la misma secuencia de PrP, sometida a distintas condiciones de agitación, a pesar de su aparente similitud bioquímica (Makarava and Baskakov, 2008). Por su parte, stMI-03 Dx y btMI-05 Dx diferían en la zona situada entre los 5 y los 9 kDa aproximadamente, presentando cada una de ellas un doble bandeo de distinta intensidad y considerándolo prueba suficiente como para asumir que se trata de dos confórmeros independientes. Estas diferencias en la forma de generación y el perfil electroforético nos condujeron a tratar estas proteínas malplegadas de rec-Ra L108I Dx como cuatro confórmeros bioquímicamente distintos. En la introducción de esta tesis doctoral definimos el concepto de prion *bona fide* para denominar a aquellas PrP recombinantes malplegadas *in vitro* que se comportan como un prion clásico y que son resistentes a proteasas, autopropagativos y capaces de inducir una EET *in vivo*. En este punto, no podíamos afirmar estar ante cuatro priones *bona fide* diferentes, por lo que nos referimos a estas formas malplegadas como confórmeros distintos de rec-PrP^{res}, ya que se han reportado casos de generación de amiloides ricos en láminas β , resistentes a proteasas y capaces de propagarse, pero con baja o nula capacidad infectiva (Makarava et al., 2009). Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que fuesen cepas de priones diferentes con propiedades bioquímicas y biológicas únicas, por lo que las seleccionamos y tratamos de manera independiente.

Con el objetivo de indagar en esas leves diferencias que pueden reflejar los distintos malplegamientos de la PrP, realizamos una caracterización bioquímica de algunas de las propiedades típicamente estudiadas en el campo de los priones. Para ello, utilizamos la polivalente técnica de la PMSA en diferentes condiciones y como sujetos de la caracterización, los cuatro confórmeros de rec-PrP^{res} de Ra-L108I Dx adheridos a partículas de zirconia – sílice (Erana et al., 2020b). Recientemente, este laboratorio ha podido observar que las partículas de este material facilitan el evento de propagación en presencia de una semilla de rec-PrP^{res}, minimizando los eventos de malplegamiento

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

Esta caracterización bioquímica comenzó con el análisis de propiedades que consideramos básicas en un prion y que están relacionadas con su conversión a isoforma malplegada y su resistencia a la digestión por proteasas. Desde que existe una amplia colección de anticuerpos capaces de mapear diferentes epítomos de la PrP (Williamson et al., 1998), se han sucedido investigaciones que han aplicado esta metodología para diferentes propósitos. Algunos de estos estudios trataron de aportar información estructural, identificando regiones de la PrP más accesibles a anticuerpos que otras (Peretz et al., 1997), mientras que otros grupos utilizaron el mapeo epitópico para identificar distintas cepas de priones en función de los fragmentos diferentes obtenidos tras la digestión con proteasas que resultan de conformaciones tridimensionales distintas, obteniendo éxito a la hora de distinguirlas bioquímicamente partiendo directamente de aislados de cabras inoculadas con distintas cepas de scrapie (Jeffrey et al., 2006). Esta metodología también ha sido aplicada a productos obtenidos tras una propagación *in vitro*, como en los intentos por distinguir los diferentes tipos de sCJD mediante la técnica de RT-QuIC. Utilizando aislados cerebrales y líquido cefalorraquídeo de pacientes con sCJD como semilla de la reacción *in vitro*, no fue posible diferenciar los subtipos de la enfermedad tras la amplificación con RT-QuIC, aunque se detectaron ligeras variaciones gracias al mapeo epitópico (Piconi et al., 2019). Pese a que la diferenciación de cepas priónicas mediante RT-QuIC es posible, no es el mejor método para alcanzar este objetivo. A diferencia de la PMCA, donde los priones propagan manteniendo las características de cepa y por tanto pueden rastrearse los patrones de glicosilación de las diferentes cepas por ejemplo; el RT-QuIC, que da lugar a amiloides no infecciosos generalmente, sin propagar de forma fidedigna el prion de origen, únicamente monitoriza la formación de amiloides atendiendo a la fluorescencia emitida por la Tioflavina T (ThT, del inglés *Thioflavine T*), proporcionando muy poca información sobre las características bioquímicas de los potenciales confórmeros distintos (Manca and Kraus, 2020). A pesar de su innegable valor como técnica diagnóstica, las características de los productos resultantes de QuIC, limitan su aplicación para otros usos como el estudio de mecanismos moleculares del malplegamiento, para lo que la PMSA, dada su capacidad de dar lugar a priones infecciosos *in vivo* de forma consistente es idónea (Grovetman et al., 2017, Erana et al., 2019).

Con todo ello en mente, quisimos determinar si había diferencias entre los cuatro confórmeros de rec-Ra L108I Dx que pudieran indicar que son distintas cepas mediante propagaciones en PMSA y un mapeo epitópico de los productos obtenidos *in vitro*. En todos los casos, la banda de ~16 kDa fue

reconocida por todos los anticuerpos que mapean regiones hacia el C-ter a partir del aminoácido 97, mientras el anticuerpo 12B2, el único utilizado con un epítipo hacia el N-ter de dicho residuo, no reconoció el fragmento, indicando que se extiende desde el residuo 97 hacia el C-ter de la proteína. El esquema de los perfiles electroforéticos de la Figura 14 puede ser analizado en mayor profundidad, teniendo en cuenta los epítipos de cada anticuerpo y que los cortes de la PK pueden ser irregulares, por lo que el tamaño de los fragmentos proteolíticos solo puede aproximarse. De esta manera, considerando la secuencia de la PrP murina, el polímero correspondiente a la banda de ~16 kDa observada mediante tinción de Coomassie estaría compuesto por 135 aminoácidos. Este fragmento tendría un peso aproximado de 15,5 kDa, comprendiendo los aminoácidos que van aproximadamente desde la posición 97 a la 231 del C-terminal. La presencia de este fragmento en todas las rec-PrP^{res} obtenidas es el primer indicador de su potencial naturaleza *bona fide*, ya que se corresponde con el núcleo resistente a proteasas característico de los priones clásicos de mamífero (denominado PrP²⁷⁻³⁰), en los que la PK digiere los primeros 90 aminoácidos aproximadamente (Oesch et al., 1985) y fragmentos de tamaño similar caracterizaban el primer prion recombinante murino (Wang et al., 2010). El siguiente fragmento proteolítico, presente de nuevo en los cuatro confórmeros recombinantes de rec-PrP^{res}, tendría un peso molecular de 9 kDa. Al ser detectado únicamente con SAF84 y M20, los anticuerpos más cercanos al C-terminal, este fragmento podría estar compuesto por 75 aminoácidos, situados entre la posición 157 y 231 de la PrP. El último fragmento presente en las cuatro proteínas malplegadas, cuyo peso molecular se acerca a los 2 kDa, solo pudo detectarse de manera nítida con el anticuerpo 9A2 y no con ninguno de los anticuerpos que flanquean dicho epítipo. Este hecho casa a la perfección con nuestra hipótesis de que todas las bandas de bajo peso molecular observadas mediante tinción de proteína total corresponden a fragmentos de no más de 17 aminoácidos, que podrían comprender las posiciones 92 a 109. La banda de ~5 kDa observada mediante tinción de proteína total nos permite distinguir los confórmeros stMI-03 Dx y btMI-05 Dx de los otros dos, aunque no fue posible afinar dicha detección mediante el mapeo epitópico realizado. Nuestra interpretación de los resultados nos lleva a sugerir que este polímero está compuesto de 41 aminoácidos aproximadamente, dando lugar a un fragmento de casi 5 kDa de peso molecular que comprendería las posiciones situadas entre la 191 y la 231 de la PrP. De ser así, dicho fragmento debería ser detectado únicamente por el anticuerpo M20 y no por SAF84 (Figura 14 c), lo cual no ocurre debido a la intensa señal detectada por estos anticuerpos correspondiente al fragmento de 9 kDa, que enmascara completamente cualquier señal cercana a esa región. Un mapeo epitópico más fino, utilizando algún otro anticuerpo que mapee en la región intermedia entre SAF84 y M20 podría ayudar a identificar el peso molecular de este fragmento, visible únicamente en dos de los confórmeros estudiados. Por último, la detección de señal únicamente en el confórmero stMI-03 Dx al aplicar el anticuerpo 12B2 nos llevó a incluir un fragmento adicional, característico de este confórmero y que

nos permite su distinción respecto a los demás. Aunque el anticuerpo 12B2 ha servido típicamente para discernir entre las cepas de scrapie o entre distintos aislados de CWD (Pirisinu et al., 2018), los autores siempre atendían a la presencia de fragmentos de 19 o 21 kDa. En nuestro caso, la distinción se realiza a través de la observación de un fragmento único de bajo peso molecular, detectado claramente en stMI-03 Dx con el uso del anticuerpo 12B2 y de manera parcial con 9A2, ya que en el carril correspondiente a este confórmero se puede observar un marcaje inespecífico en la región inmediatamente superior a la banda de 2 kDa (Figura 14 b). Teniendo en cuenta que dicho fragmento no es observable con el anticuerpo 7D9, consideramos que este polímero podría componerse de 28 aminoácidos aproximadamente, presentando en torno a 3 kDa de peso molecular y abarcando las posiciones 29 y 109 de la PrP. Aunque el objetivo de este ensayo no fue la identificación precisa de cada uno de los fragmentos sino diferenciar potenciales confórmeros, investigaciones adicionales en este punto utilizando distintos anticuerpos o valiéndonos de técnicas de espectroscopia de masas podrían resultar de interés para la caracterización estructural de las rec-PrP^{res} generadas (Sevillano et al., 2018). La reciente publicación por parte de Caughey y colaboradores de la estructura tridimensional de un prion infeccioso de mamífero a nivel atómico (Kraus et al., 2021), nos permitió comparar los sitios de corte de la PK detectados en los confórmeros rec-Ra L108I Dx con los correspondientes motivos estructurales revelados recientemente, con el objetivo de discernir si nuestras rec-PrP^{res} podrían acomodarse a una estructura como la propuesta en esta novedosa publicación (Figura 46). El trabajo de este grupo reveló la presencia de hasta once regiones de láminas β distribuidas por cada monómero de PrP^{Sc} entre los aminoácidos 95 y 227, adoptando los agregados una conformación paralela en registro (PIRIBS). La presencia de algunos dominios aparentemente críticos para la integridad estructural de esta isoforma, como el motivo hidrofóbico de “llave griega” situado en los residuos 112-134 o la región 160-170 quedan internalizados, lo que impediría el corte de la PK. Así, en este tipo de estudios de proteólisis limitada, se atribuyen a la PK unos puntos de corte que corresponderían a regiones más flexibles como giros (en inglés, *loops*) o zonas más expuestas al medio y que teóricamente podrían presentar un menor impedimento estérico (Bessen and Marsh, 1992a, Sevillano et al., 2018). Basándonos en esta primera estructura de un prion de mamífero a resolución atómica, los cortes realizados por la PK en nuestros confórmeros recombinantes se situarían en la región previa a la lámina β 1 (fragmento de 16 kDa), entre las láminas β 4 y β 5 (fragmento de 9 kDa) o dejando completamente intacta la lámina β 1 con cortes que flanquean dicha región para generar los fragmentos de 3 o 2 kDa en función de cuánto avance la PK por el extremo N-ter de la PrP. aminoácido 83 o 93 y 103, manteniendo intacta la lámina β 1 y originando los fragmentos de 3 y 2 kDa respectivamente. Por último, el fragmento de \sim 5 kDa podría ser fruto del corte de la PK en el giro externo situado entre las láminas β 9 y β 10, estimando la posición en torno al aminoácido 189 y originando un péptido de 43 aminoácidos (Kraus et al., 2021). Aunque esto únicamente es una

interpretación somera de los resultados obtenidos que podrían indicar que las rec-PrP^{res} se ajustarían a una estructura similar a la publicada, sí podemos afirmar sin lugar a dudas, que el mapeo epitópico de los fragmentos al utilizar el anticuerpo 12B2 en stMI-03 Dx, señala que este confórmero presenta diferencias estructurales que alteran el lugar de corte realizado por la PK durante la digestión, pudiendo ser utilizado para distinguirlo con facilidad de las demás semillas recombinantes murinas. La ausencia de este tipo de fragmentos de bajo peso molecular en anteriores publicaciones que describen la formación espontánea de priones recombinantes murinos, en los que sólo se describía la banda superior de ~16 kDa podría deberse a la obtención de confórmeros diferentes que sólo muestren un punto de corte (Wang et al., 2010), aunque parece poco probable, dado que estudios de proteólisis limitada sobre priones de mamífero muestran múltiples bandas equiparables a las de otros priones recombinantes (Sevillano et al., 2018). Por ello, es más probable que se deba a la falta de estudios con grandes cantidades de proteína malplegada, una ventaja adicional de la escalabilidad de la PMSA o a la utilización de concentraciones bajas de PK durante la digestión, que sólo podría revelar el fragmento mayoritario.

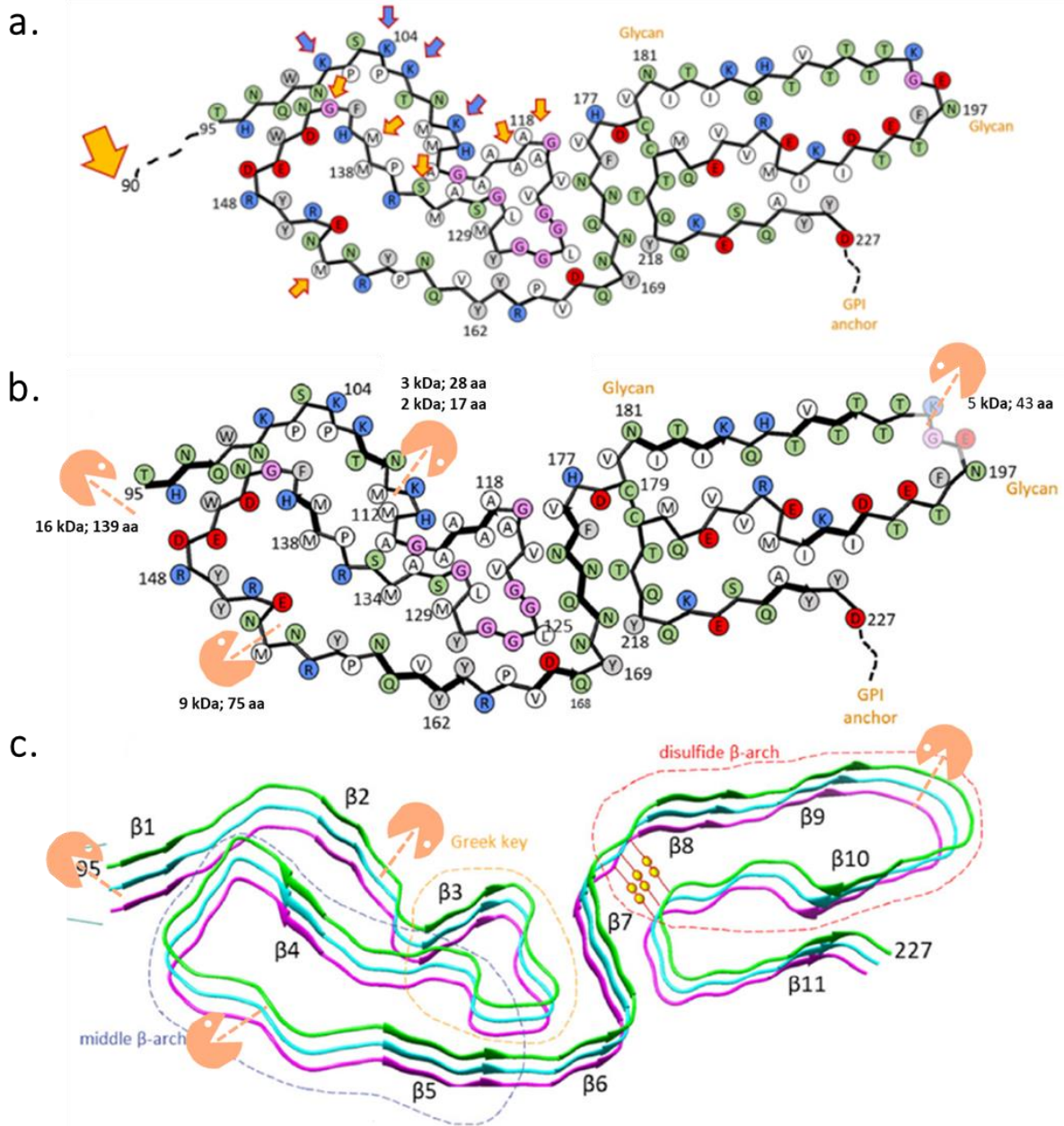


Figura 46. Representación de los agregados de PrP^{Sc} de hámster sirio en conformación paralela en registro (PIRIBS) basada en su estructura tridimensional resuelta por criomicroscopía electrónica. a) Se señalan los puntos de corte principal por parte de la PK (flecha amarilla grande) en la PrP^{Sc} y posibles sitios de corte secundarios (flechas amarillas pequeñas) según el modelo de (Kraus et al., 2021). Las flechas azules marcan las lisinas de la zona cargada (CC, del inglés *Charged cluster*) en la PrP^{Sc}. **b)** Adaptación de la figura de (Kraus et al., 2021) en la que se muestra el núcleo de PrP^{res} que permanecería intacto tras el corte con PK en el que se eliminan los residuos 90-95 del extremo amino terminal flexible. En esta adaptación se señalan además los posibles puntos de corte adicionales que explicarían los fragmentos mayoritarios identificados mediante mapeo epitópico de las cepas rec-Ra L108I Dx. En los cuatro lugares de corte de PK representados (símbolo naranja) aparece el peso molecular aproximado del fragmento proteolítico y los aminoácidos por los que estaría compuesto, siendo factible que las rec-PrP^{res} obtenidas a lo largo del trabajo puedan acomodarse a este modelo estructural de PrP^{Sc}. **c)** Ilustración que representa las estructuras secundarias de tres monómeros de PrP^{Sc} (compuestos por 11 láminas β y diversos lazos flexibles que las conectan) que formarían parte de una fibra. Se señalan los mismos puntos de corte que en el panel superior, observándose que los puntos de corte teóricos derivados del mapeo epitópico se encuentran en lazos, zonas potencialmente accesibles para la PK. Adaptado de (Kraus et al., 2021).

Una de las primeras propiedades atribuidas a los priones, antes incluso de identificar su origen proteico, fue su inusitada resistencia al tratamiento con proteasas (Hunter and Millson, 1967). Cuando la hipótesis de solo proteína fue enunciada en 1982 (Prusiner, 1982), esta característica fue investigada en mayor profundidad y se empezó a utilizar la resistencia relativa a proteasas para diferenciar entre cepas priónicas (Bessen and Marsh, 1992a). Con el mismo objetivo, realizamos un ensayo de resistencia a PK sometiendo a los cuatro confórmeros rec-Ra L108I Dx a concentraciones crecientes de PK, observando como tres de ellos eran capaces de mantener su perfil de movilidad electroforética tras ser digeridos con hasta 1000 µg/ml de PK. La proteína malplegada stMI-03 Dx resistió hasta 500 µg/ml de PK, no pudiendo observar rec-PrP^{res} con mayores concentraciones de PK. En cualquier caso, las 4 semillas analizadas mostraron resistencia ante concentraciones elevadas de PK, muy superiores a las de determinadas proteínas recombinantes malplegadas *in vitro*, cuyas reducidas resistencias a proteasas sembraban dudas acerca de su naturaleza priónica (Gauczynski et al., 2002, Makarava et al., 2010), o incluso que la del primer prion recombinante *bona fide* generado por PMCA (Wang et al., 2010). No obstante, dado que una mayor resistencia a PK no es necesariamente indicativa de un malplegamiento más cercano al de los priones causantes de EET, tal y como ilustra el caso de la Prionopatía con Sensibilidad Variable a Proteasas (VPSPr) (Gambetti et al., 2008, Zou et al., 2010), el hecho de que entre las rec-PrP^{res} analizadas se observen diferencias, respalda únicamente la existencia de diferencias conformacionales entre la stMI-03 Dx y el resto. Aunque el estudio con PK nos permitió sumar otra evidencia de la presencia de confórmeros con distintas propiedades bioquímicas entre las cuatro semillas, otros ensayos no mostraron diferencias tan significativas. Este fue el caso de la propagación de los cuatro confórmeros rec-Ra L108I Dx en dos condiciones restrictivas de PMSA: una disminución de la temperatura de propagación y la dilución seriada de las semillas. Aunque los resultados no fueron claramente discriminatorios, pudimos observar una tendencia por parte de los confórmeros stMI-03 Dx y btMI-05 Dx a malplegar la rec-PrP a temperaturas más bajas que stMI-01 Dx y btMI-09 Dx, que se comportaron de nuevo de forma idéntica y no fueron capaces de propagar a temperaturas inferiores a 24 °C. La presencia de diferencias en esta característica, podría ser indicativo de una mayor o menor habilidad para ser propagadas con posterioridad en modelos *in vivo*, ya que podría sugerir una mayor eficiencia de propagación en condiciones desfavorables. Sin embargo, desconocemos el significado biológico que podría implicar esta capacidad para propagar a una menor temperatura por lo que, solo utilizamos estas condiciones restrictivas como método discriminatorio entre posibles confórmeros diferentes, sin realizar asunciones sobre cómo podrían traducirse estas características distintivas *in vivo*. Llegamos a una conclusión similar tras realizar una propagación mediante dilución seriada de las cuatro semillas rec-Ra L108I y someterlas posteriormente a una única ronda de PMSA. En esta ocasión observamos que los cuatro confórmeros pudieron inducir el malplegamiento de la rec-PrP del sustrato en diluciones de hasta 10⁻⁸, siendo stMI-03 Dx y btMI-09 Dx

las únicas que pudieron diluirse hasta 10^{-9} y 10^{-10} respectivamente, sugiriendo una mayor capacidad de malplegar la rec-PrP en las condiciones utilizadas. Aunque una mayor capacidad de propagación *in vitro* podría traducirse en una mayor eficacia a la hora de inducir una enfermedad priónica en modelos *in vivo*, las diferencias detectadas fueron muy leves y podrían deberse a la variabilidad intrínseca del sistema. Por ello, viendo que además no había correlación con los resultados observados bajo condiciones restrictivas de temperatura, la capacidad de propagación a diluciones elevadas sólo se consideró indicativo de potenciales diferencias entre las semillas.

Los ensayos de propagación *in vitro* utilizando sustratos no homólogos a las semillas recombinantes de origen resultaron un mejor filtro para la observación de diferencias. Así, en una simulación de las barreras de transmisión que podrían observarse *in vivo*, utilizamos sustratos con diferentes rec-PrP o con ausencia de cofactor para evaluar el efecto sobre la propagación en sustratos no homólogos. La presencia de isoleucina en la posición 108 de la PrP murina es artificial y busca mimetizar el polimorfismo del topillo rojo que parece favorecer su capacidad de malplegamiento (Watts et al., 2014), por lo que decidimos testar la efectividad de los cuatro confórmeros rec-Ra L108I Dx en sustratos que contenían las dos variantes mayoritarias que encontramos en la naturaleza para la PrP murina; los denominados genotipo *a* (L108 T189) y genotipo *b*, (F108 V189), que influyen en la susceptibilidad a determinadas EET (Carlson et al., 1988). Mientras que ninguna de las semillas pudo propagar a expensas de rec-PrP F108 V189 tras una ronda de PMSA, tres de ellas sí lo hicieron ante un sustrato con rec-PrP murina L108 T189. El confórmero stMI-03 Dx fue el único incapaz de dar lugar a rec-PrP^{res} a partir de este sustrato en 24 h, aunque no puede descartarse que pudiese finalmente superar esta barrera polimórfica mediante rondas adicionales de PMSA. En cualquier caso, la capacidad diferencial de algunas de las semillas para inducir el malplegamiento de rec-PrP no homólogas en las condiciones del ensayo supuso una evidencia adicional de diferencias conformacionales, dado que la capacidad de superar determinadas barreras polimórficas o interespecíficas es una característica intrínseca de cepa que parece depender de la interacción entre la estructura de la semilla y la capacidad de la PrP no homóloga para adaptarse a la misma (Jones and Surewicz, 2005). Además, tal y como se ha reportado tanto *in vivo* como *in vitro*, la transmisión interespecífica de priones es una fuente de diversidad de cepa (Morales et al., 2007), ya que mediante potenciales fenómenos de adaptación o selección que se discutirán más adelante, pueden dar lugar a nuevos confórmeros con características diferentes de la semilla de origen. De acuerdo con esta observación, los productos de PMSA resultantes de la propagación de las semillas en sustratos no homólogos mostraron una alteración en su patrón de movilidad electroforética tras la digestión con proteasa (Figura 14 a y Figura 17). Lamentablemente, los productos resultantes mostraron patrones indistinguibles entre sí, lo que no permitió confirmar si las diferencias sugeridas por las pruebas

bioquímicas previas podrían haberse transmitido a través de la barrera o si las posibles diferencias se habían reducido al converger todas hacia una misma conformación por efecto de la rec-PrP no homóloga del sustrato. Aunque en el caso de la PMCA, se ha demostrado una gran fidelidad en la reproducción de las características de cepa y las barreras de transmisión (Castilla et al., 2008, Green et al., 2008, Fernandez-Borges et al., 2009), aún no hay evidencias de ello para la PMSA, por lo que a pesar de que resulta un ensayo útil para determinar diferencias entre semillas o incluso para obtener priones recombinantes para aquellas PrP que no puedan malplegar espontáneamente *in vitro*, su utilidad para evaluar la potencial transmisibilidad interespecies es aún limitada y requiere de bioensayos para su validación (Erana et al., 2019). En cuanto al uso de sustratos homólogos en secuencia a las semillas de experimentación, pero con ausencia de cofactor, los resultados también revelaron la utilidad de esta estrategia para diferenciar entre confórmeros. El efecto de los cofactores en la propagación priónica ha sido ampliamente estudiado, incluso ha sido aprovechado para diferenciar entre cepas *in vitro* mediante PMCA (Deleault et al., 2010). Sin embargo, el significado biológico que supone la presencia o ausencia de cofactores y su relación con las propiedades que adquieren los priones sigue siendo un tema de controversia en el campo de la investigación priónica. Debido a esta complejidad, en un principio decidimos utilizar los resultados de la propagación en ausencia de dextrano únicamente como método discriminatorio entre confórmeros. No obstante, observamos una alteración muy particular en el patrón de movilidad electroforética del producto inoculado con stMI-03 Dx, por lo que tras comprobar la naturaleza *bona fide* de los priones recombinantes generados espontáneamente, decidimos indagar en cómo afecta el cofactor a las propiedades de estos confórmeros. Así, a pesar de no ser el objetivo de este ensayo, esta circunstancia supuso una oportunidad para profundizar en la influencia de los cofactores en las características de cepa, que se discutirán más adelante.

Confirmación de la obtención de cuatro cepas de priones recombinantes mediante bioensayo y de su potencial para el estudio de este fenómeno

La caracterización bioquímica de los cuatro confórmeros espontáneos rec-Ra L108I Dx nos permitió acumular suficientes evidencias (Tabla 9) como para considerarlos distintas cepas priónicas con potenciales características biológicas diferenciales. Sin embargo, en ese punto de la tesis doctoral, no podíamos afirmar que cumplieran las características de un prion *bona fide*, puesto que desconocíamos el comportamiento de estos confórmeros recombinantes en modelos *in vivo*. Tal y como se ha mencionado previamente, la generación de priones sintéticos *in vitro* ha llevado a la obtención de proteínas malplegadas que no mostraban todas las características de los priones *bona fide*, siendo la variable infectividad *in vivo* uno de los mayores escollos (Legname et al., 2004, Deleault et al., 2007, Makarava et al., 2010). Aunque esto pudo solucionarse a través de la formación de un prion recombinante murino mediante PMCA, que inducía una EET en ratones silvestres con periodos de incubación similares a los priones de mamífero (Wang et al., 2010), la dificultad de reproducir este hecho (Timmes et al., 2013) hace que los métodos para la obtención de priones recombinantes *bona fide* de forma consistente siga siendo uno de los hitos a alcanzar en el campo de los priones. Así, en un intento de resolver los problemas asociados a la complejidad y variabilidad de la PMCA como técnica para alcanzar este objetivo (Piening et al., 2005), se desarrolló la técnica de PMSA en nuestro laboratorio. Utilizando esta aproximación con la PrP recombinante de topillo rojo, conseguimos la generación espontánea y consistente de priones recombinantes *bona fide*, es decir, resistentes a proteasa, autopropagativas y capaces de inducir una EET en modelos animales sin sobreexpresión de PrP^C (resultados aún por publicar).

Tabla 9. Resumen de las propiedades bioquímicas de las distintas rec-PrP^{res} murinas L108I generadas espontáneamente mediante PMSA.

Cepa	Origen PMSA	Fragmentos PrP ^{res} (kDa)	[Resistencia a PK]	Reactividad en N-ter (12B2)	Dilución máx.	Tª min. de propagación	PrP ^{res} 16 kDa sin cofactor	Propagación en genotipo a	Propagación en genotipo b
stMI-01 Dx	Condiciones 1	16, 9, 2	1.000 µg/ml	No	10 ⁻⁸	< 24°C	No	Sí	No
stMI-03 Dx	Condiciones 1	16, 9, 6, 3, 2	500 µg/ml	Sí	10 ⁻⁹	< 23°C	Sí	No	No
btMI-05 Dx	Condiciones 2	16, 9, 6, 2	1.000 µg/ml	No	10 ⁻⁸	< 22°C	No	Sí	No
btMI-09 Dx	Condiciones 2	16, 9, 2	1.000 µg/ml	No	10 ⁻¹⁰	< 24°C	No	Sí	No

Por tanto, aun habiendo obtenido los confórmeros de PrP^{res} murina con el mismo método y a pesar de que la caracterización bioquímica indica que se trata de confórmeros diferentes, evaluar la infectividad de estas semillas *in vivo* es imprescindible para corroborar que sean priones *bona fide* y también para determinar definitivamente si son cepas diferentes. Antes de iniciar un bioensayo con el coste material y ético que supone la inoculación de varios grupos de animales de experimentación, se evaluó la capacidad de estos cuatro confórmeros para malplegar *in vitro* la PrP^C procedente de un homogeneizado cerebral mediante PMCA. Esta aproximación nos permite anticiparnos a los resultados que podríamos observar *in vivo*, al ser un modelo más cercano a la realidad debido a que la PrP el sustrato mantiene las modificaciones post-traduccionales y contiene todos los cofactores presentes en el cerebro. La correlación positiva entre los resultados de propagación *in vitro* en PMCA basada en homogeneizado de encéfalo y los posteriores estudios *in vivo* ya ha sido previamente reportada para varias proteínas malplegadas recombinantes (Fernandez-Borges et al., 2017a, Erana et al., 2019), por lo que consideramos que es un ensayo con un gran valor predictivo. De acuerdo con el ensayo de propagación *in vitro*, los cuatro confórmeros indujeron una EET en los animales de experimentación y, además, detectamos diferencias importantes en la tasa de ataque y el periodo de incubación de algunos de ellos, lo que indicaba que podrían tratarse de cuatro cepas diferentes. Los periodos de incubación de todas ellas fueron superiores a los obtenidos en este modelo ante una cepa clásica como RML, donde la tasa de ataque del 100% se alcanzó en 93 ± 5 días post inoculación (dpi) \pm SEM (Venegas, 2018), lo que puede deberse a la barrera existente entre PrP recombinante y PrP^C de encéfalo, a diferencias de título de los inóculos (Prusiner et al., 1982) o bien a que los cuatro confórmeros generados son cepas diferentes en sus propiedades a RLM. Destacó el caso de la cepa stMI-01 Dx, la única que no causó una enfermedad priónica en todos los animales de experimentación. Asumiendo títulos similares, dada la equiparable intensidad de señal para los inóculos digeridos y visualizados mediante tinción de proteína total, este resultado nos permitió distinguirla de la cepa btMI-09 Dx, idéntica bioquímicamente a ella en casi todos los aspectos analizados previamente *in vitro*, pero con una tasa de ataque completa y un periodo de incubación mucho más corto *in vivo*, demostrando así la necesidad de bioensayos que confirmen las distintas propiedades biológicas de cada cepa. A pesar de que los distintos tiempos de incubación podrían estar sujetos a diferencias de título, gracias a los estudios anatomopatológicos realizados de manera preliminar, concluimos que efectivamente, incluso las cepas que mostraban tiempos muy similares de incubación podían diferenciarse, ya que los animales inoculados con btMI-09 Dx presentaron depósitos claros de PrP^{Sc}, pero no espongiosis, mientras que la cepa btMI-05 Dx causó ambas lesiones. La presencia de espongiosis en ratones de experimentación puede estar asociada a la edad (espongiosis senil), independientemente de si el animal ha recibido o no PrP exógena y viéndose incrementada si se trata de un modelo sobreexpresor de PrP (Westaway et al., 1994), como es el caso de TgMoL108I. No obstante, que a tiempos de

supervivencia similares los animales inoculados con la semilla btMI-09 Dx no presentasen lesiones espongióticas indica que las observadas en los animales inoculados con btMI-05 Dx no se deben a la edad de los animales y que, por consiguiente, la presencia o ausencia de espongiosis podría ser una característica diferencial entre ambas cepas. Además, el estudio anatomopatológico preliminar nos permitió detectar colocalización de las lesiones espongióticas y los depósitos de PrP^{Sc} en áreas muy concretas de los cerebros de ratones inoculados con la cepa btMI-05 Dx, como por ejemplo en la sustancia blanca de los núcleos basales (Figura 21 a). Este tipo de tropismo por determinadas áreas es muy interesante a nivel anatomopatológico y pueden ayudar a diferenciar entre distintas cepas de priones, aunque para ello es necesario la elaboración de perfiles lesionales más completos que permitan valorar la distinta afectación de las principales áreas cerebrales de estudio. De la misma manera, sería interesante comprobar si dicho tropismo se reproduce al ser inoculado en otros modelos de experimentación similares o si se mantiene tras un segundo pase, en el que deberían verse estabilizadas las principales características de cada cepa.

Fue precisamente la necesidad de confirmar los diferentes comportamientos observados en las cuatro cepas al ser inoculadas en TgMoL108I, lo que nos condujo a la realización de un segundo pase *in vivo* utilizando en esta ocasión ratones silvestres C57BL/6. Esta estrategia es muy común en el campo de la investigación priónica, sobre todo al tratar con priones recombinantes, ya que confirma la infectividad de la cepa inoculada, estabiliza el periodo de incubación, reduce las posibles diferencias de títulos infectivos y ayuda a establecer las propiedades características de cepa (Legname et al., 2005). Por otra parte, la elección de ratones C57BL/6 como modelo de experimentación para el segundo pase de este ensayo respondía a un doble objetivo: confirmar que las diferencias observadas en el primer pase se mantenían tras su estabilización con respecto a la propagación *in vivo*, y determinar si estos priones propagados a partir de semillas recombinantes eran capaces de producir una prionopatía en un modelo de genotipo silvestre y no sobreexpresor. A pesar de que en términos de estabilización habría sido preferible realizar el segundo pase en el mismo modelo, la experiencia de este laboratorio con los TgMoL108I lo desaconsejaba, ya que debido a su elevada expresión de PrP^C, estos animales desarrollan una enfermedad priónica esporádica atípica aproximadamente a partir de los 350 días de edad (resultados no publicados). Así, el riesgo de acelerar la enfermedad espontánea en un segundo pase (Watts et al., 2012) mediante la administración de un inóculo contaminado podría enmascarar por completo las características propias de las semillas de interés. Por ello, dado que los ratones C57BL/6 no son susceptibles a la enfermedad espontánea de los TgMoL108I (resultados no publicados) y un segundo pase en este modelo era suficiente para nuestro objetivo de confirmar diferencias entre las cuatro semillas recombinantes, optamos por esta alternativa. A pesar de que este bioensayo aún se encuentra en curso, dos de los inóculos ya han mostrado la capacidad de inducir una EET en todos

los animales inoculados. Uno de ellos fue el derivado del inóculo btMI-09 Dx que ya había demostrado ser el más rápido en el primer pase. Sin embargo, sorprendentemente fue la cepa derivada de stMI-03 Dx tras su adaptación a TgMol108I la que causó la enfermedad en un menor tiempo en el segundo pase. Su rápido periodo de incubación en el modelo silvestre, 131.9 ± 4.04 dpi frente a los 206.8 ± 11.18 dpi en el modelo sobreexpresor, es un claro ejemplo de la necesidad de realizar segundos pases *in vivo* que permitan equiparar títulos para estabilizar los periodos de incubación y ayuden a identificar las características biológicas de cada cepa (Beck et al., 2013). En cualquier caso y, aunque el bioensayo no está completo, este segundo pase también ha confirmado la menor infectividad del inóculo stMI-01 Dx observada en el primer pase, ya que ningún animal ha desarrollado signos clínicos tras más de 280 dpi. A falta de estudios anatomopatológicos que confirmen las diferencias entre cepas, la obtención de tasas de ataque y periodos de incubación tan dispares es suficiente prueba de que los cuatro confórmeros generados espontáneamente son cepas priónicas distintas.

El hecho de demostrar infectividad de las semillas recombinantes en un primer pase utilizando un modelo sobreexpresor y que además desarrolla una enfermedad espontánea a edades muy avanzadas, podría ser objeto de críticas, al considerarse que las semillas podrían estar acelerando la enfermedad preexistente en lugar de inducir una EET *de novo*, tal y como ha sucedido con otras preparaciones de potenciales priones recombinantes *in vitro* (Makarava et al., 2010). De hecho, una de las características que distinguían el considerado como primer prion recombinante *bona fide* (Wang et al., 2010) de preparaciones anteriores, era su capacidad de causar una EET en animales silvestres con tiempos de incubación similares a los reportados para priones de mamífero. Las cepas rec-Ra L108I Dx, generadas espontáneamente mediante PMSA, podrían suponer el segundo ejemplo reportado hasta la fecha de priones sintéticos obtenidos *de novo* y capaces de inducir una EET en modelo silvestre con periodos de incubación similares a los priones de mamífero. Ante estas evidencias, decidimos realizar un tercer bioensayo con las cepas rec-Ra L108I Dx, inoculadas directamente en ratones C57BL/6. Con el bioensayo aún en desarrollo, los resultados preliminares obtenidos para el inóculo btMI-09 Dx nos confirman que al menos uno de los confórmeros obtenidos espontáneamente por PMSA es capaz de infectar un modelo murino silvestre. Este dato resulta de enorme relevancia para futuros bioensayos, ya que confirma que el modelo silvestre C57BL/6 es apto para estudiar las nuevas cepas recombinantes murinas producidas mediante PMSA, lo que incrementa su interés al ser infecciosos en el modelo más extendido para el estudio de las prionopatías y demuestra fehacientemente que son priones *bona fide*.

La variedad de cepas obtenida al utilizar proteína rec-Ra L108I Dx era un resultado deseable, dado que provee de modelos con gran potencial para ahondar en el estudio de los mecanismos moleculares que determinan las características de cepa. Sin embargo, no es un hecho completamente inesperado ya que la capacidad de una única secuencia de PrP de dar lugar a múltiples confórmeros incluso en

condiciones aparentemente iguales, tanto *in vivo* (Rossi et al., 2019) como *in vitro* es de sobra conocida, aunque parece infrecuente en este último caso (Wang et al., 2010, Timmes et al., 2013). Esta heterogeneidad en la generación espontánea de proteínas malplegadas *in vitro* también ha sido previamente detectada por este grupo de investigación al utilizar proteína recombinante de topillo rojo (resultados pendientes de publicación). Como los mecanismos moleculares que determinan la formación de un confórmero u otro a partir de una misma PrP siguen siendo desconocidos, más allá de un potencial papel de determinados cofactores polianiónicos que parecen promover la formación de distintos confórmeros (Wang et al., 2010, Deleault et al., 2012b, Zhang et al., 2014, Fernandez-Borges et al., 2017a), en este punto únicamente podemos especular sobre las razones que han resultado en tal variedad de cepas. Los resultados previos con la PrP recombinante de topillo rojo, junto con los resultados mostrados en esta tesis respecto a los priones recombinantes obtenidos con la PrP murina silvestre entre las que no se detectaron diferencias bioquímicas, sugieren la posibilidad de que la presencia de isoleucina en la posición 108 (o 109 en el caso del topillo rojo) favorezca la variabilidad obtenida en el malplegamiento. Al utilizar en todos los casos el dextrano sulfatado como cofactor polianiónico, *a priori* podríamos descartar su influencia en la formación de distintos confórmeros, ya que de acuerdo con otros estudios los cofactores parecen dirigir el malplegamiento a determinadas conformaciones restringiendo la variabilidad (Fernandez-Borges et al., 2017a). No obstante, es muy probable que determinados cofactores puedan favorecer más de una conformación, tal y como se ha demostrado para la combinación ARN y POPG (Wang et al., 2010, Zhang et al., 2014), siendo el dextrano sulfatado otro ejemplo. Sin embargo, la variedad de malplegamientos puede deberse simplemente a la estocasticidad, algo que también se observaba en la PMCA (Fernandez-Borges et al., 2017b). Los procesos estocásticos aluden a magnitudes aleatorias que varían con el tiempo o que caracterizan una sucesión de variables aleatorias que evolucionan en función de otra variable externa. Este concepto matemático se opone radicalmente a la creencia de que cualquier evento de generación/selección es un proceso determinista, debate que existe sobre las formas de organización biológica desde antes de que se conociese la naturaleza del agente priónico (Eigen, 1971). Trasladando esto a la investigación priónica, varios estudios teóricos sobre la dinámica de formación y propagación de priones respaldan la idea de que eventos estocásticos durante la polimerización o fibrilización puedan ser la causa de la variabilidad de cepa, debidos a una heterogeneidad de nucleación (Alvarez-Martinez et al., 2011, Xue et al., 2008). Independientemente de los mecanismos moleculares que han llevado a la obtención de cuatro cepas distintas a partir de un mismo procedimiento, algunas observaciones realizadas durante la caracterización bioquímica y biológica de las semillas resultan de gran interés para el estudio del fenómeno de cepa. Pese a que todas ellas son propagables de manera estable mediante pases seriados en sustrato homólogo conservando sus propiedades, algunas alteraciones del perfil de movilidad electroforética ocurridos tras la propagación

en sustratos no homólogos (distinta secuencia de rec-PrP o ausencia de cofactor) apuntan a la ocurrencia de fenómenos de selección, que podrían ser consecuencia de la adaptación de ciertos conformeros que se encuentran en proporción minoritaria dentro de la nube de cuasi-especies que componen la muestra priónica, tal y como defienden algunos autores (Collinge and Clarke, 2007). Los cambios en las propiedades bioquímicas y biológicas de las cepas priónicas quedaron en evidencia ya con los estudios iniciales de transmisión interespecífica, cuando se observó que la inoculación de un mismo aislado de scrapie en cabras con genotipos diferentes daba lugar a dos fenotipos claramente distinguibles de enfermedad (Pattison and Millson, 1961b, Pattison and Millson, 1961a). En ese momento, se achacaron las diferencias a los distintos genotipos de los huéspedes, sugiriendo un fenómeno de adaptación ante la propagación a expensas de una PrP no homóloga a la PrP^{Sc}. Posteriormente, se observó este fenómeno de cambio de propiedades biológicas al inocular un mismo aislado de priones de visón en hámsteres, que en este caso tenían un mismo genotipo, por lo que se planteó la posibilidad de que el aislado original contuviera una mezcla de cepas que eran seleccionadas en el nuevo hospedador (Bessen and Marsh, 1992b). Así, a medida que se demostraba que las características de cepa se relacionaban con diferencias estructurales de la PrP^{Sc}, y que una determinada secuencia de PrP^C podía adoptar un espectro, probablemente limitado de conformaciones distintas de PrP^{Sc}, el debate en torno a los mecanismos moleculares que subyacen al fenómeno de cepas y los cambios observados ante barreras de transmisión se trasladó a si éstas estaban constituidas por un único clon molecular de PrP^{Sc} (un único conformero) cuya estructura muta o se adapta en respuesta al nuevo entorno de propagación; o si en cambio, las cepas podían estar compuestas por una multitud de conformeros de PrP^{Sc} distintas que explicaría los cambios en términos de selección de los conformeros más aptos para la propagación en el nuevo entorno (Collinge and Clarke, 2007). Aunque estas dos posibilidades no son mutuamente excluyentes, en el sentido en el que podrían darse tanto eventos de mutación como de selección, las evidencias disponibles apuntan a que la teoría de que las cepas están realmente constituidas por una variedad de conformeros denominados cuasi-especies o sub-cepas es más plausible, en la que tanto cambios en la PrP del sustrato como en otros componentes presentes en el entorno de propagación (como cofactores o inhibidores) podrían inducir un desplazamiento de las sub-cepas propagadas más eficientemente en las nuevas condiciones que se reflejaría en un cambio de fenotipo (Weissmann et al., 2011). Los resultados de generación espontánea descritos a lo largo de esta tesis doctoral para la PrP recombinante de ratón L108I y los cambios observados tras su propagación en distintos entornos suponen una oportunidad sin precedentes para ahondar en el estudio de las denominadas mutaciones de cepa y para abordar si las cepas generadas contienen un único conformero o son mezclas heterogéneas de conformeros. Al trabajar con un solo cofactor resulta un sistema sencillo en el que procesos de selección clonal o cambios de entorno de propagación resultan fáciles de implementar y estudiar, como reflejan las

pruebas de propagación en presencia y ausencia de dextrano sulfatado que se discutirán más adelante. Junto con la exhaustiva caracterización de las cepas obtenidas, la PMSA abre la puerta a estudios críticos para determinar los factores con mayor influencia en la formación de distintas cepas y su evolución, permitiendo como en este caso, estudiar el rol del dextrano sulfatado como cofactor, o el de la presencia de isoleucina en la posición 108 de la PrP, en la formación de variabilidad conformacional.

Malplegamiento espontáneo de la PrP recombinante murina silvestre y efecto de la isoleucina sobre la tendencia al malplegamiento y la variabilidad conformacional

Hasta la fecha, la PMSA se había utilizado únicamente con PrP recombinante de topillo rojo con isoleucina en la posición 109, tanto para la propagación (Erana et al., 2019, Erana et al., 2020b) como el malplegamiento espontáneo (resultados pendientes de publicación). Por lo que el hallazgo de que esta sustitución en la posición correspondiente de la PrP de ratón fuera la que promovía en mayor medida la formación espontánea de priones recombinantes no fue inesperada. No obstante, la posibilidad de que otros aminoácidos en esa misma posición también permitiesen la formación de rec-PrP^{res}, junto con la capacidad de las rec-Ra L108I Dx generadas previamente para inducir el malplegamiento de la PrP murina silvestre tanto *in vitro* como *in vivo*, nos llevó a plantear la obtención de priones recombinantes de forma espontánea utilizando directamente PrP murina silvestre. Teniendo en cuenta que fue un cambio en las condiciones de la PMSA, lo que hizo mejorar sustancialmente el proceso de generación espontánea (Figura 9), decidimos indagar en ese aspecto y optimizar el procedimiento, centrándonos en esta ocasión en la cantidad de PrP recombinante inicial presente en el sustrato de experimentación. De la misma manera que los numerosos modelos transgénicos que sobreexpresan PrP descritos acaban por sufrir una EET de manera espontánea simplemente a causa de la cantidad aumentada de PrP que presentan (Brandner and Jaunmuktane, 2017), el malplegamiento espontáneo en PMSA también podría verse favorecida por concentraciones elevadas de rec-PrP en el sustrato. La obtención *in vitro* de priones recombinantes homólogos en secuencia a la PrP que presentan los ratones silvestres supondrían modelos de mayor valor para el estudio del malplegamiento espontáneo, ya que es la PrP silvestre la que se cree que malpliega espontáneamente dando lugar a una EET esporádica, y también para posteriores estudios biológicos, al permitir su inoculación directamente en animales silvestres en lugar de modelos sobreexpresadores u otros transgénicos. De acuerdo con lo esperado, la modificación en la concentración de rec-PrP inicial, permitió generar espontáneamente rec-PrP^{res} murina silvestre tras una única ronda de PMSA en algunos casos, demostrando menor eficiencia que la variante con isoleucina a pesar del incremento

de concentración. Sorprendentemente, a diferencia de los priones recombinantes que presentaban el polimorfismo del topillo rojo, en los múltiples experimentos y réplicas que llevaron a la obtención de los priones murinos silvestres rec-Ra L108 Dx (ML, del inglés, *Mouse Leucine*) no observamos variabilidad en su patrón de movilidad electroforética, a pesar de lo cual seleccionamos tres confórmeros aleatoriamente dado que en las variantes con isoleucina se detectaron diferencias en rec-PrP^{res} que mostraban patrones indistinguibles. Nuestros esfuerzos por identificar propiedades bioquímicas distintivas que nos permitieran distinguirlos como potenciales confórmeros diferentes resultaron estériles y no han sido finalmente incluidos en esta tesis doctoral. Por este motivo, tras observar que los tres confórmeros de rec-PrP L108 Dx (stML-01 Dx, btML-89 Dx y btML-90 Dx) eran capaces de malplegar *in vitro* la PrP^C de un homogeneizado cerebral procedente de un ratón silvestre, y viendo que en algún caso la caracterización bioquímica había sido insuficiente para distinguir entre determinadas cepas con isoleucina, recurrimos al bioensayo en ratones C57BL/6 con el objetivo de demostrar que también se trataba de priones recombinantes *bona fide* y con la esperanza de observar diferencias en sus propiedades biológicas que permitieran su distinción. Las tres rec-PrP^{res} rec-Ra L108 Dx seleccionadas indujeron una EET en todos los animales de experimentación, lo que confirmó la generación espontánea de priones recombinantes murinos silvestres *bona fide* con tiempos de incubación cercanos a los priones de mamífero más conocidos en este modelo (Uchiyama et al., 2020). Por tanto, se confirma que mediante este método se han obtenido por segunda vez priones recombinantes *bona fide* de forma espontánea tras la generada por el grupo de Ma en 2010 (Wang et al., 2010). No obstante, en aquella ocasión, hicieron falta más de 15 rondas seriadas de PMCA para la generación de rec-PrP^{res} murina, lo que suscitó dudas acerca de si su origen era realmente espontáneo o fruto de una contaminación. Utilizando la técnica de PMSA, ha podido obtenerse un producto similar tras solo 24 h de agitación en el caso de btML-89 Dx y btML-90 Dx. Aunque es cierto que el periodo de incubación necesario para que los tres priones recombinantes murinos silvestres causen una prionopatía en los ratones C57BL/6 fue ligeramente superior al reportado por el grupo de Ma (150 ± 2.2 dpi), puede deberse a una mayor cantidad de título infeccioso acumulado a lo largo de las sucesivas rondas de PMCA o simplemente a que se trata de cepas distintas, dado que se ha reportado que el uso de distintos cofactores en el medio de propagación es determinante para las características particulares de cada cepa (Deleault et al., 2012b, Fernandez-Borges et al., 2017a). A pesar de la influencia restrictiva de los distintos cofactores, se ha reportado que algunos de ellos como el ARN podrían tener la capacidad de favorecer la propagación de un abanico más limitado de cepas que por ejemplo otros cofactores lipídicos, que favorecen la propagación de distintas cepas (Deleault et al., 2012a). Si este fuera el caso del dextrano sulfatado, se explicaría el caso de las cepas btML-89 Dx y btML-90 Dx, donde observamos una mayor diferencia en los tiempos de incubación. Asimismo, resultó curioso que la única cepa originada en condiciones diferentes (stML-01 Dx) arrojase un periodo de

incubación prácticamente idéntico a la cepa btML-90 Dx, sugiriendo la posibilidad de que sea una de las cepas preferencialmente favorecidas por el dextrano sulfatado. La realización de un segundo pase en el mismo modelo animal redujo drásticamente el periodo de incubación de las tres cepas, confirmando dichas diferencias y permitiendo distinguir entre dos tendencias: una lenta, atribuida a la cepa btML-89 Dx en solitario y una tendencia rápida, de la cual las potenciales cepas stML-01 Dx y btML-90 Dx serían responsables. Debido al tiempo que supone la realización de dos pases en un modelo murino no sobreexpresor de PrP^C, los análisis anatomopatológicos llevados a cabo hasta la fecha se han limitado a confirmar la presencia o no de los marcadores típicos de una EET (espongiosis y depósitos de PrP^{res}). La elaboración de perfiles lesionales precisos podría ayudar a confirmar la existencia de dos comportamientos diferentes e incluso a discernir si los confórmeros stML-01 Dx y btML-90 Dx pueden ser dos cepas distintas. Esta posibilidad, a pesar de los tiempos de incubación equiparables, surgió tras la observación del fenotipo tambaleante o anadeante en los animales inoculados con la cepa stML-01 Dx en primer, segundo e incluso tercer pase, lo que podría ser un signo clínico característico de cepa, de la misma manera que encontramos en la bibliografía ejemplos de cepas que han sido diferenciadas gracias al comportamiento distintivo que provocaban en los animales de experimentación (Pattison and Millson, 1961b). En cualquier caso, nuestros resultados demuestran sin lugar a duda que la isoleucina en posición 108, equivalente al polimorfismo de topillo rojo, es un facilitador del malplegamiento espontáneo, pero no es imprescindible para tal fin.

Idoneidad del método para estudiar la cinética del malplegamiento espontáneo de la PrP

El hecho de disponer de un sistema que da lugar a priones recombinantes infecciosos de forma consistente tras solo 24 h de PMSA, que es además fácilmente escalable (Erana et al., 2019), permite por primera vez la realización de estudios enfocados a desentrañar la cinética de malplegamiento espontáneo de la PrP. Esto nos condujo a tratar de dar respuesta a las preguntas de en qué momento ocurre la formación de rec-PrP resistente a PK, la adquisición de capacidad infectiva y la neurotoxicidad por parte de estas proteínas malplegadas y de si estos eventos se superponen temporalmente.

Numerosos trabajos se han centrado en investigar a nivel cinético el proceso de formación de PrP^{res} utilizando para ello modelos *in vivo* y técnicas *in vitro* (Masel and Jansen, 1999, Mulcahy and Bessen, 2004), llegando incluso a identificar tres fases que ocurren a lo largo del proceso de conversión de PrP: elongación, despolimerización y estabilización, que tendrían una duración variable en función de la cepa priónica utilizada como semilla. Estas fases, además, podrían verse alteradas por eventos como la presencia de PrP^{Sc} que actuaría como semilla o por aportación de energía al sistema mediante sonicación, acortando la duración de estas. Como la mayoría de estas investigaciones estudian el

evento de malplegamiento a través de reacciones de propagación en las que está presente una pequeña cantidad de PrP^{Sc} exógena que actúa como semilla, no han podido aportar información acerca de la cinética del evento de malplegamiento espontáneo de PrP^{res} (Mulcahy and Bessen, 2004). Otros autores presentan un enfoque sin la presencia de PrP^{Sc} añadida, centrándose en la conversión espontánea de PrP mediante técnicas *in vitro* y analizando mediante técnicas de dicróismo circular y cromatografía la transición de PrP recombinante rica en α -hélices a su isoforma termodinámicamente más estable y con mayoría de láminas β . Estas aproximaciones permitieron observar una gran barrera energética que separaba ambos estados, además de detectar distintos malplegamientos que sugerían la posibilidad de originar no sólo diversas cepas priónicas, sino también otros tipos de agregados amiloides o polimorfos, reflejando la complejidad de los fenómenos de malplegamiento y polimerización de las proteínas amiloidogénicas (Baskakov et al., 2001, Baskakov et al., 2002, Eisenberg and Sawaya, 2017). Pese a la obtención de información relevante acerca de la manera en la que tiene lugar el malplegamiento, los productos de PrP^{res} obtenidos no presentaban el comportamiento de un prion *bona fide*, necesitando pases seriados en modelos *in vivo* para demostrar su infectividad (Makarava et al., 2010), lo que podría llevar a pensar que las cinéticas caracterizadas podrían corresponder a otras vías de plegamiento amiloide no necesariamente relacionadas con la formación de priones de forma espontánea.

De esta manera, aunque existe información previa acerca de la cinética de malplegamiento de la PrP, nuestro estudio fue novedoso por ser capaz de producir priones recombinantes *bona fide* en un corto período de tiempo, permitiendo su estudio a lo largo del tiempo. Fue así como, utilizando diferentes preparaciones de PrP recombinante murina, se obtuvo rec-PrP^{res} a distintos puntos horarios partiendo siempre de la misma fuente de sustrato para eliminar variabilidad. Un análisis informático permitió establecer que el porcentaje de señal de rec-PrP^{res} generada espontáneamente, comenzaba a aumentar a partir de la primera hora de la PMSA hasta alcanzar un máximo entre las 2 y las 6 h de la técnica, para luego comenzar a decaer de manera suave en las horas finales del experimento. Al partir de una cantidad establecida de rec-PrP que se somete a PMSA y se convierte a rec-PrP^{res} de forma progresiva, es fácil explicar la ausencia o menor intensidad de señal durante las primeras horas de generación. Sin embargo, es poco plausible que, una vez la rec-PrP^{res} se genera y se alcanza un tiempo suficiente de PMSA, esta desaparezca o sufra modificaciones que la hagan sensible al tratamiento con PK, por lo que el decaimiento de la señal observada en estos puntos horarios atendería a otras razones que se discutirán más adelante. Gracias a la correlación existente entre los resultados de PMCA y los estudios *in vivo* (Fernandez-Borges et al., 2017a, Erana et al., 2019), el análisis de los productos generados confirmó que estos priones recombinantes se comportaban como priones *bona fide*, causando una EET en modelo murino silvestre y permitiendo establecer una relación entre la

formación de rec-PrP^{res} y la capacidad infectiva de la misma. Atendiendo a uno de los modelos teóricos clásicos de malplegamiento como es el modelo de conversión inducida por molde, que defiende la existencia de un estado transitorio entre la isoforma PrP^C y la PrP^{Sc} (PrP^{*}) (Prusiner, 1991), los resultados obtenidos en la cinética de PMSA difícilmente encajarían con esta premisa, ya que los productos de rec-PrP^{res} generados tras 1 h de PMSA son idénticos en sus propiedades bioquímicas y biológicas a los generados tras 24 h. Aunque una posibilidad podría ser que las especies que se encuentran en ese estado intermedio (PrP^{*}), se generen antes de la primera hora de PMSA y no posean aún las características de un prion *bona fide*. En ese caso, la ausencia de métodos de detección sumada al desconocimiento de las propiedades de esa hipotética PrP^{*}, dificulta refutar este modelo. Por otra parte, el modelo de nucleación-polimerización (Jarrett and Lansbury, 1993) plantea que, tras la formación de algunas moléculas de PrP^{Sc}, el equilibrio entre PrP^C y PrP^{Sc} comenzaría a desplazarse lentamente hacia la formación de PrP^{Sc}, dando lugar a una primera fase lenta de formación y una segunda fase donde el polímero crecería rápidamente sumando monómeros de PrP^{Sc}, similar a lo propuesto por autores que posteriormente llevaron a cabo experimentos sobre la cinética de formación (Mulcahy and Bessen, 2004). Hay que tener en cuenta que este modelo defiende que las isoformas PrP^C y PrP^{Sc} coexisten en un equilibrio reversible favorecido hacia la presencia de PrP^C, partiendo de la base de que existen cantidades mínimas de PrP^{Sc}. Por ese motivo, este modelo no sería compatible con nuestras observaciones ya que presumiblemente se obtendría infectividad *in vivo* en aquellas muestras en las que no se detecta PrP^{res} dado que la forma malplegada capaz de iniciar la propagación se encontraría siempre en el sustrato de partida debido a ese potencial equilibrio entre ambas isoformas. Dichos resultados engrosan una lista de evidencias científicas que ponen en entredicho los dos modelos clásicos de conversión, sugiriendo una renovación de estos ante la posibilidad de que, tras más de treinta años de su presentación, hayan quedado obsoletos.

El misterio de qué mecanismos rigen la conversión espontánea de PrP^C a PrP^{Sc} y de qué especies se encuentran involucradas en el proceso, se encuentra íntimamente relacionado con otra incógnita; el momento en el que la PrP^{res} generada durante el malplegamiento adquiere la capacidad de ser infectiva. La bibliografía indica que esta propiedad realmente engloba dos conceptos que deben discernirse. Los términos "tóxico" e "infeccioso" se utilizan a menudo como sinónimos al describir las propiedades de un prion. Aunque ambos adjetivos están relacionados y son necesarios para el comportamiento *bona fide* de un prion, existe una distinción sutil pero importante que hay que tener en cuenta en estos dos conceptos. La toxicidad es la capacidad de causar daño celular directo, conduciendo a la muerte del organismo tras la exposición, mientras que la infectividad es la capacidad de un agente biológico para ser transmitido con éxito de un huésped infectado a un receptor no infectado, aludiendo a su transmisibilidad y no a los procesos de daño que puede desencadenar

posteriormente (Senesi et al., 2017). Las evidencias científicas de los últimos años apuntan a una disociación entre la transmisibilidad y la neurotoxicidad en las enfermedades priónicas, como sugieren estudios tanto en células (Hannaoui et al., 2013) como en modelos animales (Hill et al., 2000). Algunos de estos estudios *in vivo* reportan que el evento de propagación o transmisión ocurriría durante la primera parte del período de incubación, mientras que la aparición de especies neurotóxicas tendría lugar una vez alcanzada una meseta de título de PrP^{Sc}. Esta hipótesis de dos fases sugiere que la adquisición de toxicidad tiene lugar únicamente cuando se satura la propagación de las formas puramente transmisoras, apuntando a un cambio en la producción de PrP^{Sc} infecciosas a PrP^{Sc} neurotóxicas (Sandberg et al., 2011). Trasladando esta hipótesis a la formación de rec-PrP^{res}, si esta teoría fuera cierta, las moléculas de rec-PrP^{res} no deberían ser neurotóxicas hasta alcanzar una meseta de especies transmisoras de rec-PrP^{res}, situación difícil de evaluar pero que, de nuevo, no se amolda a los resultados obtenidos durante la cinética de espontaneidad de la rec-PrP murina, cuyas formas malplegadas tras una hora de PMSA causaron una EET en modelo murino silvestre de la misma forma que las de 24 h, implicando que la especie neurotóxica, sea cual sea, está asociada a la formación de rec-PrP^{res}.

El diseño experimental y la metodología aplicada en la cinética de espontaneidad mediante PMSA, sin embargo, puede no ser el mejor método para discernir entre infectividad y toxicidad, ya que estos conceptos hacen referencia a cómo evoluciona la PrP^{Sc} cuando se encuentra en un huésped. Sin embargo, esta aproximación sí puede ser útil para determinar si la PrP^{res} presenta distintas propiedades en cuanto a infectividad en función de en qué momento de la cinética de formación se encuentre. Este dato es de gran relevancia, ya que los mecanismos que rigen la neurotoxicidad de las EET permanecen siendo una incógnita. Tras la identificación de placas de PrP^{Sc} como marcador patognomónico de la enfermedad se consideró que los grandes agregados de PrP^{Sc} eran los culpables de la toxicidad y el desarrollo de la enfermedad (Ceroni, 1990). Sin embargo, cada vez se cuestiona más que estas especies sean realmente las responsables de la toxicidad neuronal, apuntando a que son los oligómeros de menor peso molecular los que presentan propiedades neurotóxicas y las formas más eficientes a la hora de inducir la conversión de PrP^C (Silveira et al., 2005, Simoneau et al., 2007). Por otra parte, se ha reportado que, en ausencia de PrP^C ligada a GPI, la PrP^{Sc} resulta prácticamente inocua, sugiriendo que ni los oligómeros ni las fibras de PrP son capaces de inducir toxicidad por sí mismos, requiriendo la PrP^C como mediadora (Brandner et al., 1996, Poggiolini et al., 2013).

La relación entre la manera en la que se encuentran asociados los monómeros de PrP^{res}, formando oligómeros, fibras o grandes agregados, y la toxicidad que desencadenan cada una de estas especies, es un tema de controversia en el campo de los priones en particular y de las enfermedades neurodegenerativas en general. Otras patologías de esta índole que también cursan con la formación

de fibras amiloides coinciden en que este es un proceso heterogéneo y enormemente complejo en el que los mecanismos de citotoxicidad no están del todo claros. Ante la idea de que los oligómeros solubles prefibrilares pueden actuar como la especie citotóxica primaria, cada vez con más grupos que estudian su efecto en patologías como la enfermedad de Parkinson (PD) (Xue et al., 2009) o la enfermedad de Alzheimer (AD) (Benilova et al., 2012). Estas investigaciones han llevado no solo a considerar a las especies oligoméricas como las responsables de la toxicidad, sino a señalar que la formación de fibras y grandes agregados proteicos podría tener un papel neuroprotector. Dicha corriente de pensamiento se explica de manera original en la “hipótesis del *airbag*” (Krstic and Knuesel, 2013) que, aunque se centra en el papel del β -amiloide en la AD, resulta extensible al rol que podría desempeñar la PrP^{Sc} en las EET. Esta revisión nos plantea un hipotético escenario en el que a una persona que desconoce el funcionamiento de los coches actuales, se le encarga que investigue sobre las causas de los accidentes de coche. Al desconocer el funcionamiento de los vehículos, esta persona detectaría con interés que todos los coches accidentados presentan un *airbag* liberado, mientras que este elemento no se observa en aquellos coches que permanecen intactos, lo que le llevaría a señalar al *airbag* como principal sospechoso de estas colisiones. Esta teoría se vería reforzada cuando la persona en cuestión descubriera que un pequeño porcentaje de los accidentes automovilísticos son consecuencia de la liberación espontánea del *airbag* por un defecto de fábrica. Espoleado por el hallazgo, esta persona compartiría su descubrimiento y los ingenieros comenzarían a diseñar *airbags* controlados remotamente para poder estudiar el efecto que producen al ser liberados. Esto conduciría a numerosos estudios, perfectamente diseñados y con estrategias bien trazadas que, sin llegar a comprender cómo funciona el *airbag*, llegarían a la misma conclusión: este dispositivo es el responsable de los accidentes de coche. Esta evidencia atraería la atención de diversos especialistas, se dedicarían incontables recursos a estudiar el mecanismo de liberación del *airbag* y se publicaría un número abrumador de artículos científicos acerca del tema. Tras años de trabajo, es posible que los ingenieros consiguieran controlar totalmente la liberación del *airbag* mediante algún tipo de dispositivo preventivo, evitando así el pequeño porcentaje de accidentes causados por la liberación espontánea del *airbag* y reforzando la hipótesis inicial. Sin embargo, si continuaran con esa línea de pensamiento, podrían llegar a fabricar coches sin *airbags* o eliminarlos de los vehículos en circulación, tras lo que observarían que el número de accidentes no decrece (Krstic and Knuesel, 2013). Este curioso símil encuentra un evidente paralelismo en las placas β -amiloide de la enfermedad de Alzheimer o los grandes agregados de PrP^{Sc} en las EET, que bien podrían ser los “*airbags*” a los que la comunidad científica lleva décadas señalando como los responsables de la toxicidad de estas enfermedades neurodegenerativas, lo que podría explicar la falta de éxito en el tratamiento de este tipo de patologías.

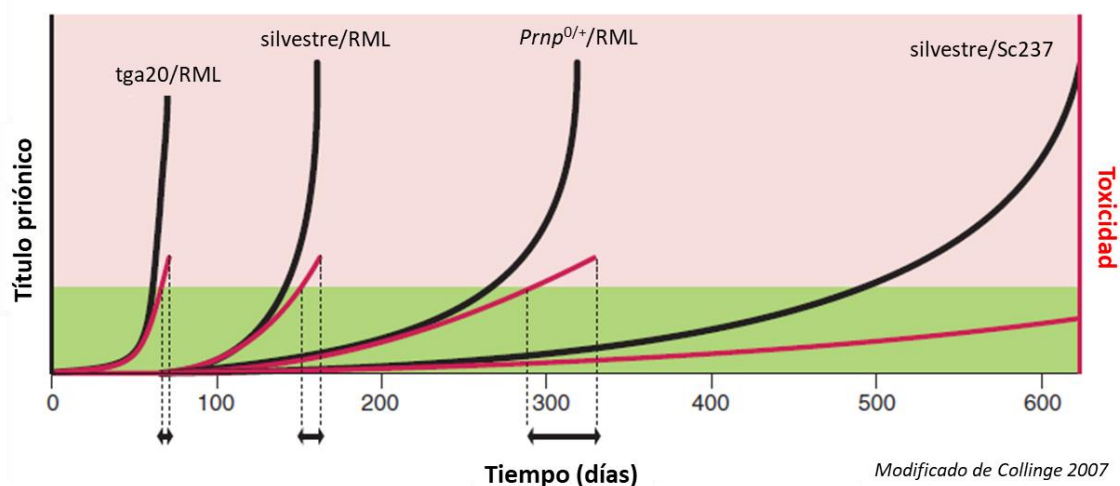


Figura 47. Esquema de la disociación entre el fenómeno de toxicidad y el título priónico en las encefalopatías espongiformes transmisibles. Según algunos modelos, la toxicidad en las EET podría deberse a la acumulación de productos intermedios, mientras que la PrP^{Sc}, considerado el agente infeccioso no sería directamente tóxico. El título de priones o PrP^{Sc} aparece representado con una línea negra, mientras que la concentración del intermediario tóxico se muestra en rojo. Las líneas de puntos verticales indican el tiempo entre aparición de signos clínicos y la muerte. El área inferior (sombreada en verde) comprende niveles de PrP intermediaria tóxica que no causan signos clínicos, mientras que la región superior (sombreada en rosa) representa niveles que causan signos de daño neurológico. Se muestran algunos ejemplos de cepas de priones como RML o Sc237 en un modelo murino silvestre que no sobreexpresan PrP^C, en ratones *Prnp*^{0/+} que expresan un 50% menos de PrP^C y en ratones *tga20* que sobreexpresan 10 veces la PrP^C murina algunos modelos, la toxicidad en las EET podría deberse a la acumulación de productos intermedios, mientras que el agente infeccioso no sería directamente tóxico. El título de priones aparece representado con una línea negra, mientras que la concentración de PrP tóxica se muestra en rojo. Las líneas de puntos verticales indican el tiempo de aparición de signos clínicos y la muerte. El área inferior (sombreada en verde) comprende niveles de PrP tóxica tolerables sin signos clínicos, mientras que la región superior (sombreada en rosa) representa niveles que causan síntomas clínicos. Aparecen algunos ejemplos de cepas clásicas de priones como RML o Sc237 en un modelo murino silvestre que no sobreexpresan PrP^C, en ratones *Prnp*^{0/+} expresan un 50% menos de PrP^C y en ratones *tga20* que sobreexpresan 10 veces la PrP^C murina. Modificado de (Collinge and Clarke, 2007).

Apoyados en este tipo de hipótesis y en la sugerencia por parte de algunos autores de que existe una disociación entre la formación agregados de PrP resistentes a PK y la neurotoxicidad producida *in vivo* propia de una EET (Halliday et al., 2014) (Figura 47), analizamos al detalle los productos de rec-PrP^{res} obtenidos en nuestra cinética de espontaneidad. La disminución de la señal de rec-PrP^{res} generada que se observa pasadas las 12 h de PMSA y comentada con anterioridad, podría deberse precisamente a diferencias ultraestructurales entre las muestras recogidas y la metodología de recolección. Como se utilizaban grandes volúmenes de reacción emplazados en tubos con capacidad para 50 ml que permitieran el ensayo cinético, a medida que las horas de PMSA avanzaban y se formaban cada vez más moléculas de rec-PrP^{res}, dando lugar primero a pequeños oligómeros y luego a fibras de mayor tamaño, estas, debido a su alto peso molecular podrían quedar depositadas en la parte inferior del tubo. Al realizar cada una de las extracciones de muestras a distintas horas de PMSA, se tuvo especial atención en detener la agitación, esperar brevemente a que se depositaran las partículas de vidrio inductoras de la espontaneidad y posteriormente, retirar la muestra

correspondiente desde la región más superficial del tubo. Con este procedimiento podríamos haber separado los agregados de mayor tamaño, cuya velocidad de sedimentación sería más alta de la prevista, lo que explicaría la diferencia observada en la cantidad de rec-PrP^{res} ya que, tras más de 8 h de PMSA, la mayoría de las moléculas de rec-PrP^{res} se encontrarían formando fibras que quedaron depositadas en el fondo del tubo o adsorbidas a las partículas de vidrio. Fue así como las muestras obtenidas tras 24 h de PMSA, presumiblemente compuestas mayoritariamente por agregados de gran tamaño, se comportaron menos eficientemente tras varias rondas de PMCA. Estas observaciones estarían en consonancia con la corriente que apunta a la “inocencia” de los agregados de mayor tamaño y al menor nivel de toxicidad que estos podrían provocar *in vivo* (Caughey and Lansbury, 2003). Para comprobar que este comportamiento se reproducía *in vivo*, se realizó un bioensayo en el que se utilizaron como inóculos los productos horarios de 0, 1, 4 y 24 h (cML-0h Dx, cML-1h Dx, cML-4h Dx y cML-24h Dx respectivamente) en ratones silvestres C57BL/6. Todos los productos produjeron una EET en el 100% de los animales de experimentación, presentando en todos los casos un patrón de PrP^{res} sináptico similar al observado en ratones inoculados con RML. De esta manera, la semilla cML-24h Dx, posiblemente con un menor contenido de formas oligoméricas presuntamente responsables de toxicidad, presentó el periodo de incubación más largo, mientras que cML-4h Dx fue la más rápida en inducir una EET en estos animales de experimentación, provocando el sacrificio de todos ellos tras 146.6 ± 3.85 dpi, igualando así el tiempo reportado por el grupo de Ma en 2010 a pesar de ser un prion generado espontáneamente *in vitro* en tan solo 4 horas. La situación intermedia quedaría representada por la semilla cML-1h Dx, que induce EET en los animales de manera más lenta que cML-4h Dx, al no haber sido capaz tras una hora de PMSA de generar suficiente título infectivo, pero más rápida que cML-24h Dx, ya que las pocas proteínas malplegadas generadas en ese tiempo deben ser especies de bajo peso molecular, pues no es probable que haya ocurrido una polimerización que diera lugar a fibras de rec-PrP^{res} de gran tamaño, como estimamos que sí ocurre para la semilla cML-24h Dx.

Con el objetivo de determinar que estas diferencias eran fruto del distinto tamaño de las especies de rec-PrP^{res} generadas y no simplemente de título o cantidad de rec-PrP^{res}, se realizaron diluciones seriadas de dichos productos y se inocularon en el mismo modelo murino silvestre, con el objetivo de determinar la infectividad específica de los mismos. El concepto de infectividad específica, ampliamente utilizado en el campo de la investigación priónica, es un concepto complicado y difícil de aplicar ya que, al igual que el concepto de “título”, se ha tomado “prestado” de otras áreas de investigación. Si tomamos como ejemplo una infección vírica, el título hace referencia al número mínimo de unidades del virus capaz de inducir una enfermedad en el hospedador. La infectividad específica sería por tanto la dilución máxima a la que un material con carga vírica puede ser diluido provocando infección en el 50% de los hospedadores. El uso de estos términos en virología es posible,

ya que se conoce con claridad la naturaleza del agente tóxico (virus) y el número de unidades necesario para provocar infección. Sin embargo, en el caso de las EET, donde desconocemos incluso cuál es la especie tóxica, este concepto es más difícil de aplicar.

Con el objetivo de comprobar si las diferencias observadas en los tiempos de incubación se debían a diferencias en el título de rec-PrP^{res} de cada muestra, se realizaron ensayos de propagación *in vitro* utilizando como semillas todos los productos de la cinética diluidos 10^{-3} y 10^{-4} en sustratos basados en PrP^C de ratón silvestre (Figura 38 a). En ellos se observó que las muestras que presentaban una mayor intensidad de señal para la rec-PrP^{res} y las que presumiblemente, tenían un mayor número de especies oligoméricas, eran también las que mostraban una mayor capacidad para malplegar la PrP^C murina *in vitro*. Esta correlación se extendió a los estudios *in vivo*, en la que se reveló que la infectividad específica estaba entre las diluciones 1:10³ y 1:10⁴ para todas las muestras que además mantuvieron las diferencias en los periodos de incubación observadas al ser inoculadas 1:10 en ratones C57BL/6 (Figura 48). Esta situación refuerza la idea de que las diferencias observadas en los tiempos de incubación atienden a diferencias en la ultraestructura de la rec-PrP^{res} presente en las semillas extraídas a tiempos variables de PMSA y no a las cantidades de rec-PrP^{res} o especies neurotóxicas en cada una, ya que, si fuese así se observarían infectividades específicas diferentes en cada una de las muestras, permitiendo mayores diluciones en el caso de la semilla más rápida. Esto se confirmó con la realización de un segundo pase utilizando como semillas los encéfalos de ratones que recibieron los inóculos diluidos 1:10, que igualó los tiempos de incubación de los tres productos iniciales, descartando a su vez, que estas diferencias se debieran a eventos como la presencia de distintas cepas con comportamientos biológicos diferentes como en el caso de los confórmeros rec-Ra L108I Dx anteriormente descritos. Al tratarse de la misma cepa de prion recombinante murino con infectividades específicas similares, las diferencias observadas en el primer pase desaparecerían en el segundo pase cuando se utiliza como inóculo los cerebros de estos animales, ya que las cantidades relativas de especies oligoméricas frente a fibras o agregados de gran tamaño se igualado *in vivo* al permitir el desarrollo de la enfermedad hasta un mismo estadio, marcado por la manifestación de signos neurológicos.

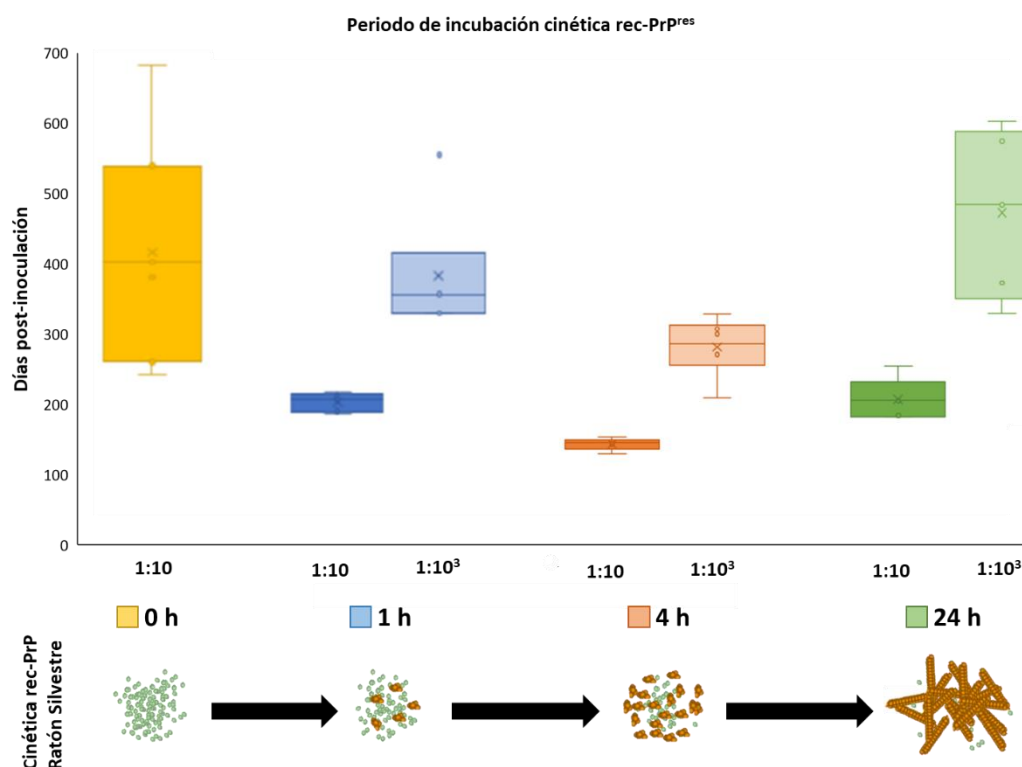


Figura 48. Representación gráfica de los resultados del bioensayo realizado con las rec-PrP^{res} murinas obtenidas durante el estudio de la cinética del malplegamiento espontáneo. Las cuatro muestras cML-0h Dx (amarillo), cML-1h Dx (azul), cML-4h Dx (naranja) y cML-24h Dx (verde) se generaron espontáneamente a distintos tiempos de PMSA (0, 1, 4 y 24 h respectivamente) y tras diluirlas 1:10, 1:10³ y 1:10⁴, se inocularon intracerebralmente en ratones C57BL/6 para determinar su infectividad y el título de priones en cada muestra. Se obtuvo una tasa de ataque completa para las diluciones 1:10 y 1:10³ de todos los productos testados con excepción de la muestra de 0 h (cML-0h Dx), aunque se observaron diferencias en los periodos de incubación entre los productos, manteniéndose proporcionales en ambas diluciones mostradas. El eje vertical representa los días post-inoculación a los que se sacrificaron los animales, mientras que el eje horizontal muestra cada uno de los grupos inoculados con las diluciones 1:10 (color oscuro) y 1:10³ (color claro) de todos los productos analizados. En ambas diluciones, la cML-4h Dx presenta un periodo de incubación inferior a las otras dos, mientras que cML-24h Dx se postula como la cepa más lenta en inducir una EET en este modelo. En la parte inferior de la figura se incluye una representación teórica del fenómeno de generación espontánea en PMSA y en cómo podría estar afectando a la concentración de especies oligoméricas y fibras de gran tamaño de rec-PrP^{res}. El confórmero cML-0h Dx que no fue sometida a PMSA y, por tanto, no presentó rec-PrP^{res} detectable, lo que explica la ausencia de EET en los animales inoculados. cML-1h Dx, generado tras solo una hora de PMSA presenta ya rec-PrP^{res} detectable, aunque con señal menos intensa y posiblemente, sin grandes fibras y con pocos oligómeros, mientras que cML-4h Dx se encontraría justo en mitad del proceso, con gran cantidad de oligómeros que podrían servir como centros de nucleación, explicando su rapidez para inducir una EET. Por último, el confórmero cML-24h Dx, tras 24 h de PMSA podría haber incorporado la gran mayoría de oligómeros a fibras de gran tamaño de rec-PrP^{res}, lo que explicaría su lentitud ante títulos similares a los de las muestras de 1 h y 4 h.

Para estar seguros de esta afirmación, decidimos también igualar *in vitro* la potencial diferencia entre la abundancia de formas oligoméricas y fibrilares de los inóculos originales extraídos tras 1, 4 y 24 h de PMSA y comprobar si los comportamientos volvían a ser similares *in vivo*. Para ello, se realizaron 3 rondas adicionales de PMSA utilizando cML-1h Dx, cML-4h Dx y cML-24h Dx como semilla y se observó que las intensidades de señal de rec-PrP^{res} se igualaron. Al testar su comportamiento en ratones silvestres, se obtuvo en todas ellas una tasa de ataque completa y un periodo de incubación cercano a los 160 dpi en los tres casos. La razón de que este periodo de incubación se iguale a un

tiempo intermedio podría atender simplemente a cuestiones metodológicas que, sin embargo, indirectamente apoyarían que las diferencias en tiempos de incubación se deben a diferencias ultraestructurales de las rec-PrP^{res} de cada producto de PMSA. La cinética de espontaneidad se realizó partiendo de una cantidad fija de sustrato basado en rec-PrP que se sometió a PMSA. Esto pudo dar lugar a que todas las moléculas de rec-PrP presentes acabaran convertidas a rec-PrP^{res}, las cuales estarían organizadas formando grandes polímeros y fibras de mayor peso molecular como consecuencia de un agotamiento del sustrato. La presencia mayoritaria de dichas fibras conlleva la disminución de oligómeros neurotóxicos en estas muestras que habrían pasado a formar parte de los grandes agregados, lo que explicaría que los tiempos de incubación observados *in vivo* correspondan a la muestra de 24 h. Por el contrario al igualar *in vitro* mediante pases seriados los inóculos de la cinética; en cada uno de estos pases de PMSA se renueva la cantidad de rec-PrP del sustrato, lo que hace que no se produzca esa situación de agotamiento y que los productos de rec-PrP^{res} generados se encuentren tanto en forma oligomérica como formando fibras más grandes, situación presumiblemente similar en la que se encontraría el producto de 4 h, lo que explicaría que los tiempos de los inóculos propagados durante 3 pases presenten los mismos tiempos de incubación y no el mostrado por la muestra de 24 h (Tabla7).

Esta hipótesis, que sugiere que las diferencias en la eficacia *in vivo* de los inóculos del ensayo cinético se deben a la menor o mayor presencia de formas oligoméricas, requiere de estudios complementarios que apoyen o refuten dicha teoría. Una de las aproximaciones más interesantes podría ser la realización de gradientes de densidad que permitieran determinar si las distintas muestras obtenidas en la cinética de espontaneidad contienen especies de rec-PrP^{res} de distinto tamaño mediante diferencias en su velocidad de sedimentación al atravesar dicho gradiente (Tixador et al., 2010). Teniendo en cuenta este y otros objetivos en el horizonte, los resultados del ensayo cinético de generación espontánea aquí expuestos y discutidos serán continuados por este grupo de investigación, abriendo distintas líneas de experimentación que arrojen nueva información sobre el evento de malplegamiento y el papel que desempeñan en él los oligómeros y fibras de PrP^{res}.

Versatilidad de la PMSA para el estudio del malplegamiento espontáneo con independencia de la especie

Dado que el malplegamiento espontáneo de la rec-PrP murina silvestre resultó posible con mínimas modificaciones en el procedimiento con respecto a aquellas PrP cuyo malplegamiento se veía favorecido por la presencia de isoleucina en la región amino terminal, decidimos probar si la PMSA podría dar lugar a priones *bona fide* de forma consistente también para las rec-PrP de otras especies,

o si bien se trataba de un fenómeno favorecido por las PrP de estos roedores. Para ello, decidimos reproducir el ensayo de cinética de espontaneidad, como ejemplo de estudio complejo mediante PMSA, utilizando PrP recombinante de otra especie. La selección de la rec-PrP ovina se realizó debido a que es una especie de alto interés socioeconómico en la actualidad y probablemente, la más representativa en lo que a enfermedades priónicas animales se refiere. Ante el complicado reto de intentar generar por primera vez priones recombinantes *bona fide* de una especie rumiante de forma espontánea y, teniendo en cuenta la diversidad genética en términos de *PRNP* que se ha descrito en oveja (Goldmann et al., 1994), seleccionamos el polimorfismo VRQ (Val136 – Arg154 – Gln171) como el candidato a malplegar espontáneamente *in vitro*, debido la mayor susceptibilidad a scrapie que presentan *in vivo* las ovejas que lo portan. Siguiendo el mismo diseño experimental que para la PrP murina, comprobamos que se podía obtener rec-PrP^{res} de oveja VRQ mediante PMSA en menos de 24 h, indicando que el método podría ser válido para la obtención de priones de distintas especies. En contraste con los resultados de la cinética de formación de rec-PrP^{res} murina, detectamos un retraso en el inicio de la formación de rec-PrP^{res} ovina, comenzando en esta ocasión tras 4 h de PMSA, necesitando tres horas más que la PrP murina (Figura 49).

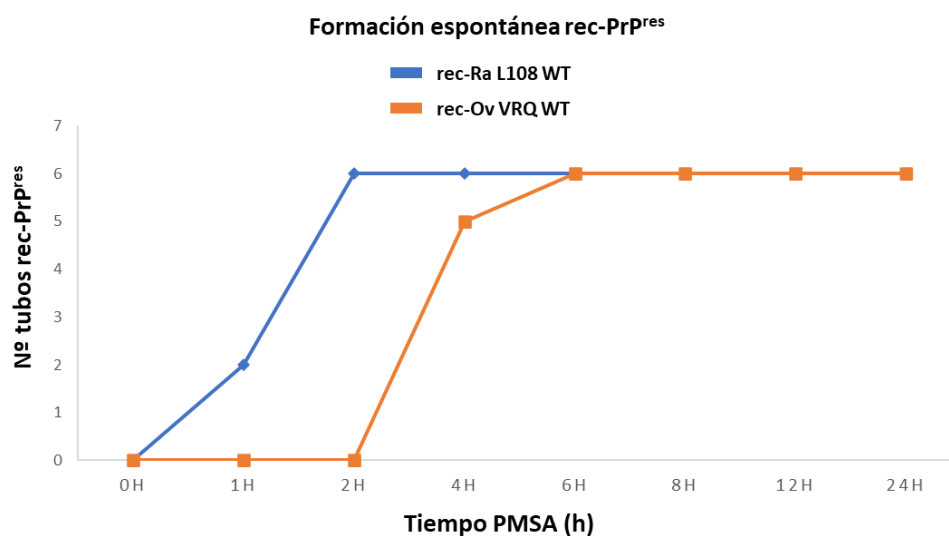


Figura 49. Comparación entre la cinética de formación espontánea de rec-PrP^{res} murina y ovina. Gráfico de la detección de rec-PrP^{res} durante el malplegamiento espontáneo por PMSA de las rec-PrP murina (azul) y ovina (naranja). Las líneas representan en ambos casos el número de tubos en los que se detectó rec-PrP^{res} tras su digestión con PK, electroforesis y tinción de proteína total. Esta representación revela una cinética de malplegamiento más lenta por parte de la rec-PrP ovina respecto a la rec-PrP murina; mientras que los sustratos con rec-Ra L108 Dx alcanzan la cantidad máxima de rec-PrP^{res} a partir de las 2 h de PMSA, esta situación se observa a las 6 h en el caso de rec-Ov Dx.

Esta diferencia en la cinética de formación de rec-PrP^{res} no resultó sorprendente, ya que estudios previos tanto de nuestro laboratorio como realizados utilizando distintos sistemas de fibrilización *in vitro* demuestran diferencias en el proceso de agregación que dependen no sólo de la secuencia de PrP (Nystrom and Hammarstrom, 2015), sino también de la cepa formada (en caso de cinética de malplegamiento inducido) (Mulcahy and Bessen, 2004) y la concentración de PrP de acuerdo con determinados modelos teóricos de polimerización (Poschel et al., 2003), aunque esta última posibilidad puede descartarse en nuestro caso, dado que se igualaron cuidadosamente las concentraciones de PrP en los sustratos de rec-PrP murina y ovina. Ese retraso en la generación espontánea de rec-PrP^{res} conllevó también una demora en la capacidad para malplegar la PrP^C ovina procedente de homogeneizados cerebrales, lo que podría indicar que la capacidad infectiva también se adquiere más tarde en estos priones recombinantes de oveja, sugiriendo cierta correlación entre la capacidad infectiva y la detección de rec-PrP^{res}. Otro hecho llamativo fue que, a diferencia de lo observado en las rec-PrP^{res} murinas del anterior ensayo cinético, algunos de los confórmeros de rec-PrP^{res} ovina aislados a partir de 4 h de PMSA mostraron distintos perfiles electroforéticos al ser observados mediante tinción de proteína total. Ante la posibilidad de haber generado distintos malplegamientos espontáneos como ya ocurrió tanto con los priones recombinantes murinos L108I (Resultados 3 y 4) como con los silvestres (Resultado 6), se realizaron diversas pruebas *in vitro* utilizando como sustratos homogeneizados cerebrales de distintos ratones transgénicos que expresaban la PrP^C ovina con el genotipo ARQ o VRQ, con el objetivo último de discriminar entre posibles cepas. Su comportamiento en estos estudios permitió confirmar características diferenciales de las rec-PrP^{res} generadas en alguna de las réplicas, llegando a obtener (réplica B del *batch* 2) un patrón electroforético peculiar (Figura 43), que además no indujo malplegamiento en ningún sustrato basado en PrP^C ovina de ratón transgénico. Así, estos resultados sugieren que la PrP ovina podría favorecer la variabilidad de confórmeros, como parece ocurrir con aquellas de topillo rojo y ratón con isoleucina. Además, en los resultados expuestos a lo largo de esta tesis doctoral, la correlación entre los estudios de propagación *in vitro* basados en PMCA previos a los bioensayos y los posteriores resultados *in vivo* ha sido prácticamente total, por lo que la observación de dos comportamientos diferentes *in vitro* para el caso de rec-Ov VRQ sugiere la presencia de al menos dos cepas; una de ellas, minoritaria y representada únicamente por las muestras de la réplica B del *batch* 2, que sería no infecciosa *in vivo* y la otra cepa, que sí sería capaz de inducir una EET *in vivo* y que estaría representada por el resto de confórmeros rec-Ov VRQ obtenidos. Este hecho podría indicar que, aunque el dextrano sulfatado parece inducir de forma consistente la formación de rec-PrP^{res} infecciosas sobre las PrP de topillo rojo y ratón, en el caso de la PrP ovina el cofactor podría no tener el mismo efecto, lo que recuerda a la influencia diferencial de este cofactor sobre la propagación de scrapie, en la que actúa como inhibidor (Caughey and Raymond, 1993), frente a la propagación de BSE, que se ve favorecida

(Murayama et al., 2010). Con el objetivo de establecer las bases para futuros estudios y confirmar las características de las rec-PrP^{res} ovinas generadas *in vitro*, se realizó un bioensayo utilizando ratones transgénicos que expresan la PrP^C ovina tanto con el polimorfismo VRQ como con ARQ, para testar así si los dos comportamientos observados *in vitro* se reproducían con posterioridad *in vivo*.

Al encontrarse el bioensayo en curso en el momento en el que se deposita esta tesis doctoral, no podemos afirmar que los priones sintéticos ovinos presenten un comportamiento de prion *bona fide*, ya que no se ha podido confirmar su infectividad *in vivo*. Tampoco se puede aseverar que los dos comportamientos observados *in vitro* atiendan a la presencia de dos cepas ovinas diferentes, por lo que sería necesaria una caracterización profunda a nivel bioquímico y biológico. De la misma manera que ocurrió durante la generación espontánea con PrP murinas, el auge de una u otra cepa podría deberse simplemente a procesos estocásticos de la propia herramienta, lo cual tendría una enorme relevancia de ser confirmada la generación de cepas ovinas con diferentes propiedades. Desde que la transmisibilidad del scrapie fue demostrada (Cuille and Chelle, 1936), este agente ha sido objeto de innumerables estudios de transmisión, lo que ha llevado a que sea uno de los mejor caracterizados a nivel de transmisibilidad y a la identificación diferentes cepas de scrapie natural (Benestad et al., 2008, Moore et al., 2016). A raíz de la “crisis de las vacas locas”, donde el BSE demostró ser capaz de transmitirse a humanos y provocar vCJD, numerosos estudios se enfocaron en analizar otras especies que pudieran actuar potencialmente como intermediarias de transmisión de EET a humanos. Una de las más estudiadas fue la oveja, donde en algunos casos se observó que algunos ratones transgénicos que expresaban la PrP^C humana desarrollaban una EET de forma eficiente al ser inoculados con BSE adaptado previamente a oveja y, sin embargo, no lo hacían cuando eran inoculados directamente con BSE (Plinston et al., 2011), algo similar a lo observado en una especie resistente como el perro (Vidal et al., 2020).

El hecho de que los aislados de scrapie puedan ser mezclas heterogéneas de cepas explicaría el hecho de que su transmisión a diferentes especies ha originado diversas cepas de priones, como fue el caso de los comportamientos de rascado y aletargamiento observados en cabras inoculadas con scrapie SSBP/1 (Pattison and Millson, 1961b) o su posterior adaptación a roedores, originando las cepas de priones más utilizadas hoy en día (Zlotnik and Rennie, 1963, Chandler and Fisher, 1963). Esta adaptabilidad o tendencia a la variación de los priones ovinos, que podría relacionarse con la observada en el ensayo *in vitro* presentado, ilustra el potencial peligro que supone la aparición de cepas ovinas desconocidas hasta el momento y que podrían adquirir nuevas características relacionadas con la transmisión a humanos. Precisamente en el caso de la oveja el riesgo es notable, ya que se han acumulado evidencias a lo largo del estudio del scrapie que alimentan la sospecha de que podría haber sido el origen de diversos brotes de enfermedades priónicas animales como BSE

(Pattison, 1998, Huor et al., 2019), TME (Marsh et al., 1991) o CWD (Williams and Young, 1980). Por todo ello, la generación *de novo* de diferentes cepas de priones ovinos sintéticos es de gran importancia ya que podría servir para comprender mejor el origen de diferentes enfermedades priónicas en mamíferos. Asimismo, la metodología establecida ofrece las herramientas necesarias para trasladar este tipo de ensayos de generación espontánea a la PrP de cualquier especie, que como continuación y ampliación de esta línea de investigación podrían permitir la obtención de información valiosa acerca de las regiones involucradas en el malplegamiento esporádico de la proteína priónica.

Estudio de la influencia del entorno de propagación sobre las características de cepa como ejemplo de la utilidad de la PMSA

Más allá de la relación entre la estructura primaria de la PrP y la existencia de diferentes cepas priónicas, el papel que desempeñan los cofactores merece un estudio más detallado. Como comentamos anteriormente, partiendo de que la isoleucina en la posición 108 de la PrP junto con la presencia de dextrano sulfatado podían ser los responsables de la rotunda efectividad para generar espontáneamente distintas cepas de priones rec-Ra L108I Dx, estudiamos ambos factores. Una vez superada la influencia favorable de dicha mutación mediante la optimización de la PMSA que permitió el malplegamiento de PrP murina silvestre y de la PrP ovina, surgió la oportunidad de estudiar en mayor detalle el efecto del dextrano sulfatado como cofactor polianiónico que parece favorecer no sólo el malplegamiento espontáneo, sino la formación consistente de priones recombinantes infecciosos. Sin embargo, el rol que puede desempeñar el dextrano sulfatado no ha podido ser analizado con toda la profundidad que requiere, encontrándose en la actualidad estos estudios aún en una fase embrionaria. El papel de los cofactores en el malplegamiento de la PrP recombinante *in vitro* ha sido estudiado por diversos grupos de investigación en las últimas décadas. La presencia de cofactores como el RNA (Deleault et al., 2003), la fosfatidiletanolamina (Deleault et al., 2012a) o el dextrano (Fernandez-Borges et al., 2017a) ha sido descrita como esencial por algunos autores para la generación de priones infecciosos (Burke et al., 2019), mientras que otros, defienden que puede favorecer la formación o selección de confórmeros de PrP con capacidad infectiva pero que no resulta esencial para la infectividad de los mismos una vez formados (Fernandez-Borges et al., 2017a). En este sentido, existen estudios que indican que la propagación de priones es dependiente de los cofactores del sustrato solo para determinadas cepas priónicas, sugiriendo que esta barrera puede ser superada eventualmente (Deleault et al., 2010, Makarava et al., 2011) y que por tanto los cofactores no son esenciales, ya que, si la dependencia fuera total, el cofactor podría ser un elemento intrínseco del prion *bona fide* sin el que este no tendría capacidad infecciosa.

No obstante, los priones generados o propagados en ausencia de cofactor hasta la fecha, han presentado tasas de ataque nulas o reducidas y en este último caso, tiempos de incubación muy prolongados (Fernandez-Borges et al., 2017a, Burke et al., 2019), por lo que el debate acerca del papel de los cofactores sigue activo y, por consiguiente, el análisis de la función que realiza el dextrano sulfatado en los priones rec-Ra L108I Dx podría ser un tema de suma relevancia.

Tras detectar un patrón de peso molecular muy particular en las rec-PrP^{res} formadas tras la adaptación a un medio sin cofactor de una de las semillas rec-Ra L108I Dx (Figura 18), decidimos indagar más en este resultado. En primer lugar, comprobamos que los cambios en los perfiles electroforéticos de las semillas originales se mantenían tras pases seriados, pudiendo diferenciar dos comportamientos diferentes; un patrón de peso molecular característico con una señal muy intensa a ~16 kDa y apenas bandas intermedias que fue fruto de la adaptación de la semilla stMI-03 Dx, y un segundo perfil electroforético caracterizado por la ausencia de banda a ~16 kDa y representado por la adaptación de las otras tres semillas. Seleccionamos dos de los nuevos confórmeros adaptados a la ausencia de dextrano (stMI-03 CB y btMI-09 CB) como representativas para una caracterización más detallada de la influencia del cofactor, dadas sus alteraciones de patrón de movilidad electroforética respecto a las cepas originales generadas en presencia de dextrano. Un estudio epitópico de estos priones recombinantes rec-Ra L108I CB reveló que la cepa btMI-09 Dx, la única hasta la fecha en inducir una EET en un modelo silvestre murino junto con la cepa btMI-05 Dx, sufría un cambio estructural ante la ausencia de dextrano sulfatado en el medio de propagación que favorecía los cortes de la PK en la región intermedia de la PrP malplegada, dando lugar a dos fragmentos de aproximadamente 9 y 2 kDa. Por su parte, la adaptación de la cepa stMI-03 Dx supuso un cambio drástico en su perfil electroforético, desapareciendo el doble bandeo en torno a la región de ~5 kDa y aumentando de forma drástica la señal a ~16 kDa, un fragmento de rec-PrP^{res} de mayor peso molecular que los detectados hasta el momento. Teniendo en cuenta que este teórico fragmento de alto peso molecular es detectado por todos los anticuerpos utilizados, debemos atender a la ligera diferencia de señal existente entre 9A2 y 12B2, donde observamos que la señal obtenida con 12B2 es más concreta y ligeramente superior a la observada con 9A2 que, al mapear en ambos fragmentos, origina una señal más difusa que podría confundirse con la presencia de un único fragmento. Sin embargo, basándonos en el resultado de este ensayo epitópico y comparándolo con el realizado anteriormente, estimamos que la cepa stMI-03 CB en ausencia de dextrano sulfatado genera tras su digestión con PK, además del fragmento de rec-PrP^{res} típico de ~16 kDa, un fragmento adicional e inédito hasta ahora formado aproximadamente por 150 aminoácidos y con un peso molecular de ~17 kDa. Estos cambios observados, además de para la distinción de las cepas, supusieron una buena oportunidad para estudiar el efecto de la presencia o ausencia de cofactor en el medio de propagación, tratando de dar

respuesta a si las alteraciones estructurales podrían responder a fenómenos de adaptación y/o selección, así como para determinar si el cofactor es esencial para la infectividad de las rec-PrP^{res} generadas *in vitro*. Para comprobar si el aparente cambio estructural sufrido por estas cepas al ser propagadas en un entorno libre de cofactor supuso una modificación en sus propiedades, ya que también podría responder a alteraciones en la digestión proteolítica debidos a los distintos medios de propagación (Notari et al., 2004), realizamos experimentos de propagación en sustratos basados en PrP murina silvestre. De la misma manera que la cepa stMI-03 Dx no fue capaz de malplegar en una ronda de PMSA la rec-PrP murina silvestre, la semilla stMI-03 CB tampoco lo consiguió, independientemente de la presencia de dextrano en el medio, por lo que no se podría afirmar que haya habido un cambio en la cepa ni descartar potenciales artefactos durante la digestión debido a la presencia o ausencia de cofactor. Sin embargo, la semilla btMI-09 CB demostró un comportamiento dependiente de cofactor al propagar *in vitro* en el sustrato basado en proteína rec-PrP silvestre únicamente cuando se añadía dextrano al medio, revelando un cambio de propiedades en la cepa adaptada a CB y descartando así artefactos durante la digestión debidas al dextrano. A su vez, esta pérdida de capacidad de propagación a expensas de la PrP murina silvestre en ausencia de dextrano, podría estar sugiriendo una potencial pérdida de infectividad en ausencia del cofactor y apoyando su necesidad para la infectividad de los priones recombinantes, tal y como han defendido Burke y colaboradores previamente (Burke et al., 2019). No obstante, al testar el comportamiento de ambas semillas adaptadas a CB frente a un sustrato basado en PrP^C procedente de homogeneizados cerebrales de TgMoL108I y también de ratón de genotipo silvestre mediante PMCA, observamos que la semilla btMI-09 CB mostraba capacidad de malplegar ambas PrP de encéfalo, indicativo de su potencial infectivo *in vivo*. Por tanto, la potencial infectividad de la semilla btMI-09 CB (para el que un bioensayo se encuentra en curso y cuyos resultados parecen confirmar su infectividad *in vivo*), indica que el cofactor no sería esencial para la infectividad. Aunque en el caso de la semilla stMI-03 CB, los mismos experimentos de propagación apuntan hacia una pérdida de capacidad infectiva respecto a su predecesor stMI-03 Dx, también podrían explicarse los resultados en conjunto si el cofactor fuese un modulador, ya sea por adaptación o selección, de confórmeros o cepas concretas con características distintivas, como apuntábamos en un trabajo previo de nuestro grupo (Fernandez-Borges et al., 2017a). La idea de que los cofactores podrían dirigir o favorecer la formación de PrP malplegadas infecciosas podría explicar también estudios previos, en que los productos obtenidos *in vitro* sin la presencia de cofactores polianiónicos que no causaban EET en animales en una primera inoculación, podían acabar siendo infecciosos en un segundo pase tras una adaptación *in vivo* en animales asintomáticos (Makarava et al., 2010, Moda et al., 2015). Así, estos amiloides de PrP que no reunían las características propias de un prion *bona fide* podrían haberse adaptado *in vivo* a un entorno rico en cofactores polianiónicos (Sevillano et al., 2020), que podría inducir un cambio hacia la formación de

nuevas cepas que sí se comportarían como priones *bona fide*. Aunque este fenómeno también podría explicarse por la integración de cofactores en la estructura del prion sintético durante el primer pase, lo que les podría haber conferido capacidad infectiva para la subsiguiente inoculación *in vivo*. Estas investigaciones han conducido al establecimiento, por parte de ciertos autores, de la teoría que defiende que el cofactor es esencial para que un prion sea infeccioso (Deleault et al., 2012b, Burke et al., 2019). La última aproximación de estos autores para demostrar que la misma rec-PrP malplegada no resulta infecciosa en ausencia de cofactores, pero que conserva latente la capacidad infectiva siendo necesaria únicamente su adición para la recuperación de dicha capacidad, implicó la propagación de una cepa murina infecciosa a sustratos basados en rec-PrP de topillo rojo, tanto en presencia como en ausencia de cofactores lipídicos purificados de encéfalo. Para lograr dicha adaptación realizaron 18 rondas de PMCA en las que, debido a las características particulares del sustrato de topillo rojo, es posible la generación espontánea de nuevas cepas o la promoción de otras que tengan poco o nada que ver con la semilla original, basándonos en resultados obtenidos en nuestro laboratorio (pendientes de publicación) que indican que la rec-PrP recombinante de topillo rojo puede dar lugar a priones recombinantes infecciosos en menos de 24 h de reacción de forma espontánea. De hecho, reportan que al propagar el prion recombinante murino infeccioso (Wang et al., 2010) en ausencia de cofactor en sustrato con rec-PrP de topillo rojo se observa un núcleo resistente de ~16 kDa en la rec-PrP^{res} resultante (no infecciosa *in vivo*), mientras que la propagación en presencia de cofactores dio lugar a un fragmento de ~17 kDa (infecciosa *in vivo*), sugiriendo un potencial cambio de cepa o su generación espontánea durante los pases realizados. Posteriormente, la propagación de este confórmero de ~16 kDa mediante 3 pases seriados de PMSA en homogenizado de encéfalo de topillo rojo, resulta en la misma cepa que el confórmero de ~17 kDa. Dada la presencia de cofactores en el homogeneizado, resulta difícil descartar una potencial adaptación/selección de la rec-PrP^{res} de 16 kDa a la cepa representada por la banda de 17 kDa en 3 pases, pudiendo tratarse de dos confórmeros distintos y no de uno sólo cuya infectividad depende de la presencia de cofactores. En nuestro caso, los cambios de patrón observados en las cepas adaptadas a CB, junto con los resultados preliminares del bioensayo en ratones TgMol108I, donde inoculamos las cepas stMI-03 CB y btMI-09 CB (actualmente en curso, pero habiendo demostrado ya que la cepa btMI-09 CB es infecciosa presencia pesar de la ausencia de dextrano sulfatado, ya que muestra tasas de ataque del 100% con tiempos de incubación de 170.13 ± 4.21 dpi, en contraste al obtenido con la cepa btMI-09 Dx, 158 ± 4.76 dpi; Tabla 3), apuntan en la dirección contraria, en que los cofactores no serían esenciales para la infectividad sino que inducirían derivas conformacionales en las cepas propagadas, ya sea por adaptación o por selección preferencial de otros confórmeros minoritarios. El hecho de que al menos una de nuestras cepas rec-Ra L108I Dx sea capaz de propagar en un sustrato homólogo sin dextrano sulfatado y mantenga sus propiedades infecciosas, puede deberse simplemente a un hecho

estocástico o a que los priones recombinantes generados espontáneamente mediante la PMSA son también más eficientes a la hora de superar constricciones como la ausencia de cofactor. Aunque no podemos descartar la posibilidad de que algunas cepas de priones sintéticos sí sean dependientes de cofactor para inducir una EET *in vivo*, queda demostrado que otras cepas son capaces de mantener sus propiedades infecciosas tras ser adaptadas a un ambiente sin cofactores, lo que podría suponer una reevaluación de las características que se le atribuyen a un prion *bona fide*.

Con la idea de profundizar en otra de las cuestiones más relevantes acerca de la naturaleza de las cepas priónicas, si se componen de un único conformero o si como indican las evidencias más recientes se trata de nubes de distintos conformeros o cuasi-especies (Collinge and Clarke, 2007, Weissmann et al., 2011), decidimos continuar los estudios de propagación en presencia/ausencia de dextrano sulfatado ya que cambios en el entorno de propagación podrían ayudar a resolver dicha cuestión. Para ello, diseñamos una estrategia de pases seriados para devolver los productos adaptados a CB de nuevo a dextrano y, por último, readaptarlos a la ausencia de dextrano sulfatado (Figura 27), suponiendo que se revelarían potenciales fenómenos adaptación o si en cambio, podríamos observar eventos que sugiriesen mezclas de cepas en los que los cofactores podrían actuar como selectores (Fernandez-Borges et al., 2017a). Los estudios preliminares realizados *in vitro* han dejado entrever que estas cepas podrían modificar sus propiedades a medida que intercalan la presencia de dextrano con su ausencia, lo que podría significar la obtención de mezclas heterogéneas de cepas priónicas recombinantes con distinto grado de afinidad para la propagación en ausencia o presencia de dextrano. Actualmente, estos estudios se encuentran en curso y se plantean diversas inoculaciones que podrían revelar características de cepa derivadas de posibles mezclas presentes en las diferentes preparaciones, o si por el contrario las adaptaciones realizadas *in vitro* resultan en cepas completamente divergentes apuntando a fenómenos de adaptación más que de selección. En cualquier caso, y a pesar de que no se dispone de resultados aún para discutir acerca del tema, decidimos incluir los estudios de cambio de entorno de propagación para ilustrar el potencial de la PMSA.

Recapitulación de los resultados que muestran el potencial de la PMSA

La obtención sistemática y robusta de priones sintéticos *de novo*, infecciosos *in vivo* y capaces de comportarse como un aislado priónico natural, lleva siendo un tema de controversia en el campo desde hace décadas. La creciente necesidad de minimizar el uso de modelos animales para mimetizar la patología, sumada a la heterogeneidad observada en las variantes esporádicas de la enfermedad priónica, hace que las técnicas *in vitro* cobren ahora más importancia que nunca. En este escenario surge la PMSA (del inglés, *Protein Misfolding Shaking Amplification*), herramienta capaz de propagar

de manera estable semillas recombinantes manteniendo sus propiedades infecciosas (Erana et al., 2019) y cuya adaptación a la generación espontánea de priones recombinantes murinos ha supuesto el eje central de esta tesis doctoral. A nivel técnico, la modificación de diversos parámetros de esta herramienta conllevó a una optimización de la metodología destinada a la obtención espontánea de priones recombinantes murinos, independientemente de si portaban el polimorfismo del topillo rojo o no. Posteriormente se comprobó que esta novedosa metodología era aplicable a otras secuencias recombinantes de PrP pertenecientes a especies de interés, como fue el caso de la oveja. No solo fue posible la obtención espontánea de priones recombinantes ovinos, sino que la PMSA permitió lograrlo de manera robusta, sistemática y en menos de 24 h, permitiendo la realización de estudios cinéticos. Otra mejora técnica fue la confirmación de que las rec-PrP^{res} murinas obtenidas espontáneamente pueden adsorberse a partículas esféricas de zirconia – sílice y mantener sus características eficientemente, facilitando así el manejo de productos priónicos y permitiendo el diseño de ensayos bien estandarizados, ya que el uso de este formato asegura partir de cantidades similares de rec-PrP^{res} en cada condición. Por tanto, la nueva metodología de PMSA es una herramienta fácil de implementar en otros laboratorios, que podrían aprovechar la escalabilidad de la técnica para producir de manera sistemática grandes cantidades de rec-PrP^{res}. Este punto es de especial interés ya que, tras resolverse recientemente la estructura de un prion mamífero infeccioso (Kraus et al., 2021), puede ser atractivo aplicar esta misma metodología a priones recombinantes para resolver la estructura de este tipo de priones y compararla con la del prion mamífero, evaluando así la posibilidad de hallar diferentes estructuras o formas de malplegamiento por parte de la rec-PrP^{res} en base a las distintas cepas existentes y correlacionarlo con sus características biológicas.

Por tanto, no solo es interesante la idea de generar priones espontáneamente *in vitro* de manera rápida y en grandes cantidades, sino hacerlo también originando una variabilidad de cepa que permita distinguir diferentes comportamientos. Las mejoras técnicas aplicadas a la PMSA permitieron la obtención de hasta cuatro cepas de priones rec-Ra L108I Dx, que mostraron diferentes propiedades bioquímicas y biológicas. Todas estas cepas demostraron ser infecciosas con mayor o menor grado de eficacia, sugiriendo que también es posible la obtención de confórmeros no inductores de la enfermedad, manifestación de igual importancia puesto que puede ser aprovechado para estudios de competitividad enfocados a detener la propagación de cepas causantes de EET. Por tanto, la generación controlada de un paisaje heterogéneo conformado por diversas cepas recombinantes murinas podría aportar información clave sobre las distintas propiedades que puede adquirir un prion y la manera de seleccionarlas. Aunque la caracterización bioquímica y biológica de las cuatro cepas rec-Ra L108I Dx ha permitido identificarlas claramente como distintos confórmeros de priones *bona fide*, tras la escritura de esta tesis doctoral aún hay varios bioensayos pendientes de finalización que

podrían aportar nueva información. Por otro lado, debido a la metodología simple y bien estandarizada que aporta el uso de partículas de zirconia – sílice con cepas recombinantes adsorbidas a ellas, los ensayos de caracterización bioquímica que pueden realizarse con estas cepas recombinantes son prácticamente infinitos y este grupo de investigación seguirá profundizando en las distintas propiedades de estos confómeros de proteína malplegada murina con el polimorfismo L108I.

Una de esas propiedades fue la capacidad de malplegar la PrP murina silvestre, tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que nos condujo a otro de los principales resultados de esta tesis doctoral; la obtención de priones espontáneos de ratón silvestre, sin la presencia del polimorfismo facilitador de topillo rojo. El hecho de que estos priones demostrasen ser infecciosos en un modelo animal silvestre fue la evidencia que terminó de confirmar el enorme potencial de la PMSA para la generación de todo tipo de priones *bona fide*. Aprovechando esta capacidad, se realizó un ensayo cinético utilizando proteína recombinante de ratón silvestre con el que se intentó caracterizar *in vitro* el proceso de malplegamiento, estableciendo una relación entre la generación de rec-PrP^{res} y la adquisición de infectividad por parte de las proteínas malplegadas. La metodología aplicada y los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* nos hicieron plantear la posibilidad de que el evento de malplegamiento espontáneo, un evento de muy baja frecuencia en la naturaleza que comienza con la formación de pequeños oligómeros y continúa con la constitución de fibras y agregados de mayor peso molecular, es mimetizado de manera robusta y acelerada por la PMSA, permitiendo la obtención de estas especies de rec-PrP^{res} de diferente tamaño en una ventana de tiempo mucho más reducida. De esta manera, la proteína recombinante murina sometida a la agitación de la PMSA, inocua en un principio, formaría una pequeña cantidad de oligómeros de bajo peso molecular durante las primeras horas de aplicación de la técnica y rápidamente, adquiriría propiedades infecciosas. A medida que el tiempo avanza, la cantidad de pequeños oligómeros es mayor, aumentando el título infectivo y permitiendo la obtención de muestras con una alta capacidad infectiva. Sin embargo, al llevar el sistema a una situación de agotamiento en la que la gran mayoría de pequeños oligómeros se encuentran ya formando fibras de gran peso molecular, el título infectivo disminuiría obteniéndose periodos de incubación más prolongados. Esta interpretación de los resultados iría en consonancia con la idea de que las especies oligoméricas son las verdaderas responsables de la toxicidad (Silveira et al., 2005), aunque para su confirmación aún son necesarios estudios adicionales acerca de la distribución del tamaño de las rec-PrP^{res} originadas. Este ensayo pudo ser reproducido utilizando rec-PrP ovina y demostrando así el enorme potencial de la técnica, demostrando su aplicabilidad a diversas especies. Por último, esta tesis doctoral ha discutido brevemente el papel que pueden desempeñar los cofactores en la generación y posterior propagación de priones recombinantes, demostrando que es posible la producción de

priones adaptados a la ausencia de cofactor y capaces de causar una EET *in vivo* y abriendo la puerta a posteriores investigaciones enfocadas a esclarecer la relación entre priones y cofactores.

CONCLUSIONES

- 1) La PMSA ha podido adaptarse a la generación espontánea de priones recombinantes murinos con la mutación L108I, variante característica del topillo rojo, demostrando que favorece el malplegamiento.
- 2) Los productos recombinantes malplegados obtenidos presentan variabilidad en sus características bioquímicas, pudiendo distinguirse hasta cuatro confórmeros diferentes.
- 3) Todos los confórmeros generados espontáneamente en presencia del polimorfismo L108I causaron una enfermedad priónica *in vivo*, confirmando su condición de priones *bona fide* y demostrando además que se trata de cepas priónicas distintas.
- 4) La presencia de un cofactor polianiónico durante el malplegamiento no es esencial para la infectividad *in vivo* de los priones recombinantes, pero puede inducir la modificación de sus características, sugiriendo eventos de selección o adaptación.
- 5) El malplegamiento espontáneo de la PrP murina silvestre *in vitro* es posible mediante la optimización de las condiciones de reacción, siendo determinante la concentración de PrP en el sustrato ante la ausencia de la mutación L108I.
- 6) El estudio de la cinética de malplegamiento espontáneo de la PrP murina silvestre demuestra que la formación *in vitro* de priones *bona fide* es un proceso rápido y robusto, con un aumento exponencial de PrP malplegada hasta que alcanza un máximo debido al agotamiento del sustrato.
- 7) La caracterización bioquímica de las PrP malplegadas obtenidas a distintos tiempos de reacción reveló que estas mostraban las mismas propiedades, indicando que la PrP malplegada que se forma inicialmente se mantiene inalterada durante su propagación.
- 8) La caracterización biológica de estas PrP malplegadas confirmó que se trataba de una única cepa y reveló diferencias en los periodos de incubación que no derivaban de distintos títulos, pudiendo deberse a la proporción de pequeños oligómeros y grandes agregados de PrP.
- 9) El mismo procedimiento de PMSA ha podido trasladarse con éxito para el malplegamiento espontáneo de PrP ovina silvestre, permitiendo el estudio de la cinética de formación, que se ha revelado diferente a la de la PrP murina.
- 10) Las PrP recombinantes malplegadas ovinas fueron capaces de inducir *in vitro* la conversión de la PrP^C ovina, sugiriendo potencial infectividad que se está evaluando por bioensayo y que actualmente se encuentra en curso.
- 11) Se ha demostrado que la generación de priones recombinantes de forma espontánea mediante PMSA puede llevarse a cabo con PrP de especies distintas al topillo rojo, indicando su versatilidad para el estudio del malplegamiento priónico en distintas especies.

REFERENCIAS

- Agrimi, U., Nonno, R., Dell'omo, G., Di Bari, M. A., Conte, M., et al. 2008. Prion protein amino acid determinants of differential susceptibility and molecular feature of prion strains in mice and voles. *PLoS Pathog*, 4, e1000113.
- Aguilar-Calvo, P., Espinosa, J. C., Pintado, B., Gutierrez-Adan, A., Alamillo, E., et al. 2014. Role of the goat k222-PrP(c) polymorphic variant in prion infection resistance. *J Virol*, 88, 2670-6.
- Aguzzi, A. & Calella, A. M. 2009. Prions: Protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev*, 89, 1105-52.
- Aguzzi, A., Nuvolone, M. & Zhu, C. 2013. The immunobiology of prion diseases. *Nat Rev Immunol*, 13, 888-902.
- Alonso, D. O., An, C. & Daggett, V. 2002. Simulations of biomolecules: Characterization of the early steps in the ph-induced conformational conversion of the hamster, bovine and human forms of the prion protein. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*, 360, 1165-78.
- Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A. & Clarke, M. C. 1967. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, 214, 764-6.
- Alper, T., Haig, D. A. & Clarke, M. C. 1966. The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun*, 22, 278-84.
- Alper, T., Haig, D. A. & Clarke, M. C. 1978. The scrapie agent: Evidence against its dependence for replication on intrinsic nucleic acid. *J Gen Virol*, 41, 503-16.
- Alvarez-Martinez, M. T., Fontes, P., Zomosa-Signoret, V., Arnaud, J. D., Hingant, E., et al. 2011. Dynamics of polymerization shed light on the mechanisms that lead to multiple amyloid structures of the prion protein. *Biochim Biophys Acta*, 1814, 1305-17.
- Anderson, R. M., Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Woolhouse, M. E., Watt, C. J., et al. 1996. Transmission dynamics and epidemiology of bse in british cattle. *Nature*, 382, 779-88.
- Asher, D. M. & Gregori, L. 2018. Human transmissible spongiform encephalopathies: Historic view. *Handb Clin Neurol*, 153, 1-17.
- Atarashi, R., Wilham, J. M., Christensen, L., Hughson, A. G., Moore, R. A., et al. 2008. Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nat Methods*, 5, 211-2.
- Aucoin, D., Xia, Y., Theint, T., Nadaud, P. S., Surewicz, K., et al. 2018. Protein-solvent interfaces in human γ 145stop prion protein amyloid fibrils probed by paramagnetic solid-state nmr spectroscopy. *J Struct Biol*.
- Ayers, J. I., Kincaid, A. E. & Bartz, J. C. 2009. Prion strain targeting independent of strain-specific neuronal tropism. *J Virol*, 83, 81-7.
- Balch, W. E., Morimoto, R. I., Dillin, A. & Kelly, J. W. 2008. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*, 319, 916-9.
- Barlow, R. M. & Rennie, J. C. 1976. The fate of me7 scrapie infection in rats, guinea-pigs and rabbits. *Res Vet Sci*, 21, 110-1.
- Barret, A., Tagliavini, F., Forloni, G., Bate, C., Salmona, M., et al. 2003. Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases. *J Virol*, 77, 8462-9.
- Barria, M. A., Mukherjee, A., Gonzalez-Romero, D., Morales, R. & Soto, C. 2009. De novo generation of infectious prions in vitro produces a new disease phenotype. *PLoS Pathog*, 5, e1000421.
- Bartz, J. C., Dejoia, C., Tucker, T., Kincaid, A. E. & Bessen, R. A. 2005. Extraneural prion neuroinvasion without lymphoreticular system infection. *J Virol*, 79, 11858-63.
- Bartz, J. C., Kincaid, A. E. & Bessen, R. A. 2003. Rapid prion neuroinvasion following tongue infection. *J Virol*, 77, 583-91.
- Bartz, J. C., Marsh, R. F., Mckenzie, D. I. & Aiken, J. M. 1998. The host range of chronic wasting disease is altered on passage in ferrets. *Virology*, 251, 297-301.
- Baskakov, I. V., Caughey, B., Requena, J. R., Sevillano, A. M., Surewicz, W. K., et al. 2019. The prion 2018 round tables (i): The structure of PrP(sc). *Prion*, 13, 46-52.
- Baskakov, I. V. & Katorcha, E. 2016. Multifaceted role of sialylation in prion diseases. *Front Neurosci*, 10, 358.

- Baskakov, I. V., Legname, G., Baldwin, M. A., Prusiner, S. B. & Cohen, F. E. 2002. Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *J Biol Chem*, 277, 21140-8.
- Baskakov, I. V., Legname, G., Prusiner, S. B. & Cohen, F. E. 2001. Folding of prion protein to its native alpha-helical conformation is under kinetic control. *J Biol Chem*, 276, 19687-90.
- Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., et al. 1986. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, 46, 417-28.
- Beck, K. E., Thorne, L., Lockety, R., Vickery, C. M., Terry, L. A., et al. 2013. Strain typing of classical scrapie by transgenic mouse bioassay using protein misfolding cyclic amplification to replace primary passage. *PLoS One*, 8, e57851.
- Benestad, S. L., Arsaç, J. N., Goldmann, W. & Noremark, M. 2008. Atypical/nor98 scrapie: Properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet Res*, 39, 19.
- Benestad, S. L., Mitchell, G., Simmons, M., Ytrehus, B. & Vikoren, T. 2016. First case of chronic wasting disease in europe in a norwegian free-ranging reindeer. *Vet Res*, 47, 88.
- Benilova, I., Karran, E. & De Strooper, B. 2012. The toxic abeta oligomer and alzheimer's disease: An emperor in need of clothes. *Nat Neurosci*, 15, 349-57.
- Berrow, N. S., Alderton, D., Sainsbury, S., Nettleship, J., Assenberg, R., et al. 2007. A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. *Nucleic Acids Res*, 35, e45.
- Bessen, R. A., Kocisko, D. A., Raymond, G. J., Nandan, S., Lansbury, P. T., et al. 1995. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature*, 375, 698-700.
- Bessen, R. A. & Marsh, R. F. 1992a. Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol*, 66, 2096-101.
- Bessen, R. A. & Marsh, R. F. 1992b. Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *J Gen Virol*, 73 (Pt 2), 329-34.
- Bessen, R. A. & Marsh, R. F. 1994. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol*, 68, 7859-68.
- Biasini, E., Turnbaugh, J. A., Unterberger, U. & Harris, D. A. 2012. Prion protein at the crossroads of physiology and disease. *Trends Neurosci*, 35, 92-103.
- Billeter, M., Riek, R., Wider, G., Hornemann, S., Glockshuber, R., et al. 1997. Prion protein nmr structure and species barrier for prion diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 7281-5.
- Bishop, M. F. & Ferrone, F. A. 1984. Kinetics of nucleation-controlled polymerization. A perturbation treatment for use with a secondary pathway. *Biophys J*, 46(5), 631-44.
- Boellaard, J. W. & Schlote, W. 1980. [subacute spongiform encephalopathy with multiform plaque formation. "Peculiar familial-hereditary disease of cns [spinocerebellar atrophy with dementia, plaques, and plaque-like deposits in cerebellum and cerebrum" (gerstmann, straussler, scheinker)] (author's transl)]. *Acta Neuropathol*, 49, 205-12.
- Bolton, D. C., Mckinley, M. P. & Prusiner, S. B. 1982. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, 218, 1309-11.
- Bonda, D. J., Manjila, S., Mehndiratta, P., Khan, F., Miller, B. R., et al. 2016. Human prion diseases: Surgical lessons learned from iatrogenic prion transmission. *Neurosurg Focus*, 41, E10.
- Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., et al. 1996. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature*, 379, 339-43.
- Brandner, S. & Jaunmuktane, Z. 2017. Prion disease: Experimental models and reality. *Acta Neuropathol*, 133, 197-222.
- Brazier, M. W., Volitakis, I., Kvasnicka, M., White, A. R., Underwood, J. R., et al. 2010. Manganese chelation therapy extends survival in a mouse model of m1000 prion disease. *J Neurochem*, 114, 440-51.
- Bremer, J., Baumann, F., Tiberi, C., Wessig, C., Fischer, H., et al. 2010. Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat Neurosci*, 13, 310-8.
- Brown, P., Brandel, J. P., Sato, T., Nakamura, Y., Mackenzie, J., et al. 2012. Iatrogenic creutzfeldt-jakob disease, final assessment. *Emerg Infect Dis*, 18, 901-7.

- Brown, P., Rodgers-Johnson, P., Cathala, F., Gibbs, C. & Gajdusek, C. 1984. Creutzfeldt-jakob disease of long duration: Clinicopathological characteristics, transmissibility and differential diagnosis. *Ann Neurol*, 16(3), 295-304.
- Bruce, M. E. 2003. Tse strain variation. *Br Med Bull*, 66, 99-108.
- Bruce, M. E. & Fraser, H. 1991. Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol*, 172, 125-38.
- Budka, H., Aguzzi, A., Brown, P., Brucher, J. M., Bugiani, O., et al. 1995. Neuropathological diagnostic criteria for creutzfeldt-jakob disease (cjd) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathol*, 5, 459-66.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., et al. 1993. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, 73, 1339-47.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., et al. 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, 356, 577-82.
- Bueler, H., Raeber, A., Sailer, A., Fischer, M., Aguzzi, A., et al. 1994. High prion and PrP^{Sc} levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol Med*, 1, 19-30.
- Burke, C., Walsh, D., Steele, A., Agrimi, U., Di Bari, M. A., et al. 2019. Full restoration of specific infectivity and strain properties from pure mammalian prion protein. *PLoS Pathog*, 15, e1007662.
- Cali, I., Miller, C. J., Parisi, J. E., Geschwind, M. D., Gambetti, P., et al. 2015. Distinct pathological phenotypes of creutzfeldt-jakob disease in recipients of prion-contaminated growth hormone. *Acta Neuropathol Commun*, 3, 37.
- Calzolari, L., Lysek, D. A., Perez, D. R., Guntert, P. & Wuthrich, K. 2005. Prion protein nmr structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 651-5.
- Carlson, G. A., Goodman, P. A., Lovett, M., Taylor, B. A., Marshall, S. T., et al. 1988. Genetics and polymorphism of the mouse prion gene complex: Control of scrapie incubation time. *Mol Cell Biol*, 8, 5528-40.
- Carlson, G. A., Kingsbury, D. T., Goodman, P. A., Coleman, S., Marshall, S. T., et al. 1986. Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes. *Cell*, 46, 503-11.
- Cashman, N. R., Loertscher, R., Nalbantoglu, J., Shaw, I., Kascsak, R. J., et al. 1990. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell*, 61, 185-92.
- Castellani, R. J., Lee, H. G., Siedlak, S. L., Nunomura, A., Hayashi, T., et al. 2009. Reexamining alzheimer's disease: Evidence for a protective role for amyloid-beta protein precursor and amyloid-beta. *J Alzheimers Dis*, 18, 447-52.
- Castilla, J., Gonzalez-Romero, D., Saa, P., Morales, R., De Castro, J., et al. 2008. Crossing the species barrier by PrP(sc) replication in vitro generates unique infectious prions. *Cell*, 134, 757-68.
- Castilla, J., Saa, P., Hetz, C. & Soto, C. 2005. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*, 121, 195-206.
- Caughey, B., Baron, G. S., Chesebro, B. & Jeffrey, M. 2009. Getting a grip on prions: Oligomers, amyloids, and pathological membrane interactions. *Annu Rev Biochem*, 78, 177-204.
- Caughey, B. & Lansbury, P. T. 2003. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: Separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci*, 26, 267-98.
- Caughey, B., Race, R. E., Ernst, D., Buchmeier, M. J. & Chesebro, B. 1989. Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol*, 63, 175-81.
- Caughey, B. & Raymond, G. J. 1993. Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol*, 67, 643-50.
- Caughey, B., Raymond, G. J. & Bessen, R. A. 1998a. Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J Biol Chem*, 273, 32230-5.
- Caughey, B. W., Dong, A., Bhat, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F., et al. 1991. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 30, 7672-80.

- Caughey, W. S., Raymond, L. D., Horiuchi, M. & Caughey, B. 1998b. Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 12117-22.
- Ceroni, M. 1990. Structure of scrapie-associated protein and its relation to infectivity. *J Am Vet Med Assoc*, 196, 1684-5.
- Chandler, R. L. 1961. Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet*, 1, 1378-9.
- Chandler, R. L. & Fisher, J. 1963. Experimental transmission of scrapie to rats. *Lancet*, 2, 1165.
- Charco, J. M. 2018. *Desarrollo de un nuevo sistema de cribado masivo basado en la propagación in vitro de priones recombinantes infecciosos para la detección de compuestos con actividad anti-priónica.*, Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibersitatea.
- Charco, J. M., Erana, H., Venegas, V., Garcia-Martinez, S., Lopez-Moreno, R., et al. 2017. Recombinant PrP and its contribution to research on transmissible spongiform encephalopathies. *Pathogens*, 6.
- Chesebro, B., Race, B., Meade-White, K., Lacasse, R., Race, R., et al. 2010. Fatal transmissible amyloid encephalopathy: A new type of prion disease associated with lack of prion protein membrane anchoring. *PLoS Pathog*, 6, e1000800.
- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., et al. 1985. Identification of scrapie prion protein-specific mrna in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*, 315, 331-3.
- Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., et al. 2005. Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science*, 308, 1435-9.
- Cobb, N. J., Sonnichsen, F. D., Mchaourab, H. & Surewicz, W. K. 2007. Molecular architecture of human prion protein amyloid: A parallel, in-register beta-structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 18946-51.
- Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. 1998. Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biochem*, 67, 793-819.
- Colby, D. W. & Prusiner, S. B. 2011. De novo generation of prion strains. *Nat Rev Microbiol*, 9, 771-7.
- Collinge, J. 2001. Prion diseases of humans and animals: Their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci*, 24, 519-50.
- Collinge, J. & Clarke, A. R. 2007. A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science*, 318, 930-6.
- Collinge, J., Whittington, M. A., Sidle, K. C., Smith, C. J., Palmer, M. S., et al. 1994. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*, 370, 295-7.
- Cosseddu, G. M., Nonno, R., Vaccari, G., Bucalossi, C., Fernandez-Borges, N., et al. 2011. Ultra-efficient PrP(sc) amplification highlights potentialities and pitfalls of pmca technology. *PLoS Pathog*, 7, e1002370.
- Cracco, L., Appleby, B. S. & Gambetti, P. 2018. Fatal familial insomnia and sporadic fatal insomnia. *Handb Clin Neurol*, 153, 271-299.
- Creutzfeldt, H. 1920. Über eine eigenartige herdförmige erkrankung des zentralnervensystems. *Z Gesamte Neurol Psychiatr*, 57, 1-19.
- Cronier, S., Gros, N., Tattum, M. H., Jackson, G. S., Clarke, A. R., et al. 2008. Detection and characterization of proteinase k-sensitive disease-related prion protein with thermolysin. *Biochem J*, 416, 297-305.
- Cuille, J. & Chelle, P. 1936. La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *CR Acad Sci*, 203, 1552-1554.
- Dearmond, S. J., Qiu, Y., Sanchez, H., Spilman, P. R., Ninchak-Casey, A., et al. 1999. Prpc glycoform heterogeneity as a function of brain region: Implications for selective targeting of neurons by prion strains. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58, 1000-9.
- Defaweux, V., Dorban, G., Demonceau, C., Piret, J., Jolais, O., et al. 2005. Interfaces between dendritic cells, other immune cells, and nerve fibres in mouse peyer's patches: Potential sites for neuroinvasion in prion diseases. *Microc Res Tech*, 66, 1-9.

- Deleault, N. R., Harris, B. T., Rees, J. R. & Supattapone, S. 2007. Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 9741-6.
- Deleault, N. R., Kascsak, R., Geoghegan, J. C. & Supattapone, S. 2010. Species-dependent differences in cofactor utilization for formation of the protease-resistant prion protein in vitro. *Biochemistry*, 49, 3928-34.
- Deleault, N. R., Lucassen, R. W. & Supattapone, S. 2003. Rna molecules stimulate prion protein conversion. *Nature*, 425, 717-20.
- Deleault, N. R., Piro, J. R., Walsh, D. J., Wang, F., Ma, J., et al. 2012a. Isolation of phosphatidylethanolamine as a solitary cofactor for prion formation in the absence of nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 8546-51.
- Deleault, N. R., Walsh, D. J., Piro, J. R., Wang, F., Wang, X., et al. 2012b. Cofactor molecules maintain infectious conformation and restrict strain properties in purified prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, E1938-46.
- Demarco, M. L. & Daggett, V. 2004. From conversion to aggregation: Protofibril formation of the prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2293-8.
- Di Bari, M. A., Nonno, R., Castilla, J., D'agostino, C., Pirisinu, L., et al. 2013. Chronic wasting disease in bank voles: Characterisation of the shortest incubation time model for prion diseases. *PLoS Pathog*, 9, e1003219.
- Diaz-Espinoza, R. & Soto, C. 2012. High-resolution structure of infectious prion protein: The final frontier. *Nat Struct Mol Biol*, 19, 370-7.
- Dickinson, A. G. 1976. Scrapie in sheep and goats. *Front Biol*, 44, 209-41.
- Dickinson, A. G. & Mackay, J. M. 1964. Genetical control of the incubation period in mice of the neurological disease, scrapie. *Heredity (Edinb)*, 19, 279-88.
- Dickinson, A. G., Meikle, V. M. & Fraser, H. 1968. Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *J Comp Pathol*, 78, 293-9.
- Donaldson, D. S., Kobayashi, A., Ohno, H., Yagita, H., Williams, I. R., et al. 2012. M cell-depletion blocks oral prion disease pathogenesis. *Mucosal Immunol*, 5, 216-25.
- Dossena, S., Imeri, L., Mangieri, M., Garofoli, A., Ferrari, L., et al. 2008. Mutant prion protein expression causes motor and memory deficits and abnormal sleep patterns in a transgenic mouse model. *Neuron*, 60, 598-609.
- Doumic, M., Fellner, K., Mezache, M. & Rezaei, H. 2019. A bi-monomeric, nonlinear becker-doring-type system to capture oscillatory aggregation kinetics in prion dynamics. *J Theor Biol*, 480, 241-261.
- Downing, D. T. & Lazo, N. D. 1999. Molecular modelling indicates that the pathological conformations of prion proteins might be beta-helical. *Biochem J*, 343 Pt 2, 453-60.
- Duffy, P., Wolf, J., Collins, G., Devoe, A. G., Streeten, B., et al. 1974. Letter: Possible person-to-person transmission of creutzfeldt-jakob disease. *N Engl J Med*, 290, 692-3.
- Eanes, E. & Glenner, G. 1968. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J Histochem Cytochem.*, 16, 673-677.
- Edgeworth, J. A., Gros, N., Alden, J., Joiner, S., Wadsworth, J. D., et al. 2010. Spontaneous generation of mammalian prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 14402-6.
- Edgeworth, J. A., Jackson, G. S., Clarke, A. R., Weissmann, C. & Collinge, J. 2009. Highly sensitive, quantitative cell-based assay for prions adsorbed to solid surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 3479-83.
- Eigen, M. 1971. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften*, 58(10), 465-523.
- Eigen, M. 1996. Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys Chem*, 63, A1-18.
- Eisenberg, D. S. & Sawaya, M. R. 2017. Structural studies of amyloid proteins at the molecular level. *Annu Rev Biochem*, 86, 69-95.
- El Hachimi, K. H., Chaunu, M. P., Cervenakova, L., Brown, P. & Foncin, J. F. 1997. Putative neurosurgical transmission of creutzfeldt-jakob disease with analysis of donor and recipient: Agent strains. *C R Acad Sci III*, 320, 319-28.

- Erana, H. 2019. The prion 2018 round tables (ii): Abeta, tau, alpha-synuclein... Are they prions, prion-like proteins, or what? *Prion*, 13, 41-45.
- Erana, H., Charco, J. M., Di Bari, M. A., Diaz-Dominguez, C. M., Lopez-Moreno, R., et al. 2019. Development of a new largely scalable in vitro prion propagation method for the production of infectious recombinant prions for high resolution structural studies. *PLoS Pathog*, 15, e1008117.
- Erana, H., Charco, J. M., Gonzalez-Miranda, E., Garcia-Martinez, S., Lopez-Moreno, R., et al. 2020a. Detection of pathognomonic biomarker PrP(sc) and the contribution of cell free-amplification techniques to the diagnosis of prion diseases. *Biomolecules*, 10.
- Erana, H., Fernandez-Borges, N., Elezgarai, S. R., Harrathi, C., Charco, J. M., et al. 2017. In vitro approach to identify key amino acids in low susceptibility of rabbit prion protein to misfolding. *J Virol*, 91.
- Erana, H., Perez-Castro, M. A., Garcia-Martinez, S., Charco, J. M., Lopez-Moreno, R., et al. 2020b. A novel, reliable and highly versatile method to evaluate different prion decontamination procedures. *Front Bioeng Biotechnol*, 8, 589182.
- Espana, C., Gajdusek, C., Gibbs, C., Osburn, B., Gribble, D., et al. 1975. Transmission of creutzfeldt-jakob disease to the stump-tail macaque (*Macaca arctoides*). *Proc Soc Exp Biol Med*, 149(3), 723-4.
- Espargaro, A., Busquets, M. A., Estelrich, J. & Sabate, R. 2015. Amyloids in solid-state nuclear magnetic resonance: Potential causes of the usually low resolution. *Int J Nanomedicine*, 10, 6975-83.
- Espinosa, J. C., Nonno, R., Di Bari, M., Aguilar-Calvo, P., Pirisinu, L., et al. 2016. PrP^C governs susceptibility to prion strains in bank vole, while other host factors modulate strain features. *J Virol*, 90, 10660-10669.
- Fernandez-Borges, N. & Castilla, J. 2010. Pmca. A decade of in vitro prion replication. *Current Chemical Biology*, 4, 200-207.
- Fernandez-Borges, N., De Castro, J. & Castilla, J. 2009. In vitro studies of the transmission barrier. *Prion*, 3, 220-3.
- Fernandez-Borges, N., Di Bari, M. A., Erana, H., Sanchez-Martin, M., Pirisinu, L., et al. 2017a. Cofactors influence the biological properties of infectious recombinant prions. *Acta Neuropathol*.
- Fernandez-Borges, N., Erana, H., Elezgarai, S. R., Harrathi, C., Venegas, V., et al. 2017b. A quick method to evaluate the effect of the amino acid sequence in the misfolding proneness of the prion protein. *Methods Mol Biol*, 1658, 205-216.
- Fernandez-Borges, N., Parra, B., Vidal, E., Erana, H., Sanchez-Martin, M. A., et al. 2017c. Unraveling the key to the resistance of canids to prion diseases. *PLoS Pathog*, 13, e1006716.
- Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., et al. 2004. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 9683-8.
- Flechsig, E., Hegyi, I., Enari, M., Schwarz, P., Collinge, J., et al. 2001. Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions. *Mol Med*, 7, 679-84.
- Flint, E. B. & Suslick, K. S. 1991. The temperature of cavitation *Science*, 253(5026), 1397-9.
- Fox, K. A., Jewell, J. E., Williams, E. S. & Miller, M. W. 2006. Patterns of PrP^{CWD} accumulation during the course of chronic wasting disease infection in orally inoculated mule deer (*Odocoileus hemionus*). *J Gen Virol*, 87, 3451-61.
- Fraser, H. 1982. Neuronal spread of scrapie agent and targeting of lesions within the retino-tectal pathway. *Nature*, 295, 149-50.
- Fraser, H. & Bruce, M. 1973. Argyrophilic plaques in mice inoculated with scrapie from particular sources. *Lancet*, 1, 617-8.
- Fraser, H. & Dickinson, A. G. 1970. Pathogenesis of scrapie in the mouse: The role of the spleen. *Nature*, 226, 462-3.
- Gabizon, R., Mckinley, M. P. & Prusiner, S. B. 1987. Purified prion proteins and scrapie infectivity copartition into liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 4017-21.
- Gajdusek, C., Gibbs, C. & Alpers, M. 1966. Experimental transmission of kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature*, 209, 794-796.

- Gajdusek, C., Gibbs, C., Asher, D. & David, E. 1968. Transmission of experimental kuru to the spider monkey (*ateles geoffreyi*). *Science*, 162(3854), 693-4.
- Gajdusek, C. & Zigas, V. 1957. Degenerative disease of the central nervous system in new guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population *N Engl J Med*, 257(20), 974-8.
- Gajdusek, C. & Zigas, V. 1961. Studies on kuru. I. The ethnologic setting of kuru *Am J Trop Med Hyg*, 10, 80-91.
- Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J., Jr. & Alpers, M. 1967. Transmission and passage of experimental "kuru" to chimpanzees. *Science*, 155, 212-4.
- Gambetti, P., Dong, Z., Yuan, J., Xiao, X., Zheng, M., et al. 2008. A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Ann Neurol*, 63, 697-708.
- Gauczynski, S., Krasemann, S., Bodemer, W. & Weiss, S. 2002. Recombinant human prion protein mutants huPrP d178n/m129 (ffi) and huPrP+9OR (fCJD) reveal proteinase k resistance. *J Cell Sci*, 115, 4025-36.
- Ghergariu, S. 1991. Some problems of diagnosis of the spongiform encephalopathies in ruminants. *Eur J Epidemiol*, 7, 526-31.
- Gibbs, C. J., Jr. 1967. Search for infectious etiology in chronic and subacute degenerative diseases of the central nervous system. *Curr Top Microbiol Immunol*, 40, 44-58.
- Gibbs, C. J., Jr. & Gajdusek, D. C. 1972. Transmission of scrapie to the cynomolgus monkey (*macaca fascicularis*). *Nature*, 236, 73-4.
- Gibbs, C. J., Jr., Gajdusek, D. C., Asher, D. M., Alpers, M. P., Beck, E., et al. 1968. Creutzfeldt-jakob disease (spongiform encephalopathy): Transmission to the chimpanzee. *Science*, 161, 388-9.
- Giles, K., Woerman, A. L., Berry, D. B. & Prusiner, S. B. 2017. Bioassays and inactivation of prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9.
- Gill, A. C. & Castle, A. R. 2018. The cellular and pathologic prion protein. *Handb Clin Neurol*, 153, 21-44.
- Glatzel, M., Heppner, F. L., Albers, K. M. & Aguzzi, A. 2001. Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. *Neuron*, 31, 25-34.
- Goldfarb, L. G., Brown, P., McComb, W. R., Goldgaber, D., Swergold, G. D., et al. 1991. Transmissible familial creutzfeldt-jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the prnp gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 10926-30.
- Goldfarb, L. G., Petersen, R. B., Tabaton, M., Brown, P., Leblanc, A. C., et al. 1992. Fatal familial insomnia and familial creutzfeldt-jakob disease: Disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science*, 258, 806-8.
- Goldgaber, D., Goldfarb, L. G., Brown, P., Asher, D. M., Brown, W. T., et al. 1989. Mutations in familial creutzfeldt-jakob disease and gerstmann-straussler-scheinker's syndrome. *Exp Neurol*, 106, 204-6.
- Goldmann, W. 1993. Prp gene and its association with spongiform encephalopathies. *Br Med Bull*, 49, 839-59.
- Goldmann, W. 2008. Prp genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Vet Res*, 39, 30.
- Goldmann, W., Hunter, N., Smith, G., Foster, J. & Hope, J. 1994. Prp genotype and agent effects in scrapie: Change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J Gen Virol*, 75 (Pt 5), 989-95.
- Gomori, A. J., Partnow, M. J., Horoupian, D. S. & Hirano, A. 1973. The ataxic form of creutzfeldt-jakob disease. *Arch Neurol*, 29(5), 318-23.
- González-Miranda, E. 2020. *Adaptación de un sistema de propagación de priones in vitro para el cribado masivo de compuestos específicos frente a las encefalopatías espongiiformes transmisibles humanas*. Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibersitatea.
- Gonzalez-Montalban, N., Makarava, N., Ostapchenko, V. G., Savtchenk, R., Alexeeva, I., et al. 2011. Highly efficient protein misfolding cyclic amplification. *PLoS Pathog*, 7, e1001277.
- Gordon, W. S. 1946. Advances in veterinary research. *Vet Rec*, 58, 516-25.

- Gossert, A. D., Bonjour, S., Lysek, D. A., Fiorito, F. & Wuthrich, K. 2005. Prion protein nmr structures of elk and of mouse/elk hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 646-50.
- Green, K. M., Castilla, J., Seward, T. S., Napier, D. L., Jewell, J. E., et al. 2008. Accelerated high fidelity prion amplification within and across prion species barriers. *PLoS Pathog*, 4, e1000139.
- Greig, J. R. 1950. Scrapie in sheep. *J Comp Pathol*, 60, 263-6.
- Griffith, J. S. 1967. Self-replication and scrapie. *Nature*, 215, 1043-4.
- Groveman, B. R., Dolan, M. A., Taubner, L. M., Kraus, A., Wickner, R. B., et al. 2014. Parallel in-register intermolecular beta-sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids. *J Biol Chem*, 289, 24129-42.
- Groveman, B. R., Raymond, G. J., Campbell, K. J., Race, B., Raymond, L. D., et al. 2017. Role of the central lysine cluster and scrapie templating in the transmissibility of synthetic prion protein aggregates. *PLoS Pathog*, 13, e1006623.
- Hadlow, W. J. 1959. Scrapie and kuru. *Lancet*, 2, 289-290.
- Hadlow, W. J. 2008. Kuru likened to scrapie: The story remembered. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363, 3644.
- Haigh, C. L., Tumpach, C., Drew, S. C. & Collins, S. J. 2015. The prion protein n1 and n2 cleavage fragments bind to phosphatidylserine and phosphatidic acid; relevance to stress-protection responses. *PLoS One*, 10, e0134680.
- Halliday, M., Radford, H. & Mallucci, G. R. 2014. Prions: Generation and spread versus neurotoxicity. *J Biol Chem*, 289, 19862-8.
- Hannaoui, S., Maatouk, L., Privat, N., Levavasseur, E., Faucheux, B. A., et al. 2013. Prion propagation and toxicity occur in vitro with two-phase kinetics specific to strain and neuronal type. *J Virol*, 87, 2535-48.
- Hartsough, G. R. & Burger, D. 1965. Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis*, 115(4), 387-92.
- Heikenwalder, M., Julius, C. & Aguzzi, A. 2007. Prions and peripheral nerves: A deadly rendezvous. *J Neurosci Res*, 85, 2714-25.
- Heller, U., Winklhofer, K. F., Heske, J., Reintjes, A. & Tatzelt, J. 2003. Post-translational import of the prion protein into the endoplasmic reticulum interferes with cell viability: A critical role for the putative transmembrane domain. *J Biol Chem*, 278, 36139-47.
- Heppner, F. L., Christ, A. D., Klein, M. A., Prinz, M., Fried, M., et al. 2001. Transepithelial prion transport by m cells. *Nat Med*, 7, 976-7.
- Hill, A. F., Antoniou, M. & Collinge, J. 1999. Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *J Gen Virol*, 80 (Pt 1), 11-4.
- Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., et al. 1997. The same prion strain causes vscj and bse. *Nature*, 389, 448-50, 526.
- Hill, A. F., Joiner, S., Linehan, J., Desbruslais, M., Lantos, P. L., et al. 2000. Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 10248-53.
- Hill, A. F., Joiner, S., Wadsworth, J. D., Sidle, K. C., Bell, J. E., et al. 2003. Molecular classification of sporadic creutzfeldt-jakob disease. *Brain*, 126, 1333-46.
- Hilton, D. A. 2006. Pathogenesis and prevalence of variant creutzfeldt-jakob disease. *J Pathol*, 208, 134-41.
- Hirschberger, T., Stork, M., Schropp, B., Winklhofer, K. F., Tatzelt, J., et al. 2006. Structural instability of the prion protein upon m205s/r mutations revealed by molecular dynamics simulations. *Biophys J*, 90, 3908-18.
- Horiuchi, M., Priola, S. A., Chabry, J. & Caughey, B. 2000. Interactions between heterologous forms of prion protein: Binding, inhibition of conversion, and species barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5836-41.
- Hsiao, K., Baker, H. F., Crow, T. J., Poulter, M., Owen, F., et al. 1989. Linkage of a prion protein missense variant to gerstmann-straussler syndrome. *Nature*, 338, 342-5.

- Hsiao, K., Scott, M., Foster, D., Dearmond, S. J., Groth, D., et al. 1991. Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with prion protein codon 101 proline----leucine substitution. *Ann N Y Acad Sci*, 640, 166-70.
- Huang, F. P., Farquhar, C. F., Mabbott, N. A., Bruce, M. E. & Macpherson, G. G. 2002. Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(sc) from the gut. *J Gen Virol*, 83, 267-71.
- Hunter, G. D. & Millson, G. C. 1967. Attempts to release the scrapie agent from tissue debris. *J Comp Pathol*, 77, 301-7.
- Huor, A., Espinosa, J. C., Vidal, E., Cassard, H., Douet, J. Y., et al. 2019. The emergence of classical bse from atypical/nor98 scrapie. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Igel-Egalon, A., Beringue, V., Rezaei, H. & Sibille, P. 2018. Prion strains and transmission barrier phenomena. *Pathogens*, 7.
- Igel-Egalon, A., Bohl, J., Moudjou, M., Herzog, L., Reine, F., et al. 2019. Heterogeneity and architecture of pathological prion protein assemblies: Time to revisit the molecular basis of the prion replication process? *Viruses*, 11.
- Imran, M. & Mahmood, S. 2011. An overview of human prion diseases. *Virology*, 8, 559.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of escherichia coli with plasmids. *Gene*, 96, 23-8.
- Ironside, J. W., Ritchie, D. L. & Head, M. W. 2017. Prion diseases. *Handb Clin Neurol*, 145, 393-403.
- Jakob, A. 1921. Über eigenartige erkrankungen des zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde. (spastische pseudosklerose-encephalomyelopathie mit disseminierten degenerationsherden). *Z Gesamte Neurol Psychiatr.*, 64, 147-228.
- Jarrett, J. T. & Lansbury, P. T., Jr. 1993. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: A pathogenic mechanism in alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, 73, 1055-8.
- Jeffrey, M., Martin, S., Gonzalez, L., Foster, J., Langeveld, J. P., et al. 2006. Immunohistochemical features of PrP(d) accumulation in natural and experimental goat transmissible spongiform encephalopathies. *J Comp Pathol*, 134, 171-81.
- Jeong, B. H. & Kim, Y. S. 2014. Genetic studies in human prion diseases. *J Korean Med Sci*, 29, 623-32.
- John, T. R., Schatzl, H. M. & Gilch, S. 2013. Early detection of chronic wasting disease prions in urine of pre-symptomatic deer by real-time quaking-induced conversion assay. *Prion*, 7, 253-8.
- Johnson, C. J., Aiken, J. M., Mckenzie, D., Samuel, M. D. & Pedersen, J. A. 2012. Highly efficient amplification of chronic wasting disease agent by protein misfolding cyclic amplification with beads (pmcab). *PLoS One*, 7, e35383.
- Johnson, R. T. 1974. Slow infections of the nervous system and the subacute spongiform encephalopathies. *Adv Neurol*, 6, 69-75.
- Jones, E. M. & Surewicz, W. K. 2005. Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids. *Cell*, 121, 63-72.
- Joseph, J., Maji, S. K. & Padinhateeri, R. 2020. Computational model for studying breakage-dependent amyloid growth. *ACS Chem Neurosci*, 11, 3615-3622.
- Kelly, J. W. 1998. The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways *Curr Opin Struct Biol*, 8(1), 101-6.
- Kim, J. I., Cali, I., Surewicz, K., Kong, Q., Raymond, G. J., et al. 2010. Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors. *J Biol Chem*, 285, 14083-7.
- Kim, M. O., Takada, L. T., Wong, K., Forner, S. A. & Geschwind, M. D. 2018. Genetic PrP prion diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10.
- Kimberlin, R. H., Field, H. J. & Walker, C. A. 1983. Pathogenesis of mouse scrapie: Evidence for spread of infection from central to peripheral nervous system. *J Gen Virol*, 64 Pt 3, 713-6.
- Kimberlin, R. H. & Walker, C. 1977. Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster. *J Gen Virol*, 34, 295-304.
- Kimberlin, R. H. & Walker, C. A. 1978. Pathogenesis of mouse scrapie: Effect of route of inoculation on infectivity titres and dose-response curves. *J Comp Pathol*, 88, 39-47.

- Kimberlin, R. H. & Walker, C. A. 1979. Pathogenesis of mouse scrapie: Dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes. *J Comp Pathol*, 89, 551-62.
- Kirkwood, J. K., Wells, G. A., Wilesmith, J. W., Cunningham, A. A. & Jackson, S. I. 1990. Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*oryx leucoryx*) and a greater kudu (*tragelaphus strepsiceros*). *Vet Rec*, 127, 418-20.
- Kitamoto, T., Muramoto, T., Mohri, S., Doh-Ura, K. & Tateishi, J. 1991. Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with creutzfeldt-jakob disease. *J Virol*, 65, 6292-5.
- Klatzo, I., Gajdusek, D. C. & Zigas, V. 1959. Pathology of kuru. *Lab Invest*, 8, 799-847.
- Klohn, P. C., Stoltze, L., Flechsig, E., Enari, M. & Weissmann, C. 2003. A quantitative, highly sensitive cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 11666-71.
- Kobayashi, A., Matsuura, Y., Mohri, S. & Kitamoto, T. 2014. Distinct origins of dura mater graft cjd. *Acta Neuropathol Commun*, 2:32.
- Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. A., Chesebro, B., Raymond, G. J., et al. 1994. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature*, 370, 471-4.
- Kocisko, D. A., Priola, S. A., Raymond, G. J., Chesebro, B., Lansbury, P. T., Jr., et al. 1995. Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: A model for the scrapie species barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 3923-7.
- Kovalchuk Ben-Zaken, O., Nissan, I., Tzaban, S., Taraboulos, A., Zcharia, E., et al. 2015. Transgenic over-expression of mammalian heparanase delays prion disease onset and progression. *Biochem Biophys Res Commun*, 464, 698-704.
- Krakauer, D. C., Pagel, M., Southwood, T. R. & Zanotto, P. M. 1996. Phylogenesis of prion protein. *Nature*, 380, 675.
- Kraus, A., Groveman, B. R. & Caughey, B. 2013. Prions and the potential transmissibility of protein misfolding diseases. *Annu Rev Microbiol*, 67, 543-64.
- Kraus, A., Hoyt, F., Schwartz, C. L., Hansen, B., Hughson, A. G., et al. 2021. Structure of an infectious mammalian prion. *bioRxiv (pre-print server)*.
- Krauss, S. & Vorberg, I. 2013. Prions ex vivo: What cell culture models tell us about infectious proteins. *Int J Cell Biol*, 2013, 704546.
- Kristiansen, M., Messenger, M. J., Klohn, P. C., Brandner, S., Wadsworth, J. D., et al. 2005. Disease-related prion protein forms aggregates in neuronal cells leading to caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem*, 280, 38851-61.
- Krstic, D. & Knuesel, I. 2013. The airbag problem-a potential culprit for bench-to bedside translational efforts: Relevance for alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*, 1, 62.
- Kujala, P., Raymond, C. R., Romeijn, M., Godsave, S. F., Van Kasteren, S. I., et al. 2011. Prion uptake in the gut: Identification of the first uptake and replication sites. *PLoS Pathog*, 7, e1002449.
- Kurt, T. D., Perrott, M. R., Wilusz, C. J., Wilusz, J., Supattapone, S., et al. 2007. Efficient in vitro amplification of chronic wasting disease PrPres. *J Virol*, 81, 9605-8.
- Ladner-Keay, C. L., Griffith, B. J. & Wishart, D. S. 2014. Shaking alone induces de novo conversion of recombinant prion proteins to beta-sheet rich oligomers and fibrils. *PLoS One*, 9, e98753.
- Lampert, P. W., Gajdusek, D. C. & Gibbs, C. J., Jr. 1972. Subacute spongiform virus encephalopathies. Scrapie, kuru and creutzfeldt-jakob disease: A review. *Am J Pathol*, 68, 626-52.
- Lancaster, A. K., Bardill, J. P., True, H. L. & Masel, J. 2010. The spontaneous appearance rate of the yeast prion [psi+] and its implications for the evolution of the evolvability properties of the [psi+] system. *Genetics*, 184, 393-400.
- Lanska, D. J. 2017. Etymologia: Creutzfeldt-jakob disease. *Emerg Infect Dis*, 23(10), 1760-1761.
- Lasmezas, C. I., Cesbron, J. Y., Deslys, J. P., Demaimay, R., Adjou, K. T., et al. 1996. Immune system-dependent and -independent replication of the scrapie agent. *J Virol*, 70, 1292-5.
- Latarjet, R., Muel, B., Haig, D. A., Clarke, M. C. & Alper, T. 1970. Inactivation of the scrapie agent by near monochromatic ultraviolet light. *Nature*, 227, 1341-3.

- Laude, H., Vilette, D., Le Dur, A., Archer, F. & Soulier, S. 2002. New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: Development and perspectives. *Comptes Rendus Biologies*, 325, 49-57.
- Le Dur, A., Beringue, V., Andreoletti, O., Reine, F., Lai, T. L., et al. 2005. A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 16031-6.
- Lee, I. Y., Westaway, D., Smit, A. F., Wang, K., Seto, J., et al. 1998. Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Res*, 8, 1022-37.
- Legname, G., Baskakov, I. V., Nguyen, H. O., Riesner, D., Cohen, F. E., et al. 2004. Synthetic mammalian prions. *Science*, 305, 673-6.
- Legname, G., Nguyen, H. O., Baskakov, I. V., Cohen, F. E., Dearmond, S. J., et al. 2005. Strain-specified characteristics of mouse synthetic prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 2168-73.
- Lewis, P. A., Properzi, F., Prodromidou, K., Clarke, A. R., Collinge, J., et al. 2006. Removal of the glycosylphosphatidylinositol anchor from PrP(sc) by cathepsin d does not reduce prion infectivity. *Biochem J*, 395, 443-8.
- Li, J., Browning, S., Mahal, S. P., Oelschlegel, A. M. & Weissmann, C. 2010. Darwinian evolution of prions in cell culture. *Science*, 327, 869-72.
- Liberski, P. P. 2012. Historical overview of prion diseases: A view from afar. *Folia Neuropathol*, 50, 1-12.
- Liberski, P. P., Gajos, A., Sikorska, B. & Lindenbaum, S. 2019. Kuru, the first human prion disease. *Viruses*, 11.
- Liu, T., Li, R., Pan, T., Liu, D., Petersen, R. B., et al. 2002. Intercellular transfer of the cellular prion protein. *J Biol Chem*, 277, 47671-8.
- Lloyd, S., Mead, S. & Collinge, J. 2011. Genetics of prion disease. *Top Curr Chem*, 305, 1-22.
- Lowenstein, D. H., Butler, D. A., Westaway, D., Mckinley, M. P., Dearmond, S. J., et al. 1990. Three hamster species with different scrapie incubation times and neuropathological features encode distinct prion proteins. *Mol Cell Biol*, 10, 1153-63.
- Lugaresi, E., Medori, R., Montagna, P., Baruzzi, A., Cortelli, P., et al. 1986. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med*, 315, 997-1003.
- Lugaresi, E., Tobler, I., Gambetti, P. & Montagna, P. 1998. The pathophysiology of fatal familial insomnia. *Brain Pathol*, 8, 521-6.
- Lysek, D. A., Schorn, C., Nivon, L. G., Esteve-Moya, V., Christen, B., et al. 2005. Prion protein nmr structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 640-5.
- Ma, J., Wollmann, R. & Lindquist, S. 2002. Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science*, 298, 1781-5.
- Mabbott, N. A. & Macpherson, G. G. 2006. Prions and their lethal journey to the brain. *Nat Rev Microbiol*, 4, 201-11.
- Magnusson, K., Simon, R., Sjölander, D., Sigurdson, C., Hammarström, P., et al. 2014. Multimodal fluorescence microscopy of prion strain specific PrP deposits stained by thiophene-based amyloid ligands. *Prion*, 8, 319-329.
- Mahal, S. P., Baker, C. A., Demczyk, C. A., Smith, E. W., Julius, C., et al. 2007. Prion strain discrimination in cell culture: The cell panel assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 20908-13.
- Makarava, N. & Baskakov, I. V. 2008. The same primary structure of the prion protein yields two distinct self-propagating states. *J Biol Chem*, 283, 15988-96.
- Makarava, N., Kovacs, G. G., Bocharova, O., Savtchenko, R., Alexeeva, I., et al. 2010. Recombinant prion protein induces a new transmissible prion disease in wild-type animals. *Acta Neuropathol*, 119, 177-87.
- Makarava, N., Kovacs, G. G., Savtchenko, R., Alexeeva, I., Budka, H., et al. 2011. Genesis of mammalian prions: From non-infectious amyloid fibrils to a transmissible prion disease. *PLoS Pathog*, 7, e1002419.

- Makarava, N., Ostapchenko, V. G., Savtchenko, R. & Baskakov, I. V. 2009. Conformational switching within individual amyloid fibrils. *J Biol Chem*, 284, 14386-95.
- Malaga-Trillo, E., Solis, G. P., Schrock, Y., Geiss, C., Luncz, L., et al. 2009. Regulation of embryonic cell adhesion by the prion protein. *PLoS Biol*, 7, e55.
- Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klohn, P. C., Brandner, S., et al. 2003. Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science*, 302, 871-4.
- Mallucci, G. R., White, M. D., Farmer, M., Dickinson, A., Khatun, H., et al. 2007. Targeting cellular prion protein reverses early cognitive deficits and neurophysiological dysfunction in prion-infected mice. *Neuron*, 53, 325-35.
- Manca, M. & Kraus, A. 2020. Defining the protein seeds of neurodegeneration using real-time quaking-induced conversion assays. *Biomolecules*, 10.
- Mark, G., Tauber, A., Laupert, R., Schuchmann, H. P., Schulz, D., et al. 1998. Oh-radical formation by ultrasound in aqueous solution--part ii: Terephthalate and fricke dosimetry and the influence of various conditions on the sonolytic yield. *Ultrason Sonochem*, 5(2), 41-52.
- Marsh, R. F., Bessen, R. A., Lehmann, S. & Hartsough, G. R. 1991. Epidemiological and experimental studies on a new incident of transmissible mink encephalopathy. *J Gen Virol*, 72 (Pt 3), 589-94.
- Marsh, R. F. & Hadlow, W. J. 1992. Transmissible mink encephalopathy. *Rev Sci Tech*, 11, 539-50.
- Martin, R., Gallet, P. F., Rocha, D. & Petit, D. 2009. Polymorphism of the prion protein in mammals: A phylogenetic approach. *Recent Pat DNA Gene Seq*, 3, 63-71.
- Masel, J. & Jansen, V. A. 1999. The kinetics of proteinase k digestion of linear prion polymers. *Proc Biol Sci*, 266, 1927-31.
- Masel, J. & Jansen, V. A. 2001. The measured level of prion infectivity varies in a predictable way according to the aggregation state of the infectious agent. *Biochim Biophys Acta*, 1535, 164-73.
- Masters, C. L., Gajdusek, D. C. & Gibbs, C. J., Jr. 1981. Creutzfeldt-jakob disease virus isolations from the gerstmann-straussler syndrome with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain*, 104, 559-88.
- Mastrianni, J. A., Nixon, R., Layzer, R., Telling, G. C., Han, D., et al. 1999. Prion protein conformation in a patient with sporadic fatal insomnia. *N Engl J Med*, 340, 1630-8.
- Mays, C. E., Titlow, W., Seward, T., Telling, G. C. & Ryou, C. 2009. Enhancement of protein misfolding cyclic amplification by using concentrated cellular prion protein source. *Biochem Biophys Res Commun*, 388, 306-10.
- Mcbride, P. A., Schulz-Schaeffer, W. J., Donaldson, M., Bruce, M., Diringer, H., et al. 2001. Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol*, 75, 9320-7.
- Mcguire, L. I., Poleggi, A., Poggiolini, I., Suardi, S., Grznarova, K., et al. 2016. Cerebrospinal fluid real-time quaking-induced conversion is a robust and reliable test for sporadic creutzfeldt-jakob disease: An international study. *Ann Neurol*, 80, 160-5.
- Mckinley, M. P., Masiarz, F. R., Isaacs, S. T., Hearst, J. E. & Prusiner, S. B. 1983. Resistance of the scrapie agent to inactivation by psoralens. *Photochem Photobiol*, 37, 539-45.
- Mckinley, M. P., Masiarz, F. R. & Prusiner, S. B. 1981. Reversible chemical modification of the scrapie agent. *Science*, 214, 1259-61.
- Medori, R., Montagna, P., Tritschler, H. J., Leblanc, A., Cortelli, P., et al. 1992. Fatal familial insomnia: A second kindred with mutation of prion protein gene at codon 178. *Neurology*, 42, 669-70.
- Meier, P., Genoud, N., Prinz, M., Maissen, M., Rulicke, T., et al. 2003. Soluble dimeric prion protein binds PrP(sc) in vivo and antagonizes prion disease. *Cell*, 113, 49-60.
- Merz, P., Somerville, R., Wisniewski, H., Manuelidis, L. & Manuelidis, E. 1983. Scrapie-associated fibrils in creutzfeldt-jakob disease. *Nature*, 306(5942), 474-476.
- Merz, P. A., Rohwer, R. G., Kascsak, R., Wisniewski, H. M., Somerville, R. A., et al. 1984. Infection-specific particle from the unconventional slow virus diseases. *Science*, 225, 437-40.

- Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M. & Iqbal, K. 1981. Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol*, 54, 63-74.
- Meyerett, C., Michel, B., Pulford, B., Spraker, T. R., Nichols, T. A., et al. 2008. In vitro strain adaptation of cwd prions by serial protein misfolding cyclic amplification. *Virology*, 382, 267-76.
- Minikel, E. V., Vallabh, S. M., Lek, M., Estrada, K., Samocha, K. E., et al. 2016. Quantifying prion disease penetrance using large population control cohorts. *Sci Transl Med*, 8.
- Mishra, R. S., Basu, S., Gu, Y., Luo, X., Zou, W. Q., et al. 2004. Protease-resistant human prion protein and ferritin are cotransported across caco-2 epithelial cells: Implications for species barrier in prion uptake from the intestine. *J Neurosci*, 24, 11280-90.
- Mitteregger, G., Vosko, M., Krebs, B., Xiang, W., Kohlmansperger, V., et al. 2007. The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein. *Brain Pathol*, 17, 174-83.
- Mobley, W. C., Neve, R. L., Prusiner, S. B. & Mckinley, M. P. 1988. Nerve growth factor increases mrna levels for the prion protein and the beta-amyloid protein precursor in developing hamster brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 9811-5.
- Moda, F., Le, T. N., Aulic, S., Bistaffa, E., Campagnani, I., et al. 2015. Synthetic prions with novel strain-specified properties. *PLoS Pathog*, 11, e1005354.
- Moore, R. C., Hope, J., McBride, P. A., Mcconnell, I., Selfridge, J., et al. 1998. Mice with gene targeted prion protein alterations show that prnp, sinc and prni are congruent. *Nat Genet*, 18, 118-25.
- Moore, S. J., Smith, J. D., Greenlee, M. H., Nicholson, E. M., Richt, J. A., et al. 2016. Comparison of two us sheep scrapie isolates supports identification as separate strains. *Vet Pathol*, 53, 1187-1196.
- Morales, R., Abid, K. & Soto, C. 2007. The prion strain phenomenon: Molecular basis and unprecedented features. *Biochim Biophys Acta*, 1772, 681-91.
- Morel, E., Andrieu, T., Casagrande, F., Gauczynski, S., Weiss, S., et al. 2005. Bovine prion is endocytosed by human enterocytes via the 37 kda/67 kda laminin receptor. *Am J Pathol*, 167, 1033-42.
- Mori, T., Atarashi, R., Furukawa, K., Takatsuki, H., Satoh, K., et al. 2016. A direct assessment of human prion adhered to steel wire using real-time quaking-induced conversion. *Sci Rep*, 6, 24993.
- Moser, M., Colello, R. J., Pott, U. & Oesch, B. 1995. Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron*, 14, 509-17.
- Mulcahy, E. R. & Bessen, R. A. 2004. Strain-specific kinetics of prion protein formation in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 279, 1643-9.
- Muller, H., Brener, O., Androletti, O., Piechatzek, T., Willbold, D., et al. 2014. Progress towards structural understanding of infectious sheep PrP-amyloid. *Prion*, 8, 344-58.
- Murayama, Y., Yoshioka, M., Masujin, K., Okada, H., Iwamaru, Y., et al. 2010. Sulfated dextrans enhance in vitro amplification of bovine spongiform encephalopathy PrP(sc) and enable ultrasensitive detection of bovine PrP(sc). *PLoS One*, 5.
- Nevin, S., Mcmenemey, W. H., Behrman, S. & Jones, D. P. 1960. Subacute spongiform encephalopathy. A subacute form of encephalopathy. *Brain*, 83.
- Nicolas, O., Gavin, R. & Del Rio, J. A. 2009. New insights into cellular prion protein (PrP^c) functions: The "ying and yang" of a relevant protein. *Brain Res Rev*, 61, 170-84.
- Nicoll, A. J., Trevitt, C. R., Tattum, M. H., Risse, E., Quarterman, E., et al. 2010. Pharmacological chaperone for the structured domain of human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 17610-5.
- Noble, G. P., Wang, D. W., Walsh, D. J., Barone, J. R., Miller, M. B., et al. 2015. A structural and functional comparison between infectious and non-infectious autocatalytic recombinant PrP conformers. *PLoS Pathog*, 11, e1005017.
- Nonno, R., Di Bari, M. A., Cardone, F., Vaccari, G., Fazzi, P., et al. 2006. Efficient transmission and characterization of creutzfeldt-jakob disease strains in bank voles. *PLoS Pathog*, 2, e12.
- Nosjean, O., Briolay, A. & Roux, B. 1997. Mammalian gpi proteins: Sorting, membrane residence and functions. *Biochim Biophys Acta*, 1331(2), 153-86.

- Notari, S., Capellari, S., Giese, A., Westner, I., Baruzzi, A., et al. 2004. Effects of different experimental conditions on the PrP^{Sc} core generated by protease digestion: Implications for strain typing and molecular classification of cjd. *J Biol Chem*, 279, 16797-804.
- Nystrom, S. & Hammarstrom, P. 2015. Generic amyloidogenicity of mammalian prion proteins from species susceptible and resistant to prions. *Sci Rep*, 5, 10101.
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., Mckinley, M. P., Kent, S. B., et al. 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 40, 735-46.
- Orru, C. D., Bongianni, M., Tonoli, G., Ferrari, S., Hughson, A. G., et al. 2014. A test for creutzfeldt-jakob disease using nasal brushings. *N Engl J Med*, 371, 519-29.
- Otero, A., Hedman, C., Fernandez-Borges, N., Erana, H., Marin, B., et al. 2019. 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*.
- Palmer, M. S., Dryden, A. J., Hughes, J. T. & Collinge, J. 1991. Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic creutzfeldt-jakob disease. *Nature*, 352, 340-2.
- Palmiter, R. D., Chen, H. Y. & Brinster, R. L. 1982. Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell*, 29, 701-710.
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., et al. 1993. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 10962-6.
- Parchi, P., De Boni, L., Saverioni, D., Cohen, M. L., Ferrer, I., et al. 2012. Consensus classification of human prion disease histotypes allows reliable identification of molecular subtypes: An inter-rater study among surveillance centres in europe and USA. *Acta Neuropathol*, 124, 517-29.
- Pattison, I. H. 1965. Resistance of the scrapie agent to formalin. *J Comp Pathol*, 75, 159-64.
- Pattison, I. H. & Millson, G. C. 1961a. Further experimental observations on scrapie. *J Comp Pathol*, 71, 350-9.
- Pattison, I. H. & Millson, G. C. 1961b. Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 71, 101-IN10.
- Pattison, J. 1998. The emergence of bovine spongiform encephalopathy and related diseases. *Emerg Infect Dis*, 4, 390-4.
- Pearson, G. R., Wyatt, J. M., Gruffydd-Jones, T. J., Hope, J., Chong, A., et al. 1992. Feline spongiform encephalopathy: Fibril and PrP studies. *Vet Rec*, 131, 307-10.
- Peden, A. H., Ritchie, D. L. & Ironside, J. W. 2005. Risks of transmission of variant creutzfeldt-jakob disease by blood transfusion. *Folia Neuropathol*, 43, 271-8.
- Perera, W. S. & Hooper, N. M. 2001. Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Curr Biol*, 11, 519-23.
- Peretz, D., Williamson, R. A., Kaneko, A., Vergara, J., Leclerc, E., et al. 2001. Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity *Nature*, 412, 739-743.
- Peretz, D., Williamson, R. A., Matsunaga, Y., Serban, H., Pinilla, C., et al. 1997. A conformational transition at the n terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform. *J Mol Biol*, 273, 614-22.
- Perez, D. R., Damberger, F. F. & Wuthrich, K. 2010. Horse prion protein nmr structure and comparisons with related variants of the mouse prion protein. *J Mol Biol*, 400, 121-8.
- Piconi, G., Peden, A. H., Barria, M. A. & Green, A. J. E. 2019. Epitope mapping of the protease resistant products of rt-quick does not allow the discrimination of scjd subtypes. *PLoS One*, 14, e0218509.
- Piening, N., Nonno, R., Di Bari, M., Walter, S., Windl, O., et al. 2006. Conversion efficiency of bank vole prion protein in vitro is determined by residues 155 and 170, but does not correlate with the high susceptibility of bank voles to sheep scrapie in vivo. *J Biol Chem*, 281, 9373-84.
- Piening, N., Weber, P., Giese, A. & Kretzschmar, H. 2005. Breakage of PrP aggregates is essential for efficient autocatalytic propagation of misfolded prion protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 326, 339-43.
- Pirisinu, L., Tran, L., Chiappini, B., Vanni, I., Di Bari, M. A., et al. 2018. Novel type of chronic wasting disease detected in moose (alces alces), norway. *Emerg Infect Dis*, 24, 2210-2218.

- Plinston, C., Hart, P., Chong, A., Hunter, N., Foster, J., et al. 2011. Increased susceptibility of human-PrP transgenic mice to bovine spongiform encephalopathy infection following passage in sheep. *J Virol*, 85, 1174-81.
- Poggiolini, I., Saverioni, D. & Parchi, P. 2013. Prion protein misfolding, strains, and neurotoxicity: An update from studies on mammalian prions. *Int J Cell Biol*, 2013, 910314.
- Poschel, T., Brilliantov, N. V. & Frommel, C. 2003. Kinetics of prion growth. *Biophys J*, 85, 3460-74.
- Prigent, S. & Rezaei, H. 2011. Prp assemblies: Spotting the responsible regions in prion propagation. *Prion*, 5, 69-75.
- Prinz, M., Heikenwalder, M., Junt, T., Schwarz, P., Glatzel, M., et al. 2003. Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. *Nature*, 425, 957-62.
- Priola, S. A. 2018. Cell biology of prion infection. *Handb Clin Neurol*, 153, 45-68.
- Priola, S. A. & Chesebro, B. 1995. A single hamster PrP amino acid blocks conversion to protease-resistant PrP in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *J Virol*, 69, 7754-8.
- Priola, S. A. & Mcnally, K. L. 2009. The role of the prion protein membrane anchor in prion infection. *Prion*, 3, 134-8.
- Prusiner, S. B. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216, 136-44.
- Prusiner, S. B. 1991. Molecular biology of prion diseases. *Science*, 252, 1515-22.
- Prusiner, S. B. 1998. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 13363-83.
- Prusiner, S. B., Cochran, S. P., Groth, D. F., Downey, D. E., Bowman, K. A., et al. 1982. Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann Neurol*, 11, 353-8.
- Prusiner, S. B., Groth, D. F., Bolton, D. C., Kent, S. B. & Hood, L. E. 1984. Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell*, 38, 127-34.
- Prusiner, S. B., Groth, D. F., Cochran, S. P., Masiarz, F. R., Mckinley, M. P., et al. 1980a. Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry*, 19, 4883-91.
- Prusiner, S. B., Groth, D. F., Cochran, S. P., Mckinley, M. P. & Masiarz, F. R. 1980b. Gel electrophoresis and glass permeation chromatography of the hamster scrapie agent after enzymatic digestion and detergent extraction. *Biochemistry*, 19, 4892-8.
- Prusiner, S. B., Mckinley, M. P., Bowman, K. A., Bolton, D. C., Bendheim, P. E., et al. 1983. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*, 35, 349-58.
- Prusiner, S. B., Mckinley, M. P., Groth, D. F., Bowman, K. A., Mock, N. I., et al. 1981. Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 6675-9.
- Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., et al. 1990. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, 63, 673-86.
- Prusiner, S. B. & Scott, M. R. 1997. Genetics of prions. *Annu Rev Genet*, 31, 139-75.
- Puig, B., Altmeppen, H. & Glatzel, M. 2014. The gpi-anchoring of PrP. *Prion*, 8, 11-18.
- Race, R. E., Fadness, L. H. & Chesebro, B. 1987. Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells. *J Gen Virol*, 68 (Pt 5), 1391-9.
- Requena, J. R. & Wille, H. 2014. The structure of the infectious prion protein. *Prion*, 8, 60-66.
- Rezaei, H. 2008. Prion protein oligomerization. *Curr Alzheimer Res*, 5, 572-8.
- Richt, J. A., Kasinathan, P., Hamir, A. N., Castilla, J., Sathiyaseelan, T., et al. 2007. Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol*, 25, 132-8.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., et al. 1996. Nmr structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature*, 382, 180-2.
- Rohwer, R. G. 1986. Estimation of scrapie nucleic acid mw from standard curves for virus sensitivity to ionizing radiation. *Nature*, 320, 381.
- Rossi, M., Baiardi, S. & Parchi, P. 2019. Understanding prion strains: Evidence from studies of the disease forms affecting humans. *Viruses*, 11.
- Ryder, S. J., Wells, G. A., Bradshaw, J. M. & Pearson, G. R. 2001. Inconsistent detection of PrP in extraneural tissues of cats with feline spongiform encephalopathy. *Vet Rec*, 148, 437-41.
- Saa, P., Castilla, J. & Soto, C. 2005. Cyclic amplification of protein misfolding and aggregation. *Methods Mol Biol*, 299, 53-65.

- Saa, P., Castilla, J. & Soto, C. 2006. Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification. *J Biol Chem*, 281, 35245-52.
- Sabate, R., Espargaro, A., Saupe, S. J. & Ventura, S. 2009. Characterization of the amyloid bacterial inclusion bodies of the het-s fungal prion. *Microb Cell Fact*, 8, 56.
- Saborio, G. P., Permanne, B. & Soto, C. 2001. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, 411, 810-3.
- Safar, J., Roller, P. P., Gajdusek, D. C. & Gibbs, C. J., Jr. 1993a. Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem*, 268, 20276-84.
- Safar, J., Roller, P. P., Gajdusek, D. C. & Gibbs, C. J., Jr. 1993b. Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity. *Protein Sci*, 2, 2206-16.
- Safar, J. G. 2012. Molecular pathogenesis of sporadic prion diseases in man. *Prion*, 6, 108-15.
- Saijo, E., Groveman, B. R., Kraus, A., Metrick, M., Orru, C. D., et al. 2019. Ultrasensitive rt-quick seed amplification assays for disease-associated tau, alpha-synuclein, and prion aggregates. *Methods Mol Biol*, 1873, 19-37.
- Sandberg, M. K., Al-Doujaily, H., Sharps, B., Clarke, A. R. & Collinge, J. 2011. Prion propagation and toxicity in vivo occur in two distinct mechanistic phases. *Nature*, 470, 540-2.
- Sang, J. C., Lee, C. Y., Luh, F. Y., Huang, Y. W., Chiang, Y. W., et al. 2012. Slow spontaneous alpha-to-beta structural conversion in a non-denaturing neutral condition reveals the intrinsically disordered property of the disulfide-reduced recombinant mouse prion protein. *Prion*, 6, 489-97.
- Schreuder, B. E. 1994. Animal spongiform encephalopathies--an update. Part ii. Bovine spongiform encephalopathy (bse). *Vet Q*, 16, 182-92.
- Scialo, C., De Cecco, E., Manganotti, P. & Legname, G. 2019. Prion and prion-like protein strains: Deciphering the molecular basis of heterogeneity in neurodegeneration. *Viruses*, 11.
- Scott, M., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., et al. 1989. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell*, 59, 847-57.
- Scott, M., Groth, D., Foster, D., Torchia, M., Yang, S. L., et al. 1993. Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell*, 73, 979-88.
- Scott, M. R., Will, R., Ironside, J., Nguyen, H. O., Tremblay, P., et al. 1999. Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 15137-42.
- Senesi, M., Lewis, V., Kim, J. H., Adlard, P. A., Finkelstein, D. I., et al. 2017. In vivo prion models and the disconnection between transmissibility and neurotoxicity. *Ageing Res Rev*, 36, 156-164.
- Sevillano, A. M., Aguilar-Calvo, P., Kurt, T. D., Lawrence, J. A., Soldau, K., et al. 2020. Prion protein glycans reduce intracerebral fibril formation and spongiosis in prion disease. *J Clin Invest*, 130, 1350-1362.
- Sevillano, A. M., Fernandez-Borges, N., Younas, N., Wang, F., S, R. E., et al. 2018. Recombinant PrP^{Sc} shares structural features with brain-derived PrP^{Sc}: Insights from limited proteolysis. *PLoS Pathog*, 14, e1006797.
- Shyng, S. L., Huber, M. T. & Harris, D. A. 1993. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 268, 15922-8.
- Si, K., Lindquist, S. & Kandel, E. R. 2003. A neuronal isoform of the alypsia cpeb has prion-like properties. *Cell*, 115, 879-91.
- Sigurdson, C. J., Manco, G., Schwarz, P., Liberski, P., Hoover, E. A., et al. 2006. Strain fidelity of chronic wasting disease upon murine adaptation. *J Virol*, 80, 12303-11.
- Silveira, J. R., Raymond, G. J., Hughson, A. G., Race, R. E., Sim, V. L., et al. 2005. The most infectious prion protein particles. *Nature*, 437, 257-61.
- Sim, V. L. & Caughey, B. 2009. Ultrastructures and strain comparison of under-glycosylated scrapie prion fibrils. *Neurobiol Aging*, 30, 2031-42.
- Simoneau, S., Rezaei, H., Sales, N., Kaiser-Schulz, G., Lefebvre-Roque, M., et al. 2007. In vitro and in vivo neurotoxicity of prion protein oligomers. *PLoS Pathog*, 3, e125.

- Skora, L., Fonseca-Ornelas, L., Hofele, R. V., Riedel, D., Giller, K., et al. 2013. Burial of the polymorphic residue 129 in amyloid fibrils of prion stop mutants. *J Biol Chem*, 288, 2994-3002.
- Smirnovas, V., Baron, G. S., Offerdahl, D. K., Raymond, G. J., Caughey, B., et al. 2011. Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deuterium exchange. *Nat Struct Mol Biol*, 18, 504-6.
- Solforosi, L., Criado, J. R., MCGavern, D. B., Wirz, S., Sanchez-Alavez, M., et al. 2004. Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science*, 303, 1514-6.
- Soto, C. 2011. Prion hypothesis: The end of the controversy? *Trends Biochem Sci*, 36, 151-8.
- Spagnolli, G., Rigoli, M., Novi Inverardi, G., Codeseira, Y. B., Biasini, E., et al. 2020. Modeling PrP(sc) generation through deformed templating. *Front Bioeng Biotechnol*, 8, 590501.
- Spagnolli, G., Rigoli, M., Orioli, S., Sevillano, A. M., Faccioli, P., et al. 2019. Full atomistic model of prion structure and conversion. *PLoS Pathog*, 15, e1007864.
- Speare, J. O., Offerdahl, D. K., Hasenkrug, A., Carmody, A. B. & Baron, G. S. 2010. Gpi anchoring facilitates propagation and spread of misfolded sup35 aggregates in mammalian cells. *EMBO J*, 29, 782-94.
- Spielmeyer, W. 1922. Die histopathologische forschung in der psychiatrie. *Klinische Wochenschrift*, 1, 1817-1819.
- Stahl, N., Baldwin, M. A., Hecker, R., Pan, K. M., Burlingame, A. L., et al. 1992. Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. *Biochemistry*, 31, 5043-53.
- Stahl, N., Baldwin, M. A., Teplow, D. B., Hood, L., Gibson, B. W., et al. 1993. Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry*, 32, 1991-2002.
- Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K. & Prusiner, S. B. 1987. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*, 51, 229-40.
- Stamp, J. T., Brotherton, J. G., Zlotnik, I., Mackay, J. M. & Smith, W. 1959. Further studies on scrapie. *J Comp Pathol*, 69, 268-80.
- Steele, A. D., Lindquist, S. & Aguzzi, A. 2007. The prion protein knockout mouse: A phenotype under challenge. *Prion*, 1, 83-93.
- Stockel, J., Safar, J., Wallace, A. C., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. 1998. Prion protein selectively binds copper(ii) ions. *Biochemistry*, 37, 7185-93.
- Stohr, J., Weinmann, N., Wille, H., Kaimann, T., Nagel-Steger, L., et al. 2008. Mechanisms of prion protein assembly into amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 2409-14.
- Sun, Z., Diaz, Z., Fang, X., Hart, M. P., Chesi, A., et al. 2011. Molecular determinants and genetic modifiers of aggregation and toxicity for the als disease protein fus/tls. *PLoS Biol*, 9, e1000614.
- Supattapone, S., Bosque, P., Muramoto, T., Wille, H., Aagaard, C., et al. 1999. Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell*, 96, 869-78.
- Taubner, L. M., Bienkiewicz, E. A., Copie, V. & Caughey, B. 2010. Structure of the flexible amino-terminal domain of prion protein bound to a sulfated glycan. *J Mol Biol*, 395, 475-90.
- Taylor, D. M., McConnell, I. & Fraser, H. 1996. Scrapie infection can be established readily through skin scarification in immunocompetent but not immunodeficient mice. *J Gen Virol*, 77 (Pt 7), 1595-9.
- Taylor, D. R., Watt, N. T., Perera, W. S. & Hooper, N. M. 2005. Assigning functions to distinct regions of the n-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci*, 118, 5141-53.
- Telling, G. 2001. Protein-based pcr for prion diseases? *Nat Med*, 7, 778-9.
- Theint, T., Nadaud, P. S., Aucoin, D., Helmus, J. J., Pondaven, S. P., et al. 2017. Species-dependent structural polymorphism of y145stop prion protein amyloid revealed by solid-state nmr spectroscopy. *Nat Commun*, 8, 753.
- Thellung, S., Corsaro, A., Bosio, A. G., Zambito, M., Barbieri, F., et al. 2019. Emerging role of cellular prion protein in the maintenance and expansion of glioma stem cells. *Cells*, 8.

- Timmes, A. G., Moore, R. A., Fischer, E. R. & Priola, S. A. 2013. Recombinant prion protein refolded with lipid and rna has the biochemical hallmarks of a prion but lacks in vivo infectivity. *PLoS One*, 8, e71081.
- Tixador, P., Herzog, L., Reine, F., Jaumain, E., Chapuis, J., et al. 2010. The physical relationship between infectivity and prion protein aggregates is strain-dependent. *PLoS Pathog*, 6, e1000859.
- Tobler, I., Gaus, S. E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., et al. 1996. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*, 380, 639-42.
- Torrent, J., Lange, R., Igel-Egalon, A., Béringue, V. & Rezaei, H. 2016. Getting to the core of prion superstructural variability. *Prion*, 10(1), 1-8.
- Torrey, E. F. & Peterson, M. R. 1973. Slow and latent viruses in schizophrenia *Lancet*, 2(7819).
- Tycko, R. 2006. Molecular structure of amyloid fibrils: Insights from solid-state nmr. *Q Rev Biophys*, 39, 1-55.
- Tycko, R., Savtchenko, R., Ostapchenko, V. G., Makarava, N. & Baskakov, I. V. 2010. The alpha-helical c-terminal domain of full-length recombinant PrP converts to an in-register parallel beta-sheet structure in PrP fibrils: Evidence from solid state nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, 49, 9488-97.
- Uchiyama, K., Miyata, H., Yamaguchi, Y., Imamura, M., Okazaki, M., et al. 2020. Strain-dependent prion infection in mice expressing prion protein with deletion of central residues 91-106. *Int J Mol Sci*, 21.
- Van Der Kamp, M. W. & Daggett, V. 2011. Molecular dynamics as an approach to study prion protein misfolding and the effect of pathogenic mutations. *Top Curr Chem*, 305, 169-97.
- Van Der Wel, P. C. A. 2017. Insights into protein misfolding and aggregation enabled by solid-state nmr spectroscopy. *Solid State Nucl Magn Reson*, 88, 1-14.
- Vazquez-Fernandez, E., Vos, M. R., Afanasyev, P., Cebe, L., Sevillano, A. M., et al. 2016. The structural architecture of an infectious mammalian prion using electron cryomicroscopy. *PLoS Pathog*, 12, e1005835.
- Venegas, V. 2018. *Influencia de la región n-terminal de la proteína del prion en la susceptibilidad al mal plegamiento, mantenimiento de las características de cepa y neurotoxicidad*. Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibersitatea.
- Vidal, E., Fernandez-Borges, N., Erana, H., Parra, B., Pintado, B., et al. 2020. Dogs are resistant to prion infection, due to the presence of aspartic or glutamic acid at position 163 of their prion protein. *FASEB J*, 34, 3969-3982.
- Vilotte, J. L., Soulier, S., Essalmani, R., Stinnakre, M. G., Vaiman, D., et al. 2001. Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine PrP. *J Virol*, 75, 5977-84.
- Vorberg, I., Groschup, M. H., Pfaff, E. & Priola, S. A. 2003. Multiple amino acid residues within the rabbit prion protein inhibit formation of its abnormal isoform. *J Virol*, 77, 2003-9.
- Wadsworth, J. D., Hill, A. F., Beck, J. A. & Collinge, J. 2003. Molecular and clinical classification of human prion disease. *Br Med Bull*, 66, 241-54.
- Wan, W., Wille, H., Stohr, J., Baxa, U., Prusiner, S. B., et al. 2012. Degradation of fungal prion het-s(218-289) induces formation of a generic amyloid fold. *Biophys J*, 102, 2339-44.
- Wang, F., Wang, X., Orru, C. D., Groveman, B. R., Surewicz, K., et al. 2017. Self-propagating, protease-resistant, recombinant prion protein conformers with or without in vivo pathogenicity. *PLoS Pathog*, 13, e1006491.
- Wang, F., Wang, X., Yuan, C. G. & Ma, J. 2010. Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science*, 327, 1132-5.
- Wasmer, C., Lange, A., Van Melckebeke, H., Siemer, A. B., Riek, R., et al. 2008. Amyloid fibrils of the het-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science*, 319, 1523-6.
- Watts, J. C., Giles, K., Bourkas, M. E., Patel, S., Oehler, A., et al. 2016. Towards authentic transgenic mouse models of heritable PrP prion diseases. *Acta Neuropathol*.

- Watts, J. C., Giles, K., Patel, S., Oehler, A., Dearmond, S. J., et al. 2014. Evidence that bank vole PrP is a universal acceptor for prions. *PLoS Pathog*, 10, e1003990.
- Watts, J. C., Giles, K., Stohr, J., Oehler, A., Bhardwaj, S., et al. 2012. Spontaneous generation of rapidly transmissible prions in transgenic mice expressing wild-type bank vole prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 3498-503.
- Watzky, M. A. & Finke, R. G. 1997. Transition metal nanocluster formation kinetic and mechanistic studies. A new mechanism when hydrogen is the reductant: Slow, continuous nucleation and fast autocatalytic surface growth. *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 43, 10382–10400.
- Weissmann, C. & Flechsig, E. 2003. Prp knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *Br Med Bull*, 66, 43-60.
- Weissmann, C., Li, J., Mahal, S. P. & Browning, S. 2011. Prions on the move. *EMBO Rep*, 12, 1109-17.
- Wen, Y., Li, J., Xiong, M., Peng, Y., Yao, W., et al. 2010a. Solution structure and dynamics of the i214v mutant of the rabbit prion protein. *PLoS One*, 5, e13273.
- Wen, Y., Li, J., Yao, W., Xiong, M., Hong, J., et al. 2010b. Unique structural characteristics of the rabbit prion protein. *J Biol Chem*, 285, 31682-93.
- Westaway, D., Dearmond, S. J., Cayetano-Canlas, J., Groth, D., Foster, D., et al. 1994. Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell*, 76, 117-29.
- Wickner, R. B., Shewmaker, F. P., Bateman, D. A., Edskes, H. K., Gorkovskiy, A., et al. 2015. Yeast prions: Structure, biology, and prion-handling systems. *Microbiol Mol Biol Rev*, 79, 1-17.
- Wilham, J. M., Orru, C. D., Bessen, R. A., Atarashi, R., Sano, K., et al. 2010. Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog*, 6, e1001217.
- Will, R. G. & Ironside, J. W. 2017. Sporadic and infectious human prion diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7.
- Will, R. G. & Matthews, W. B. 1982. Evidence for case-to-case transmission of creutzfeldt-jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 45(3), 235-8.
- Wille, H., Bian, W., McDonald, M., Kendall, A., Colby, D. W., et al. 2009. Natural and synthetic prion structure from x-ray fiber diffraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 16990-5.
- Wille, H. & Requena, J. R. 2018. The structure of PrP(sc) prions. *Pathogens*, 7.
- Williams, E. S. & Young, S. 1980. Chronic wasting disease of captive mule deer: A spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis*, 16, 89-98.
- Williamson, R. A., Peretz, D., Pinilla, C., Ball, H., Bastidas, R. B., et al. 1998. Mapping the prion protein using recombinant antibodies. *J Virol*, 72, 9413-8.
- Windl, O., Dempster, M., Estibeiro, J. P., Lathe, R., De Silva, R., et al. 1996. Genetic basis of creutzfeldt-jakob disease in the united kingdom: A systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the prnp gene. *Hum Genet*, 98, 259-64.
- Wong, B. S., Liu, T., Li, R., Pan, T., Petersen, R. B., et al. 2001. Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein. *J Neurochem*, 76, 565-72.
- Wopfner, F., Weidenhofer, G., Schneider, R., Von Brunn, A., Gilch, S., et al. 1999. Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol*, 289, 1163-78.
- Wulf, M. A., Senatore, A. & Aguzzi, A. 2017. The biological function of the cellular prion protein: An update. *BMC Biol*, 15, 34.
- Xue, W. F., Hellewell, A. L., Gosal, W. S., Homans, S. W., Hewitt, E. W., et al. 2009. Fibril fragmentation enhances amyloid cytotoxicity. *J Biol Chem*, 284, 34272-82.
- Xue, W. F., Homans, S. W. & Radford, S. E. 2008. Systematic analysis of nucleation-dependent polymerization reveals new insights into the mechanism of amyloid self-assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 8926-31.
- Yu, G., Chen, J., Yu, H., Liu, S., Xu, X., et al. 2006. Functional disruption of the prion protein gene in cloned goats. *J Gen Virol*, 87, 1019-27.
- Yuan, J., Xiao, X., Mcgeehan, J., Dong, Z., Cali, I., et al. 2006. Insoluble aggregates and protease-resistant conformers of prion protein in uninfected human brains. *J Biol Chem*, 281, 34848-58.

- Zahn, R. 2003. The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site. *J Mol Biol*, 334, 477-88.
- Zahn, R., Von Schroetter, C. & Wuthrich, K. 1997. Human prion proteins expressed in escherichia coli and purified by high-affinity column refolding. *FEBS Lett*, 417, 400-4.
- Zeidman, L. A., Ziller, M. G. & Shevell, M. 2014. Gerstmann, straussler, and scheinker. The persecution of the men behind the syndrome. *Neurology*, 83, 272-277.
- Zerr, I. & Parchi, P. 2018. Sporadic creutzfeldt-jakob disease. *Handb Clin Neurol*, 153, 155-174.
- Zhang, H., Stockel, J., Mehlhorn, I., Groth, D., Baldwin, M. A., et al. 1997. Physical studies of conformational plasticity in a recombinant prion protein. *Biochemistry*, 36, 3543-53.
- Zhang, Y., Wang, F., Wang, X., Zhang, Z., Xu, Y., et al. 2014. Comparison of 2 synthetically generated recombinant prions. *Prion*, 8, 215-220.
- Zigas, V. & Gajdusek, C. 1957. Kuru: Clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the eastern highlands of australian new guinea. *Med J Aust*, 44(21), 745-54.
- Zlotnik, I., Grant, D. P., Dayan, A.-D. & Earl, C. 1974. Transmission of creutzfeldt-jakob disease from man to squirrel monkey. *Lancet*, 2(7878), 435-8.
- Zlotnik, I. & Rennie, J. C. 1963. Further observations on the experimental transmission of scrapie from sheep and goats to laboratory mice. *J Comp Pathol*, 73, 150-62.
- Zou, W. Q., Puoti, G., Xiao, X., Yuan, J., Qing, L., et al. 2010. Variably protease-sensitive prionopathy: A new sporadic disease of the prion protein. *Ann Neurol*, 68, 162-72.
- Zukas, A. A., Bruederle, C. E. & Carter, J. M. 2008. Sonication induced intermediate in prion protein conversion. *Protein Pept Lett*, 15, 206-11.
- Zweckstetter, M., Requena, J. R. & Wille, H. 2017. Elucidating the structure of an infectious protein. *PLoS Pathog*, 13, e1006229.

PUBLICACIONES

Bachiller S, Roca-Ceballos MA, García-Domínguez I, Pérez-Villegas EM, Martos-Carmona D, **Pérez-Castro M.A.**, Real LM, Rosa JL, Tabares L, Venero JL, Armengol JÁ, Carrión ÁM, Ruiz R. *HERC1 Ubiquitin Ligase Is Required for Normal Axonal Myelination in the Peripheral Nervous System*. Mol Neurobiol. 2018 Dec;55(12):8856-8868.

Charco JM, Eraña H, Venegas V, García-Martínez S, López-Moreno R, González-Miranda E, **Pérez-Castro M.A.**, Castilla J. *Recombinant PrP and Its Contribution to Research on Transmissible Spongiform Encephalopathies*. Pathogens. 6(4), E67; 2017.

Charco JM, Eraña H, García-Martínez S, López-Moreno R, González-Miranda E, **Pérez-Castro M.A.**, Díaz-Domínguez CM, Castilla J. *Situación actual de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles*. Enfermedades raras. Contribuciones a la investigación social y biomédica. pp. 113 -128. 2019..

Eraña, H., Charco JM, Di Bari MA, Díaz-Domínguez CM, López-Moreno R, Vidal E, González-Miranda E, **Pérez-Castro M.A.**, García-Martínez S, Bravo S, Fernández-Borges N, Geijo M, D'Agostino C, Garrido J, Bian J, König A, Uluca-Yazgi B, Sabate R, Khaychuk V, Vanni I, Telling GC, Heise H, Nonno R, Requena JR, Castilla J. *Development of a new largely scalable in vitro prion propagation method for the production of infectious recombinant prions for high resolution structural studies*. PLoS Pathogens. 15, e1008117; 2019.

Eraña H., Charco J. M., González-Miranda E., García-Martínez S., López-Moreno R., **Pérez-Castro M. A.**, Díaz-Domínguez C. M García-Salvador, A., Castilla J. 2020a. *Detection of pathognomonic biomarker PrP^{Sc} and the contribution of cell free-amplification techniques to the diagnosis of prion diseases*. Biomolecules, 10, 469.2020

Eraña H., **Pérez-Castro M. A.**, García-Martínez S., Charco J. M., López-Moreno R., Díaz-Domínguez C.M., Barrio T., González-Miranda E., Castilla J. 2020b. *A novel, reliable and highly versatile method to evaluate different prion decontamination procedures*. Front Bioeng Biotechnol, 8, 589182.

Vidal E, Fernández-Borges N, Eraña H, Parra B, Pintado B, Sánchez-Martín MA, Charco JM, Ordóñez M, **Pérez-Castro M.A.**, Pumarola M, Mathiason CK, Mayoral T, Castilla J. *Dogs are resistant to prion infection, due to the presence of aspartic or glutamic acid at position 163 of their prion protein*. FASEB J. 2020 Mar;34(3):3969-3982.

Eraña H., Charco J. M., **Pérez-Castro M. A.**, Díaz-Domínguez C.M., Sampedro-Torres-Quevedo C., Kortazar I., Fernández-Veiga L., Tasis J, Castilla J. 2021. *Laboratory identification of Prion Infections*. Encyclopedia of Infection and Immunity. In press.

