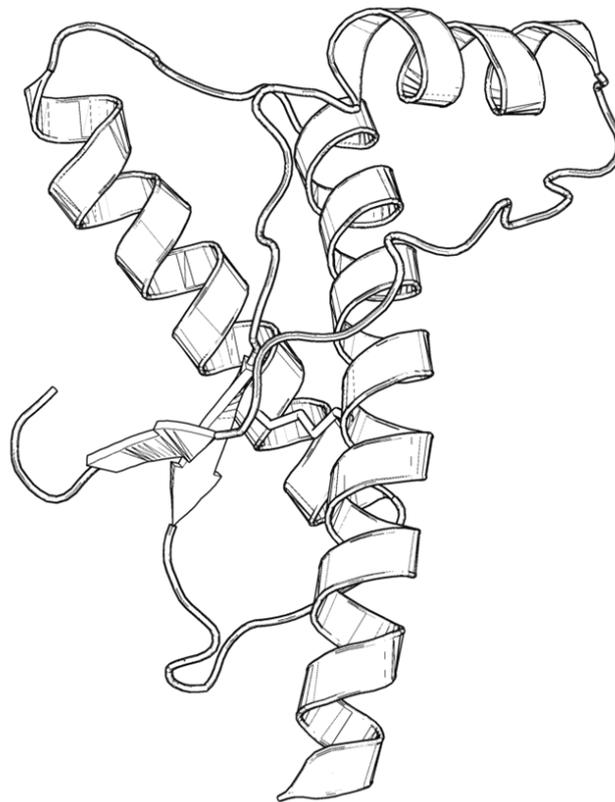


Cribado *in vitro* de potenciales proteínas priónicas dominantes negativas como estrategia terapéutica frente a las enfermedades priónicas



TRABAJO DE FIN DE GRADO / GRADU AMAIERAKO LANA

Autor / Egilea:

Juan Tasis Galarza

Directora / Zuzendaria (UPV-EHU):

Idoia Postigo Resa

Grado / Gradua:

Grado en Farmacia

Codirector / Zuzendarikide (CIC-bioGUNE):

Joaquín Castilla Castrillón

Curso / Maila:

2020/21

Fecha / Data:

1 de junio 2021

ÍNDICE

Resumen	i
Abreviaturas.....	iii
Nomenclatura de aminoácidos (código de una letra)	iv
1 Introducción.....	1
1.1 Encefalopatías espongiformes transmisibles: perspectiva histórica y descripción general.....	1
1.2 PrP ^C : Biología molecular y fisiología de la proteína.....	2
1.3 Propiedades fisicoquímicas de la PrP ^C y PrP ^{Sc}	3
1.4 PrP ^C : Estructura de la isoforma nativa	3
1.5 PrP ^{Sc} : Estructura de la isoforma aberrante, amiloides fibrilares y modelos estructurales.....	4
1.6 Propiedades exclusivas de la PrP ^{Sc} : Fenómeno de cepa y barrera de transmisión .	6
1.7 PrP ^C dominantes negativas: estrategia terapéutica frente a las EET	7
1.8 Modelo animal de EET: PrP ^C de Topillo rojo (<i>Myodes glareolus</i>)	7
1.9 Sistemas <i>in vitro</i> de generación de priones (PMCA, PMSA y RT-QuIC)	8
2 Objetivos	9
3 Materiales y métodos	9
3.1 Producción de proteínas recombinantes para sistemas de propagación <i>in vitro</i>	9
3.1.1 Transformación bacteriana e inducción de la expresión de rec-PrP.....	9
3.1.2 Extracción y purificación de las rec-PrP.....	10
3.2 Técnica de amplificación agitada del malplegamiento proteico (PMSA) para la inducción del malplegamiento.....	11
3.2.1 Preparación del sustrato para la PMSA	11
3.2.2 Inducción del malplegamiento mediante PMSA	11
3.3 Detección de rec-PrP malplegada: digestión con proteinasa K y electroforesis desnaturizante	12
3.3.1 Digestión enzimática de la rec-PrP malplegada con proteinasa K.....	12
3.3.2 Electroforesis desnaturizante acoplada a tinción de proteína total	12

4 Resultados	13
4.1 Selección de posibles mutantes dominantes negativas de topillo rojo.....	13
4.2 Producción de las rec-PrP mutantes de topillo rojo	14
4.3 Evaluación de la capacidad de malplegamiento espontáneo mediante cuatro rondas de PMSA	14
4.4 Evaluación de la capacidad de propagación de las rec-PrP mutantes mediante la utilización de inóculos basados en partículas embebidas con distintas cepas priónicas...	15
5 Discusión	17
6 Conclusiones	21
7 Referencias	22

Portada: Modelo por resonancia magnético nuclear de la proteína priónica humana en su conformación nativa (PDB 1QLX). Zahn, R. et al. NMR solution structure of the human prion protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **97**, 145-150 (2000).

RESUMEN

Recientes investigaciones han demostrado que el malplegamiento proteico es la principal causa subyacente de las enfermedades neurodegenerativas más prevalentes. Hasta la fecha, el mayor conocimiento recopilado sobre las bases moleculares del malplegamiento proteico, lo recogen las investigaciones acerca de la proteína priónica, una glicoproteína de membrana con tendencia al malplegamiento.

En condiciones específicas, dicha proteína puede adquirir una conformación aberrante de naturaleza amiloide, causante de un grupo de patologías llamadas encefalopatías espongiiformes transmisibles. El desarrollo de estas patologías implica largos periodos de incubación, pero una vez comienzan los signos clínicos, la resolución es fatal en todos los casos.

En este trabajo de fin de grado se han aportado nuevos datos para un tipo de estrategia terapéutica basada en proteínas priónicas recombinantes dominantes negativas. Es decir, proteínas priónicas que, debido a mutaciones singulares, presentan resistencia al malplegamiento e inhiben el mismo en proteínas priónicas susceptibles. Mediante el uso de la amplificación por agitación del malplegamiento proteico, una técnica *in vitro* de generación de priones, se evaluó la tendencia al malplegamiento de la proteína priónica de *Myodes glareolus* con siete mutaciones basadas en prolina: T107P, R136P, R164P, N170P, T191P, Q212P y E227P. Ninguna mutación resultó en proteínas resistentes al malplegamiento espontáneo. Aun así, la proteína priónica que poseía la mutación R164P resistió el malplegamiento inducido por seis cepas priónicas distintas, indicando una posible capacidad dominante negativa.

ABSTRACT

Recent research has confirmed that protein misfolding is the principal cause underlying the most prevalent neurodegenerative diseases. To date the greatest knowledge gathered about the molecular basis of protein misfolding is on the prion protein, a misfolding prone cell-surface glycoprotein.

Under certain conditions, the latter protein can acquire an aberrant amyloid conformation that causes a group of pathologies known as transmissible spongiform encephalopathies. The development of these pathologies implies long incubation periods but, once clinical signs arise, the resolution is in all cases fatal.

This final degree thesis has provided new evidence for a therapeutic strategy based on dominant negative recombinant prion proteins, that is, prion proteins which, due to singular mutations, are able to resist protein misfolding and are able to inhibit the misfolding of other susceptible prion proteins. Through the use of protein misfolding shaking amplification, a prion generating *in vitro* technique, the misfolding proneness of seven proline-based mutated *Myodes glareolus* prion proteins was evaluated: T107P, R136P, R164P, N170P, T191P, Q212P and E227P. No mutation produced spontaneous misfolding resistant proteins. Even so, the prion protein that possessed the R164P mutation withstood induced misfolding by six different prion strains, indicating possible dominant negative properties.

ABREVIATURAS

4RβS	Solenoides de cuatro pisos, del inglés, four-rung β -solenoid.
crio-ME	Criomicroscopía electrónica.
DN	Dominante negativa.
DO₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm.
EA	Enfermedad de Alzheimer.
ECJ	Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EET	Encefalopatía espongiiforme transmisible.
EP	Enfermedad de Parkinson.
Gdn-HCl	Clorhidrato de guanidina.
GPI	Glicosilfosfatidilinositol.
H	Hélice- α .
h	Horas.
IMAC	Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados.
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.
LB	Luria Bertoni.
LB+AMP	Luria Bertoni enriquecido con ampicilina 50 mg/L.
min	Minutos.
OR	Octarepetición.
PBS	Tampón fosfato salino.
PIRIBS	Láminas- β intermoleculares paralelas en registro, del inglés, parallel-in-register intermolecular β -sheet.
PK	Proteínasa K.
PMCA	Amplificación cíclica del malplegamiento proteico, del inglés, protein misfolding cyclic amplification.
PMSA	Amplificación por agitación del malplegamiento proteico, del inglés, protein misfolding shaking amplification.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
PRNP	Gen codificante de la proteína priónica.
PrP^C	Conformación nativa de la proteína priónica celular.
PrP^{Sc}	Conformación aberrante amiloide de la proteína priónica celular.
RE	Retículo endoplasmático.
rec-PrP	Proteína priónica recombinante.
rec-PrP^{res}	Proteína priónica recombinante resistente a proteínasa K.
RMN	Resonancia magnética nuclear.

RT-QuIC Conversión inducida por temblor en tiempo real, del inglés, real-time quaking-induced conversión.

S Hebra- β .

SDS-PAGE Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SNP Sistema nervioso periférico.

TR Topillo rojo (*Myodes glareolus*).

ZnO₂-SiO₂ Zirconia-sílica.

Nomenclatura de aminoácidos (código de una letra)

A	Alanina.
C	Cisteína.
D	Aspartato.
E	Glutamato.
F	Fenilalanina.
G	Glicina.
H	Histidina.
I	Isoleucina.
K	Lisina.
L	Leucina.
M	Metionina.
N	Asparagina.
P	Prolina.
Q	Glutamina.
R	Arginina.
S	Serina.
T	Treonina.
V	Valina.
W	Triptófano.
Y	Tirosina.

A todos los que me han permitido llegar hasta aquí.

1 INTRODUCCIÓN

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), también conocidas como enfermedades priónicas, son un grupo de patologías raras, progresivas y de desarrollo fatal que afectan al sistema nervioso de un amplio conjunto de seres vivos, destacando a los cérvidos, bóvidos y al ser humano (1). Las EET poseen al malplegamiento proteico como hecho etiológico fundamental (2). Estas enfermedades están definidas por el malplegamiento de la proteína priónica celular (PrP^C), una glicoproteína de membrana, en una nueva isoforma aberrante (PrP^{Sc}) neurotóxica que tiende a la agregación en forma de fibras amiloides (3). Debido a esta razón, las enfermedades priónicas recuerdan a otras enfermedades neurodegenerativas más prevalentes, como la enfermedad de Alzheimer (EA) o la enfermedad de Parkinson (EP), pero a diferencia de estas, las EET se consideran únicas por su carácter infeccioso. Junto con la EA y la enfermedad de EP, las EET son las patologías caracterizadas por proteínas malplegadas más estudiadas (4).

1.1 Encefalopatías espongiformes transmisibles: perspectiva histórica y descripción general

La historia del descubrimiento del agente etiológico de las EET ha ido acompañada de la serendipia. En el año 1959, la casual visita de un veterinario americano, William J. Hadlow, a una exposición en Reino Unido sobre una enfermedad rara tropical llamada *kuru*, marcó un antes y un después en las investigaciones sobre EET (5). Hadlow se percató de que el *kuru* —una enfermedad neurodegenerativa, exclusiva de un grupo étnico caníbal de Papúa Nueva Guinea— presentaba un perfil histopatológico similar a una enfermedad infecciosa animal de etiología desconocida, la tembladera ovina o *scrapie* (anglicismo del verbo inglés “*scrape*”, raspar). Los trabajos iniciales de Hadlow, dieron pie a muchos otros estudios sobre estas patologías y se relacionó la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (ECJ), otra neuropatía de etiología desconocida descrita en 1920, con el *kuru* y *scrapie*. En aquellos momentos, se especuló sobre un virus lento como el causante de estas patologías, aunque no se encontraron evidencias sólidas al respecto (6).

En los años 80, se llevaron a cabo muchos esfuerzos para descubrir el agente causal de las EET. Contra toda opinión pública, en el año 1982, Stanley B. Prusiner defendió la hipótesis de que las enfermedades priónicas estaban causadas por “*pequeñas partículas proteicas infecciosas*” y no por virus (7). De tal manera, definió el término prion (acrónimo derivado de proteína e infección) y retó al mundo de la biología, declarando que los procesos infecciosos podían ocurrir desprovistos de organismos complejos o ácidos nucleicos. Esta idea se conoce como **hipótesis de solo proteína** (8) e hizo a S. B. Prusiner merecedor del premio Nobel de Medicina del año 1997. Tiempo después, se descubrió que la proteína priónica presente en

enfermos de EET, difería estructuralmente de la de individuos sanos. Así, hoy en día está ampliamente aceptado que las EET ocurren por el malplegamiento de la nativa PrP^C en la aberrante PrP^{Sc}.

Las EET humanas más relevantes son el *kuru*, la ECJ, el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, el insomnio familiar fatal y la prionopatía variable sensible a proteasas (9). Estas patologías poseen en común diversas manifestaciones clínicas con otras enfermedades neurodegenerativas, como la EA y la EP. Mioclonía, ataxia, insomnio, demencia progresiva y rigidez postural son algunos signos que estas enfermedades comparten (10). Aun así, las EET poseen tres marcadores histopatológicos cerebrales exclusivos, que las diferencian del resto: espongiosis, gliosis y deposiciones amiloides fibrilares (11). Notablemente, las EET se clasifican como esporádicas, adquiridas o heredadas, dependiendo de su etiología. En la actualidad, la EET humana más prevalente es la ECJ en su forma esporádica.

1.2 PrP^C: Biología molecular y fisiología de la proteína

La PrP^C humana está codificada en un gen de copia única llamado *PRNP* (loci 20p13) que contiene dos exones y un intrón, con el marco abierto de lectura continuo contenido en uno solo de sus exones (12). La PrP^C se expresa constitutivamente por todo el organismo, pero presenta una mayor presencia en el sistema nervioso y linforeticular (13). Su biosíntesis está caracterizada por un importante proceso de maduración, que comienza en el retículo endoplasmático (RE) y acaba -por la vía secretora- en el anclaje del péptido a la parte externa de la membrana celular (14). El proceso de maduración se encuentra definido por tres modificaciones postraduccionales que ocurren a nivel del RE: eliminación de un péptido señal, N-glicosilación de asparaginas y conjugación de un anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el extremo C-terminal. Asimismo, la PrP^C es transportada al aparato de Golgi, donde sus glicanos y anclaje GPI reciben modificaciones adicionales, que permiten la promoción del péptido a la bicapa celular externa. Debido a estos hechos, la PrP^C es una glicoproteína fijada mediante un anclaje de GPI en la membrana externa (15).

Las funciones fisiológicas de la PrP^C no están del todo definidas y distintos modelos animales transgénicos con el gen *PRNP* noqueado (*PRNP*^{-/-}) han demostrado alteraciones prácticamente imperceptibles salvo a edades avanzadas (16,17). La PrP^C puede poseer un papel neuroprotector en el sistema nervioso periférico (SNP), ya que algunos modelos murinos *PRNP*^{-/-} muestran neuropatías periféricas (18) indicativas de que la PrP^C podría intervenir en el proceso de mielinización periférico (19). El mantenimiento de los ritmos circadianos es otra función posible de la PrP^C. Modelos animales *PRNP*^{-/-} muestran patrones irregulares de sueño, con una clara dominancia de sueño de fase 3 (20, 21).

1.3 Propiedades fisicoquímicas de la PrP^C y PrP^{Sc}

Aunque la PrP^C y la PrP^{Sc} coinciden en su estructura proteica primaria, sus estructuras secundarias y terciarias presentan sorprendentes diferencias (22), que explican el contraste observado al comparar las propiedades fisicoquímicas de ambas isoformas (23–25). Mientras que la nativa PrP^C es una proteína hidrosoluble sensible al tratamiento con proteasas, la aberrante PrP^{Sc} no es soluble en agua y resiste muchos tipos de inactivación, como la radiación ultravioleta (23), tratamientos de alta temperatura (24) y digestiones con proteinasa-K (proteasa) (25). Diversos ensayos por dicroísmo circular definen que ambas isoformas se caracterizan por mostrar distinto contenido de estructura secundaria hebra- β (~2% en la nativa PrP^C y ~40% en la aberrante PrP^{Sc}) (22).

1.4 PrP^C: Estructura de la isoforma nativa

La PrP^C humana madura es una pequeña proteína extracelular de 208 aminoácidos (aa), que posee una masa molecular aproximada de 35 kDa (8). La secuencia de la PrP^C se divide en dos zonas, la región flexible y el dominio globular, que poseen distintas propiedades dinámicas y estructurales (26). La región flexible se encuentra en el extremo amino (aa 23-124) y el dominio globular en el extremo carboxilo (aa 125-230) (Figura 1).

La región flexible es una zona sin estructura definida (*random coil*) que contiene diversos motivos aminoacídicos característicos, como un octapéptido repetido (PHGGGWGQ, aa 51-91) (27). Este motivo se conoce como octarepetición (OR) y su número varía dependiendo de la especie estudiada entre 4 y 6, la PrP^C humana posee 5 OR. Adicionalmente, la región flexible posee diversos grupos de aminoácidos cargados e hidrófobos. Por otro lado, el dominio globular está conformado por estructuras secundarias estables y filogenéticamente conservadas (28). Se ha podido determinar por resonancia magnética nuclear (RMN) que el dominio globular de la PrP^C está constituido por tres hélices- α (H₁, H₂ y H₃) y dos hebras- β antiparalelas (S₁ y S₂) (29). La estructura terciaria de la proteína se consigue con el reordenamiento de las estructuras secundarias en el dominio globular. Una de las principales interacciones intramoleculares que permiten este evento, es el establecimiento de un puente disulfuro entre cisteínas presentes en H₂ y H₃ (30) que estabiliza el dominio globular entre el aminoácido 179 y 214. Adicionalmente, destacan dos residuos de asparagina que actúan como sitio de N-glicosilación (aa 181 y 197), permitiendo la formación de PrP^C mono-, di- y no- glicosilada, y un residuo de serina que actúa como sitio de anclaje GPI (aa 230) (31).

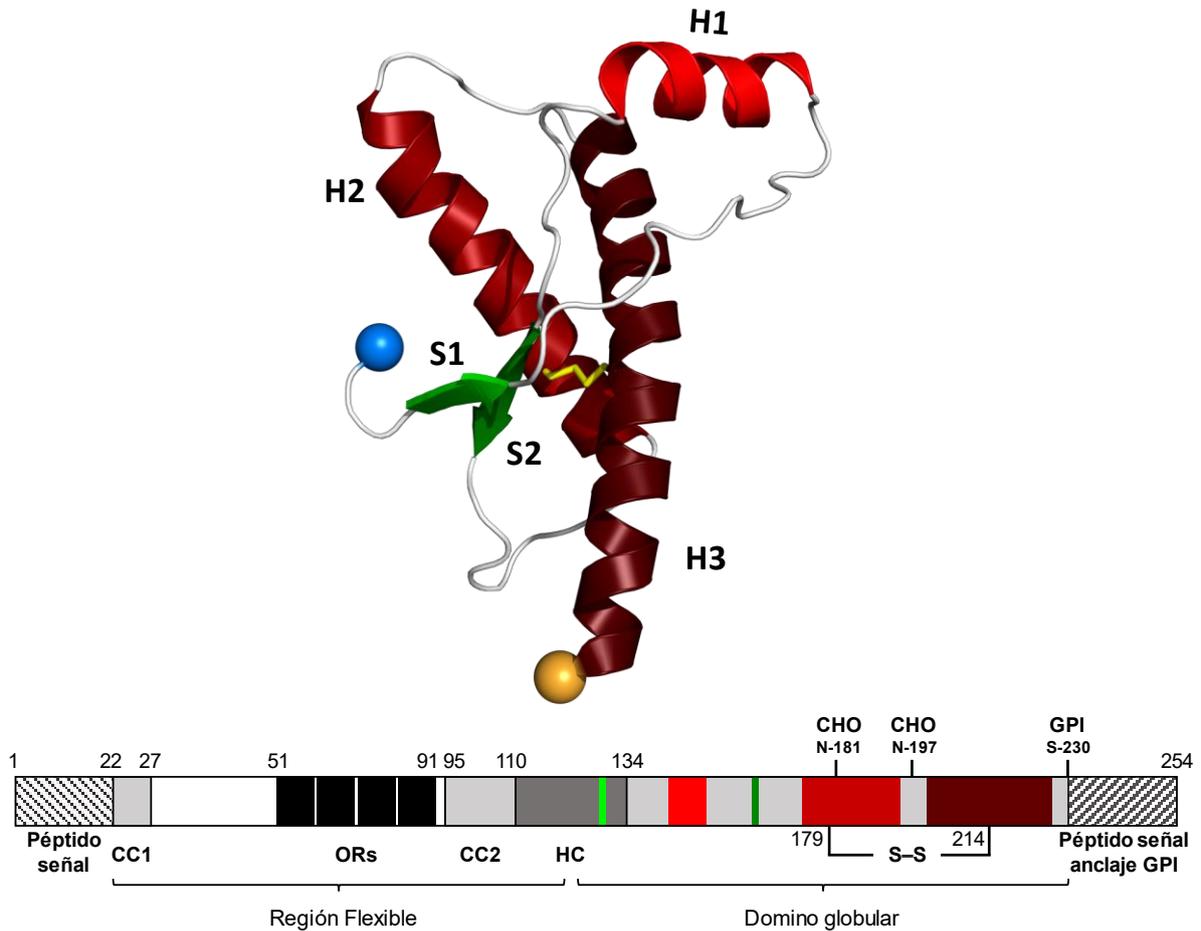


Figura 1: Estructura y esquema de los motivos relevantes de la PrP^C humana (PDB 1QLX). Un péptido señal reside en el extremo amino terminal, eliminado después de la maduración. CC1 y CC2 muestran grupos de aminoácidos básicos. OR indica la región de las octarepeticiones. HC representa un conjunto de aminoácidos hidrófobos. S-S muestra el puente disulfuro y CHO los sitios de N-glicosilación. Las bandas verdes representan las hebras-β y las rojas las α-hélices. GPI indica el sitio de conjugación del ancla. Los números describen la posición aminoacídica de las anteriores estructuras. Adicionalmente, el modelo tridimensional de la molécula permite una visión global. H1, H2, H3, S1 y S2 definen las estructuras secundarias y siguen el anterior esquema de color rojo y verde. Los extremos amino y carboxilo están respectivamente indicados con marcador azul y amarillo. Una enlace amarillo entre H2 and H3 muestra el puente disulfuro (25, 28).

1.5 PrP^{Sc}: Estructura de la isoforma aberrante, amiloides fibrilares y modelos estructurales

A la hora de elucidar la estructura de la PrP^{Sc}, la labor de biólogos estructurales y biofísicos siempre ha estado dificultada por su escasa solubilidad en agua, su tendencia a la agregación y su heterogeneidad ultraestructural (32). La isoforma PrP^{Sc} se puede comprender como un monómero que, en proximidad de moléculas nativas, es capaz de autopropagarse por inducción del malplegamiento de PrP^C. Químicamente, las moléculas de PrP^{Sc} actúan como promotores de un proceso de polimerización, que finaliza en la formación de estructuras fibrilares (33). Brevemente, las fibras priónicas son polímeros de PrP^{Sc}. La conversión de la PrP^C en la PrP^{Sc} se acompaña de un destacado aumento en el contenido de hebras-β (22).

Teniendo en cuenta todo esto, las fibras de PrP^{Sc} se pueden definir como amiloides, agregados proteicos insolubles en agua que poseen una alta proporción de hebras- β (34). La formación de amiloides es otra característica que acerca las EET a otras enfermedades neurodegenerativas más prevalentes (EA y EP).

Se han desarrollado diversos análisis para proponer un modelo estructural de las fibras de PrP^{Sc}. Hasta hallazgos recientes, aún pendientes de revisión, dos modelos estructurales se consideraban como posibles arquitecturas de las fibras; el modelo del solenoide de cuatro pisos (4R β S, del inglés *four-rung β -solenoid*) y el modelo de láminas- β intermoleculares paralelas en registro (PIRIBS, del inglés *parallel-in-register intermolecular β -sheet*). Ambos modelos diferían en gran medida a la hora de explicar la estructura básica de los amiloides fibrilares. Por un lado, el modelo 4R β S defendía la hipótesis de que la PrP^C malplegaba en una estructura solenoidal, en la que cada monómero de PrP^{Sc} adquiría la estructura de una hélice de cuatro giros (35) (Figura 2A). A su vez, el modelo asumía que cada fibra estaba compuesta por dos protofilamentos, dando lugar a una fibra simétrica entrelazada. Por el contrario, el modelo PIRIBS postulaba que cada monómero de PrP^{Sc} adquiría una conformación pseudolineal, en la que cada monómero formaba parte de una sección de la fibra amiloide (36). Por lo tanto, la arquitectura PIRIBS hipotetizaba una fibra amiloide asimétrica (Figura 2B). Resumidamente, cada modelo explicaba las secciones de la fibra de PrP^{Sc} como monómeros helicoidales (4R β S) o planos (PIRIBS).

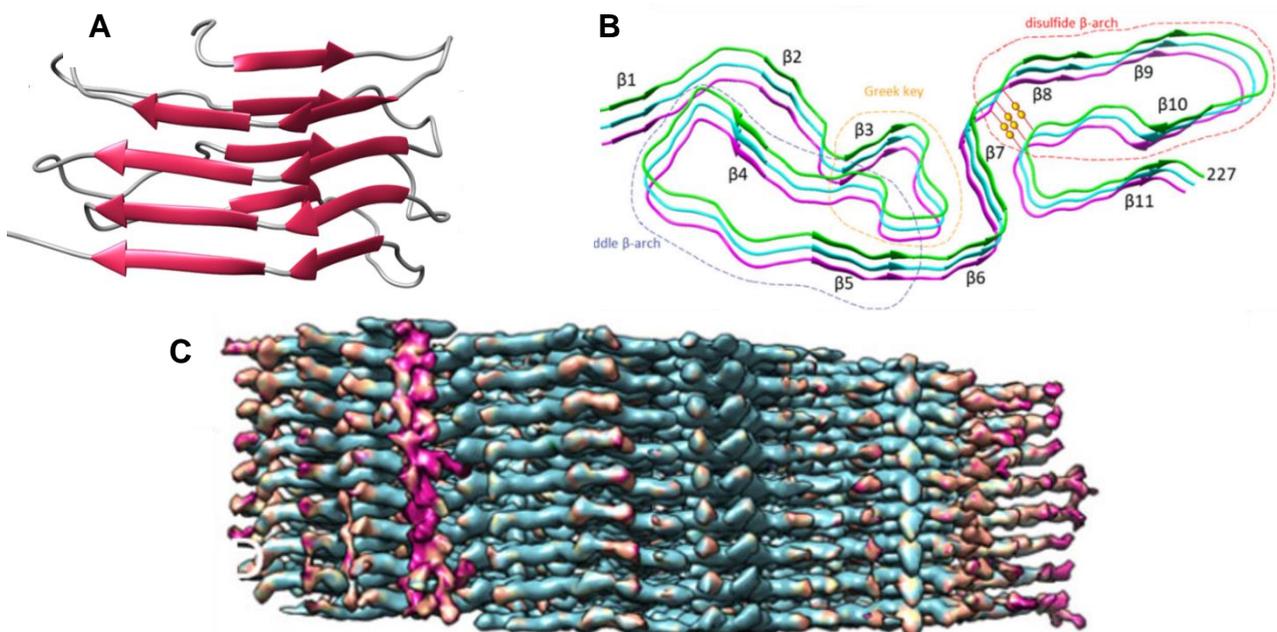


Figura 2: Arquitectura 4R β S y PIRIBS. A. 4R β S sostiene que los monómeros de PrP^{Sc} se estabilizan en una estructura helicoidal de cuatro pisos (34). B. Actualizaciones recientes por crio-EM han revelado que el modelo PIRIBS es la estructura legítima que compone los amiloides priónicos (36). C. Nuevos mapas de densidad crioeléctrica definen el amiloide priónico como una hélice levógira formada por monómeros asimétricos no coplanarios (36).

Recientes investigaciones por criomicroscopía electrónica (crio-ME) han proporcionado un fuerte respaldo experimental a la arquitectura PIRIBS, habiendo -por primera vez- elucidado estructuralmente fibras de PrP^{Sc} purificadas de encéfalos de animales afectados por EET (37). Nuevos mapas de densidad crioeléctrica publicados en febrero de 2021 (Figura 2C), han demostrado que las fibras de PrP^{Sc} son hélices levógiras formadas por monómeros basados en un sistema de once hebras-β, con notables implicaciones para el proceso de conversión de la PrP^C.

1.6 Propiedades exclusivas de la PrP^{Sc}: Fenómeno de cepa y barrera de transmisión

El fenómeno de cepa es uno de los eventos más desconcertantes descritos en la biología de los priones, y es en gran parte el motivo de la gran heterogeneidad clínica, anatomopatológica y bioquímica que caracteriza a las EET (38). Un inóculo de fibras de PrP^{Sc} proveniente de un mismo hospedador, puede generar distintos fenotipos de EET en nuevos huéspedes. Una cepa priónica (analogía de cepa vírica) se define como un inóculo de fibras de PrP^{Sc}, que genera *-consistentemente-* EET con unas características fisiopatológicas determinadas (ej. período de incubación, perfil histopatológico y tasa de letalidad). Al originarse de una misma molécula de PrP^C, las cepas priónicas se pueden entender como distintas conformaciones estructurales de PrP^{Sc} adquiridas durante el proceso de malplegamiento (39).

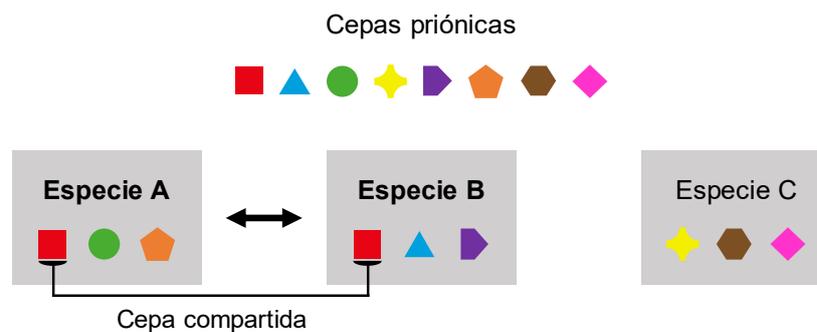


Figura 3: Cepas priónicas y barrera de transmisión: Las cepas priónicas se definen como distintas conformaciones estructurales de una misma PrP^{Sc} que causan fenotipos distintos de EET. La transmisión de EET entre especies está limitada, pero ocurre cuando las PrP^C de dos especies pueden dar lugar a una misma cepa. En la figura, la especie A y la especie B producen la misma cepa priónica, por lo que la transmisión interespecífica podría ocurrir. Por otro lado, la transmisión a la especie C está limitada por una barrera de transmisión al no producir ninguna cepa propia de la especie A o B (38-40).

Aunque algunas enfermedades priónicas puedan ser transmitidas entre especies, el evento no ocurre con frecuencia, y la transmisibilidad global de las fibras de PrP^{Sc} se encuentra limitada entre especies (40). Este hecho se conoce como barrera de transmisión y puede ser explicado por el fenómeno de cepa. Únicamente un huésped aceptará una cepa priónica, si su nativa PrP^C producirá dicha cepa. La barrera de transmisión se puede entender como un equilibrio entre las cepas de PrP^{Sc} permitidas entre distintas especies (41). No obstante,

determinadas PrP^C pueden interactuar con cepas priónicas mediante un proceso de adaptación, resultando en EET con tiempos de incubación mayores y menores tasas de letalidad. Así, surgen fenómenos de adaptación que dan lugar a nuevas cepas (Figura 3).

1.7 PrP^C dominantes negativas: estrategia terapéutica frente a las EET

Así pues, no todas las PrP^C presentes en la naturaleza poseen la misma tendencia al malplegamiento. Diversos animales presentan polimorfismos en su *PRNP*, que confieren un menor o mayor grado de resistencia a la conversión de su PrP^C en PrP^{Sc}. En ocasiones, dichas variaciones genéticas resultan en una total resistencia al malplegamiento, por tanto, dotan al individuo de inmunidad frente a las EET. En otras ocasiones, la reducida susceptibilidad al malplegamiento se reserva a determinadas cepas priónicas. Aun así, no se conoce con total detalle por qué determinados polimorfismos inducen resistencia. En la actualidad, se cree que todo recae en la compatibilidad entre la estructura tridimensional de la PrP^C y PrP^{Sc}. Un polimorfismo capaz de reducir la funcionalidad normal de una proteína, se conoce como polimorfismo dominante negativo (42). De tal manera, adaptando esta terminología al área de los priones, aquellas PrP^C con polimorfismos que reduzcan su tendencia al malplegamiento y que, además, por competición puedan llegar a inhibir la conversión de otra PrP^C susceptible, se denominan proteínas priónicas dominantes negativas (DN).

Dada la naturaleza del agente causal de las EET, en especial por su resistencia a los métodos clásicos de eliminación de patógenos, la posibilidad de diseñar PrP^C sintéticas basadas en dominancia negativa es de gran interés. Existen diversas estrategias a la hora del diseño de PrP^C DN. Notablemente, una posible estrategia sería limitar la formación de hebras- β en la PrP^{Sc}, utilizando mutaciones que, por impedimento estérico, imposibiliten dicha estructura secundaria (mutaciones basadas en glicina o prolina) (43).

1.8 Modelo animal de EET: PrP^C de Topillo rojo (*Myodes glareolus*)

A diferencia de muchos otros animales, el topillo rojo (*Myodes glareolus*) -un pequeño roedor cricétido- es especialmente susceptible a sufrir EET. Tanto de manera espontánea, como inducida por inoculación *in vivo* de PrP^{Sc} interespecífica, los topillos rojos tienden a sufrir enfermedades priónicas. Debido a este hecho, *M. glareolus* es considerado un aceptor universal de priones (44). La predisposición de este animal por las EET es debida a la secuencia aminoacídica de su PrP^C, que acepta conformaciones susceptibles al proceso de malplegamiento. Por estas razones, la proteína de *M. glareolus* es un modelo canónico de PrP^C con tendencia al malplegamiento y, por ello, de especial interés a la hora de evaluar la capacidad de potenciales PrP^C DN.

1.9 Sistemas *in vitro* de generación de priones (PMCA, PMSA y RT-QuIC)

La naturaleza infecciosa de las fibras de PrP^{Sc} es limitante a la hora de estudiar el fenómeno de malplegamiento. Esta idea, junto con el coste y dificultad de estudios basados en modelos animales o celulares, promovió en el año 2001 el concepto de sistemas acelulares como herramientas para el estudio de las EET (45). En estas técnicas, el malplegamiento priónico se reduce a un evento químico, en el que la conversión y polimerización de la PrP^{Sc} obedece las leyes puras de la termodinámica. Mediante una introducción exógena de energía cinética en el sistema (ej. movimiento o sonicación), las fibras de PrP^C espontáneamente adquieren la conformación PrP^{Sc}, y de manera autónoma, polimerizan en las fibras amiloides. Análogamente, muestras purificadas de PrP^C inoculadas con fibras de PrP^{Sc}, aceptarán dicha energía cinética y las fibras podrán actuar como “*semillas*” del proceso de malplegamiento, es decir, inductores de la conversión de la PrP^C en PrP^{Sc}. Este proceso estará favorecido, siempre y cuando no exista una barrera de transmisión.

Las técnicas acelulares *in vitro* de generación de priones más utilizadas en la actualidad son tres: amplificación **cíclica** del malplegamiento proteico (PMCA), amplificación por **agitación** del malplegamiento proteico (PMSA) y conversión inducida por **temblor** en *tiempo real* (RT-QuIC) (46). La primera técnica en surgir fue la PMCA (del inglés, *protein misfolding cyclic amplification*) basada en ciclos alternados de sonicación e incubación de duración variable. Seguidamente, fueron la PMSA (del inglés, *protein misfolding shaking amplification*) y RT-QuIC (del inglés, *real-time quaking-induced conversion*) ambas dos basadas en agitación sin sonicación. Las utilidades de cada técnica son distintas. La PMCA es la técnica más estudiada, y, aun siendo robusta, es tediosa a la hora de cuantificar el proceso de conversión (47). Sin embargo, destaca su utilidad a la hora trabajar con homogeneizados de tejidos. La PMSA deriva de la PMCA, pero no requiere de sonicación. Con el uso de termocicladores, cofactores aniónicos específicos y partículas de materiales inertes, se consigue un proceso muy versátil y de gran escalabilidad (48). Finalmente, la RT-QuIC incorpora el uso de una molécula fluorescente afín a los amiloides en polimerización, llamada tioflavina-T, que permite monitorizar en *tiempo real* el proceso de conversión. (46). A diferencia de los métodos anteriores, las fibras de PrP^{Sc} formadas por RT-QuIC no son infecciosas, sin embargo, dada su extraordinaria sensibilidad a la hora de detectar PrP^{Sc}, posee un elevado valor diagnóstico. Debido a ello, en este trabajo se ha utilizado la PMSA como herramienta de producción y cribado *in vitro* de potenciales proteínas priónicas recombinantes, dominantes negativas, como estrategia terapéutica frente a las enfermedades priónicas.

2 OBJETIVOS

- Producción de proteínas priónicas recombinantes (rec-PrP) con potencial capacidad dominante negativa.
- Evaluación de la capacidad de malplegamiento espontáneo *in vitro* de las proteínas producidas.
- Evaluación de la capacidad de las proteínas producidas para propagar *in vitro* distintos priones recombinantes.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Producción de proteínas recombinantes para sistemas de propagación *in vitro*

3.1.1 Transformación bacteriana e inducción de la expresión de rec-PrP

Las secuencias codificantes de las rec-PrP con mutaciones se obtuvieron mediante síntesis génica y subclonaje en el vector de expresión pOPINE (49) (NZYTech Lda.) y se transformaron en bacterias competentes *Escherichia coli Rosetta*[™] (BL21-DE3, Merck Millipore) mediante el protocolo de choque térmico (50). Además de contener el gen codificante de la rec-PrP, los plásmidos se caracterizan por poseer un gen de resistencia a la ampicilina, un sistema de expresión *T7/lac* de alto rendimiento mediado por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y un gen codificante de una cola de hexahistidina (His-tag). Para cada rec-PrP, 10 ng de plásmido fueron añadidos a 100 μ L de *E. coli* DE3 y se almacenaron en hielo durante 20 minutos (min). Después, se procedió a la transformación por choque térmico mediante una incubación de 30 segundos en un baño a 42 °C, seguida de otra incubación en hielo durante 5 min. Tras añadir 150 μ L de medio Luria Bertoni (LB, Sigma Aldrich), las bacterias transformadas se incubaron en agitación durante 1 hora (h) a 37 °C y, posteriormente, se sembraron en placas de agar LB enriquecidas con ampicilina a 50 mg/L (LB+AMP, Sigma-Aldrich). Los cultivos se dejaron crecer a 37 °C durante 24 h para seleccionar las bacterias transformadas. Para la expresión de las rec-PrP, se seleccionó una colonia de cada placa y se utilizó para inocular 50 mL de medio de cultivo LB+AMP que actuó como precultivo. El precultivo se incubó en agitación a 37 °C hasta el siguiente día y, posteriormente, se utilizó para inocular 500 mL de caldo LB+AMP que, en condiciones de agitación, se incubó hasta una densidad óptica de 0.8-1.0 a una longitud de onda de 600 nm (DO_{600}). Una vez obtenida dicha DO_{600} , se procedió con la inducción de la expresión proteica añadiendo IPTG (Gold Biotechnology) hasta una concentración final de 1mM. Los cultivos se incubaron durante 3 h a 37 °C y, finalmente, se centrifugaron durante 15 min a 4500 g (Sorvall Legend XTR[™], Thermo Fisher Scientific) para forzar la precipitación de las bacterias que contenían rec-PrP en forma de cuerpos de inclusión.

3.1.2 Extracción y purificación de las rec-PrP

Utilizando distintas soluciones, el esquema de extracción se dividió en tres etapas: lisis de las bacterias, separación de los cuerpos de inclusión y extracción de las rec-PrP de los cuerpos de inclusión. Tras descartar el sobrenadante, el precipitado bacteriano se suspendió en 100 mL de *solución de lisis* [50 mM clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl, Fisher Bioreagents), 5 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Sigma-Aldrich), 10 g/L Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich), 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Sigma-Aldrich), 2 g/L lisozima (Sigma-Aldrich), ajustado a pH 8.0] y en presencia de 5 mg/L de desoxirribonucleasa (DNAsa, Sigma-Aldrich) y 20 mM de cloruro magnésico (MgCl₂, Sigma-Aldrich), se incubó en agitación durante 30 min a 25 °C. Posteriormente, el lisado bacteriano se centrifugó a 4 °C durante 1 h a 8500 g (Sorvall Legend XTR™, Thermo Fisher Scientific), se recuperó el sedimento y se suspendió completamente en 100 mL de *solución de lavado* [20 mM Tris-HCl, 150 mM cloruro sódico (NaCl, SigmaAldrich), 1 mM EDTA, 10 g/L lauroil sarcosinato de sodio (sarkosyl, Sigma-Aldrich), ajustado a pH 8.0] que se centrifugó a 4 °C durante 1 h a 8500 g. Acto seguido, se desechó el sobrenadante y el sedimento se disgregó en 12 mL de *solución de inclusión* [20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 6 M clorhidrato de guanidina (Gdn-HCl, Fisher Scientific), ajustado a pH 8.0] que se incubó a 37 °C durante toda la noche con agitación suave. Una vez extraídas las rec-PrP de los cuerpo de inclusión, se finalizó el proceso con una centrifugación a 4 °C durante 1 h a 8500 g. Se desechó el sedimento y se filtró el sobrenadante, con filtros con tamaño de poro de 0.22 µm (Minisart™, Sartorius Stedim), para reducir la presencia de impurezas que alteraran el proceso de purificación por cromatografía.

Seguidamente, las rec-PrP presentes en el filtrado se purificaron mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) con columna niquelada de afinidad por histidina (HisTrap™ FF crude 5 mL, GE Healthcare Amersham) en un sistema FPLC (ÄKTA™ start, GE Healthcare Amersham). Primeramente, el sistema se acondicionó con 35 mL *solución de unión* [20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazol (Sigma-Aldrich), 2 M Gdn-HCl, ajustado a pH 8.0] y el filtrado se introdujo en el sistema. De tal manera, mediante la interacción de regiones ricas en residuos de histidina con partículas de níquel presentes en la columna, las rec-PrP se adsorbieron por afinidad a la columna. Seguidamente, con 75 mL de *solución de unión* se separaron los interferentes, y se finalizó la purificación eluyendo las rec-PrP con 30 mL de *solución de elución* [20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 500 mM imidazol, 2 M Gdn-HCl, ajustado a pH 8.0]. Las rec-PrP purificadas se desnaturalizaron completamente añadiendo Gdn-HCl hasta 6 M y, mediante centrifugación a 4 °C y 4500 g con filtros de límite de exclusión de 10 kDa (Amicon Ultra-15™ 10 kDa, Merck), se concentraron hasta 1 mM. Las rec-PrP se almacenaron a -80 °C hasta su posterior uso.

3.2 Técnica de amplificación agitada del malplegamiento proteico (PMSA) para la inducción del malplegamiento

3.2.1 Preparación del sustrato para la PMSA

Previamente a la inducción del malplegamiento de las rec-PrP producidas, estas se adecuaron al medio de reacción necesario en la PMSA (sustrato). Primeramente, las rec-PrP se diluyeron en tampón fosfato salino (PBS, Fisher Bioreagents) hasta una concentración 0.20 mM (ratio 1:5), se introdujeron en casetes de diálisis con límite de exclusión de 10 kDa (Slide-A-Lyzer™ 10k MWCO 3 mL, Thermo Fisher Scientific) y se dializaron con agitación frente a PBS durante 1 h a temperatura ambiente (ratio 100 µL rec-PrP:1 L PBS) para favorecer el plegamiento nativo. Posteriormente, con la finalidad de eliminar agregados amorfos insolubles en agua, producidos durante el proceso de diálisis, se centrifugó el dializado a 4 °C durante 15 min a 19 000 g (Sorvall™ ST 16R, Thermo Fisher Scientific). Las rec-PrP solubles en su conformación nativa se obtuvieron por decantación del sobrenadante y, mediante el método de Pierce (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific), se determinó la concentración de rec-PrP en el sobrenadante. Finalmente, se elaboró el sustrato de PMSA mezclando una parte del dializado, con una parte de dextrano sulfatado 50 g/L (40,000 MW, Sigma-Aldrich) y nueve partes de *solución de conversión* [150 mM NaCl, 10 g/L Triton™ X-100 en PBS], obteniéndose así, un sustrato de PMSA complementado con dextrano sulfatado con una concentración de entre 2 y 3 µM de rec-PrP.

3.2.2 Inducción del malplegamiento mediante PMSA

Una vez producido el sustrato de cada rec-PrP, se procedió a realizar los ensayos de malplegamiento proteico inducido por PMSA, técnica que induce el cambio de conformación de las proteínas aptas para el malplegamiento de tipo priónico. En este trabajo se utilizaron dos tipos de esquemas experimentales: 1) ensayo de malplegamiento espontáneo, y , 2) ensayo de malplegamiento inducido.

Los ensayos de malplegamiento espontáneo se realizaron con cuatro réplicas técnicas para cada rec-PrP. Primeramente, se tomaron tubos tipo Eppendorf™ de 2 mL con tapón de rosca (3488NK, Thermo Fisher Scientific) y se rellenaron con 250 mg de partículas esféricas de zirconia-sílica de 1 mm de diámetro (ZnO₂-SiO₂, BioSpec Products). Posteriormente, se añadió sustrato recién preparado a los tubos, 4 tubos portaban 600 µL y 12 tubos 540 µL, y se aplicó la reacción PMSA a los tubos de 600 µL durante 24 h, mediante agitación en termobloques (Digital Heating Shaking Drybath, Thermo Scientific) a 39 °C y 700 rpm. Los 12 tubos restantes se almacenaron a -80 °C para realizar sucesivos pases de PMSA, es decir, PMSA seriadas de 24 h. Una vez finalizado el primer pase de los tubos con 600 µL, se tomaron 60 µL y se utilizaron para inocular 540 µL del sustrato previamente almacenado (ratio 1:10),

que se sometieron a un pase de PMSA de 24 h. Este proceso se repitió hasta realizar 4 pases de PMSA a cada réplica de cada sustrato.

Por otro lado, los ensayos de malplegamiento inducido se basaron en la inoculación de los anteriores sustratos con 6 cepas priónicas previamente caracterizadas (SST01, UST01, UST02, UST05, UST06, UST09; resultados pendientes de publicación) que actuaron como “semillas” del proceso de malplegamiento de las rec-PrP estudiadas. Las cepas utilizadas se presentaron adsorbidas en partículas de ZnO₂-SiO₂ de 1 mm de diámetro, y las condiciones de reacción fueron idénticas al del ensayo de malplegamiento espontáneo, exceptuando el contenido de partículas esféricas. En este caso, se realizaron dos réplicas donde cada tubo contenía 1 o 5 partículas cargadas con cada una de las cepas y, respectivamente, 9 o 5 partículas de ZnO₂-SiO₂ que actuaban como catalizadores del proceso.

3.3 Detección de rec-PrP malplegada: digestión con proteinasa K y electroforesis desnaturizante

3.3.1 Digestión enzimática de la rec-PrP malplegada con proteinasa K

La presencia de rec-PrP malplegada en los productos sometidos a PMSA se determinó mediante digestión con proteinasa K (PK, endopeptidasa hidrosoluble de 28.9 kDa) acoplada a electroforesis y tinción de proteína total. Notablemente, aunque la PrP^{Sc} y las formas amiloides de la rec-PrP presentan resistencia al tratamiento con proteasas, los sistemas *in vitro* de generación de priones pueden inducir distintos tipos de malplegamiento que, en ocasiones, resultan en proteínas autopropagativas sin capacidad de generar *in vivo* EET. De manera estricta, al no haberse evaluado *in vivo* la capacidad infecciosa de las proteínas producidas, en este trabajo los productos de la PMSA se referirán como rec-PrP resistentes a proteinasa K (rec-PrP^{res}). En una estufa precalentada a 42 °C (CP-op, Nahita), 450 µL de cada muestra se incubaron con PK (Roche) a una concentración de 0.85 µM durante 45 min. Tras la digestión, las muestras se centrifugaron a 4 °C durante 5 min a 10 000 g (Sorvall™ ST 16R, Thermo Fisher Scientific) y se desechó el sobrenadante. Seguidamente, el sedimento se lavó con 500 µL de PBS y se repitió la centrifugación en las condiciones anteriores. Finalmente, se descartó el sobrenadante y el sedimentado se suspendió en 15 µL de *solución de carga* (NuPAGE™ LDS Sample Buffer 4X, Thermo Fisher Scientific) diluida 1:3 en PBS.

3.3.2 Electroforesis desnaturizante acoplada a tinción de proteína total

Una vez digeridas las muestras, la presencia de rec-PrP^{res} se determinó mediante una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y tinción de proteína total. Con ese fin, las muestras suspendidas en *solución de carga* se hirvieron a 100 °C durante 10 min, se cargaron en geles SDS-PAGE (NuPAGE™ 4-12%

Bis-Tris 1.0 mm, Thermo Fisher Scientific) y se corrieron en el sistema XCell4 SureLock™ Midi-Cell (Thermo Fisher Scientific). La electroforesis se desarrolló en tres etapas: 10 min a 70 V, 10 min a 110 V y 1 h a 150 V. Una vez finalizado el proceso, se extrajeron los geles y se incubaron en agente de tinción de proteína total tipo azul de Coomassie (Blue Safe, NZYTech) con agitación suave durante 1 h. Adicionalmente, como control del proceso de electroforesis y tinción, 5 µL de los sustratos de PMSA se cargaron diluidos en 10 µL de *solución de carga* y se corrieron en condiciones idénticas a las muestras de rec-PrP^{res}.

4 RESULTADOS

4.1 Selección de posibles mutantes dominantes negativos de topillo rojo

Debido a la relevante tendencia al malplegamiento que posee la PrP^C de topillo rojo (TR), y que la fibra de PrP^{Sc} se compone principalmente por la región globular, se utilizó la secuencia de TR (aa 23-231) como modelo bioquímico de EET. A partir de esta secuencia aminoacídica, se diseñaron siete nuevas proteínas priónicas recombinantes (rec-PrP) con una sustitución de un aminoácido por prolina, un aminoácido que imposibilita estructuras hebra-β, con el fin de diseñar proteínas dominantes negativas (DN) resistentes al malplegamiento (Figura 4). Las rec-PrP mutantes se diseñaron basándose en el modelo estructural más reciente por crio-ME de la fibra de PrP^{Sc} (*structure-based protein engineering*). Aun así, las posibles candidatas, se refinaron por deconvolución de un estudio filogenético en curso, del propio Laboratorio de Priones del CIC-bioGUNE. *Grosso modo*, el proceso se podría resumir en dos etapas: 1) comparación de un gran número de secuencias de PrP^C de mamífero; con el fin de elegir sustituciones aminoacídicas seguras (observación en otras especies) basadas en prolina, y, 2) estudio del reciente modelo por crio-ME; para seleccionar aquellas mutaciones que presenten un mayor interés. Las mutantes fueron: T107P, R136P, R164P, N170P, T191P, Q212P y E227P. Se debe destacar que las mutaciones T107P y N170P, provienen respectivamente de la PrP^C de integrantes de la subfamilia *Caprinae* y *Sciurinae*.

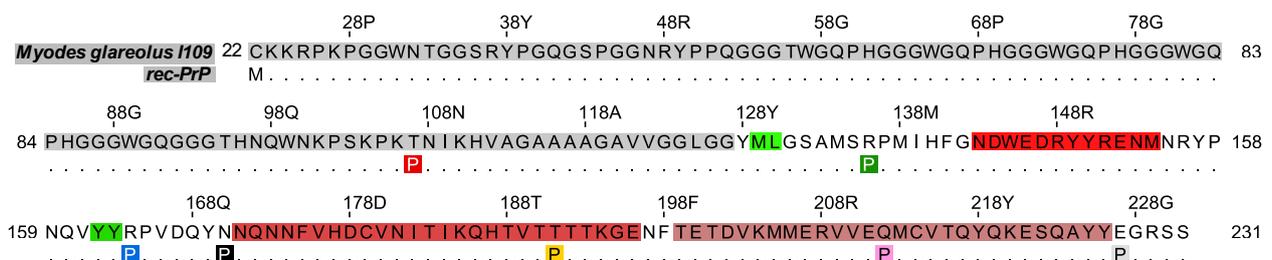


Figura 4: Secuencia anotada de PrP^C de TR alineada con mutaciones basadas en prolina: Los subrayados presentes en la PrP^C de TR grises indican la región flexible, los verdes las hebras-β y los rojos las hélices-α. Las mutaciones evaluadas basadas en prolina se indican juntas en la segunda secuencia con el siguiente esquema de color: T107P, rojo; R136P, verde; R164P, azul; N170P, negro; T191P, naranja; Q212P, rosa y E227P, gris.

4.2 Producción de las rec-PrP mutantes de topillo rojo

Antes de evaluar la capacidad DN de las nuevas proteínas mutantes, estas se produjeron en bacterias y adecuaron al medio de reacción de la PMSA. Las rec-PrP mutantes se obtuvieron por transformación de bacterias competentes *E. coli Rossetta* (DE3)[™] con plásmidos pOPINE de expresión inducible para el fragmento de la PrP^C madura (aa 23-231) de TR con mutaciones. Adicionalmente, los productos recombinantes fueron purificados por cromatografía de afinidad y, dado que se conservaban en un medio basado en el agente caotrópico catión guanidinio desnaturizante, se dializaron para recuperar su conformación nativa. Después de adecuarse al medio de reacción de la PMSA (*solución de conversión*), una alícuota de cada sustrato se utilizó como control de calidad, verificándose el peso molecular de las rec-PrP producidas por SDS-PAGE. Se descartó la presencia de truncamientos o formas multiméricas de poco interés. Adicionalmente, se valoró el proceso de expresión al verificarse las concentraciones de rec-PrP por comparación. Se incluyó también una muestra de sustrato con rec-PrP silvestre de TR como control.

Tal y como muestra la Figura 5, mediante SDS-PAGE acoplada a tinción de proteína total, se pudo observar que los sustratos presentaron concentraciones de rec-PrP equiparables. Además, la inclusión de la rec-PrP silvestre de TR aseguró que las siete proteínas mutantes tenían el peso molecular esperado, al presentarse en las inmediaciones de la banda de 25 kDa del marcador. Así mismo, se pudo comprobar que no se habían dado eventos inesperados durante la preparación de los sustratos de PMSA.

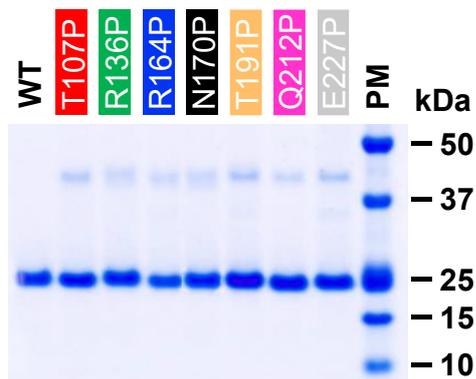


Figura 5: Tinción de proteína total de los sustratos de las rec-PrP diseñadas comparadas con rec-PrP silvestre: Los sustratos de las rec-PrP diseñadas poseían proteínas con un peso molecular cercano a los 25 kDa. Una tenue señal presente sobre los 46 kDa indicó una baja presencia de dímeros. WT: silvestre. PM: Marcador de peso molecular.

4.3 Evaluación de la capacidad de malplegamiento espontáneo mediante cuatro rondas de PMSA

Una vez comprobada la idoneidad de los sustratos para PMSA, se procedió a evaluar si las proteínas con sustituciones de prolina presentaban capacidad de malplegamiento espontáneo. Para ello, a cada sustrato se sometió, a cuatro pases seriados de 24 h de PMSA. El producto resultante se procesó mediante digestión por proteinasa K acoplada a SDS-PAGE con tinción de proteína total (Figura 6). Adicionalmente, se utilizaron cuatro replicas técnicas

con la finalidad de estimar semi-cuantitativamente la tendencia al malplegamiento de cada rec-PrP diseñada y asegurar significancia estadística de los resultados. Se realizaron cuatro pases seriados con el fin de definir mejor la probabilidad de que ocurriera el proceso de malplegamiento. Por ello, la aparición de rec-PrP^{res} en un pase tardío y/o un bajo número de réplicas con esta característica, indicarían una menor tendencia al malplegamiento.

Como puede observarse en la Figura 6B, después de cuatro pases de PMSA, todas las rec-PrP evaluadas malplegaron espontáneamente. Aun así, al analizar los pases anteriores, destacan los resultados obtenidos en la mutante R164P (Figura 6A). Notablemente, en comparación con el resto de las proteínas diseñadas, esta presentó una menor tendencia al malplegamiento y, por lo tanto, un mayor potencial para actuar como proteína DN.

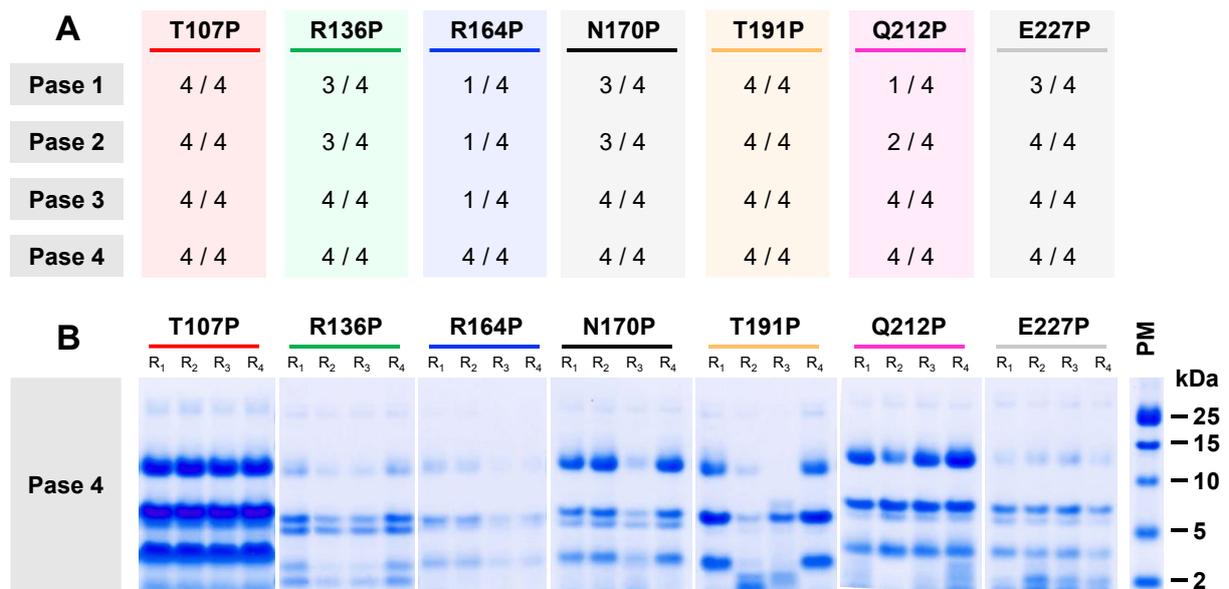


Figura 6: Evaluación de la capacidad de malplegamiento espontáneo: **A.** Resultados desglosados por mutaciones, se define positivo cualquier muestra con rec-PrP^{res}. Un menor número de réplicas positivas y/o una aparición en pase tardío, indica una menor tendencia al malplegamiento. La ausencia relativa de señales positivas indica una posible rec-PrP DN. **B.** Señales presentes en el cuarto pase de PMSA. Al mostrar señales sobre los 7 y 14 kDa, todas las rec-PrP malplegaron espontáneamente después de 4 pases de PMSA. T107P mostró señales intensas indicando elevada tendencia al malplegamiento, se descartó en los siguientes ensayos.

4.4 Evaluación de la capacidad de propagación de las rec-PrP mutantes mediante la utilización de inóculos basados en partículas embebidas con distintas cepas priónicas

Sumando los resultados de malplegamiento espontáneo, la capacidad de propagación de las rec-PrP propuestas se evaluó mediante la utilización de cepas priónicas. Mediante estudios de malplegamiento inducido, se simularon condiciones similares a las presentes en las EET en desarrollo. Adicionalmente, teniendo en cuenta que la capacidad DN puede mostrar especificidad de cepa, se inocularon seis cepas priónicas previamente caracterizadas por el Laboratorio de Priones del CIC-bioGUNE (SST01, UST01, UST02, UST05, UST06 y UST09).

El esquema experimental se dividió en dos grupos con la finalidad de definir cualitativamente la tendencia al malplegamiento inducido de las rec-PrP diseñadas: grupo A, propagación con una partícula (semilla con una carga priónica mínima); grupo B, propagación con cinco partículas (semilla con una carga priónica máxima). Todas las muestras se sometieron a un pase de 24 h de PMSA.

Los resultados en ambos dos grupos fueron similares, mostrando señales de débil intensidad atribuibles a la propagación de las cepas. Debido a la mayor carga priónica del grupo B, algunas señales de este grupo mostraron una mayor intensidad. Salvo la rec-PrP basada en la mutación R164P, ninguna de las proteínas propuestas demostró capacidad DN, al mostrar bandas indicativas del malplegamiento proteico. Notablemente, al no presentar rec-PrP^{res} sobre los 7 kDa, la rec-PrP mutante R164P presentó total resistencia al malplegamiento (Figura 7).

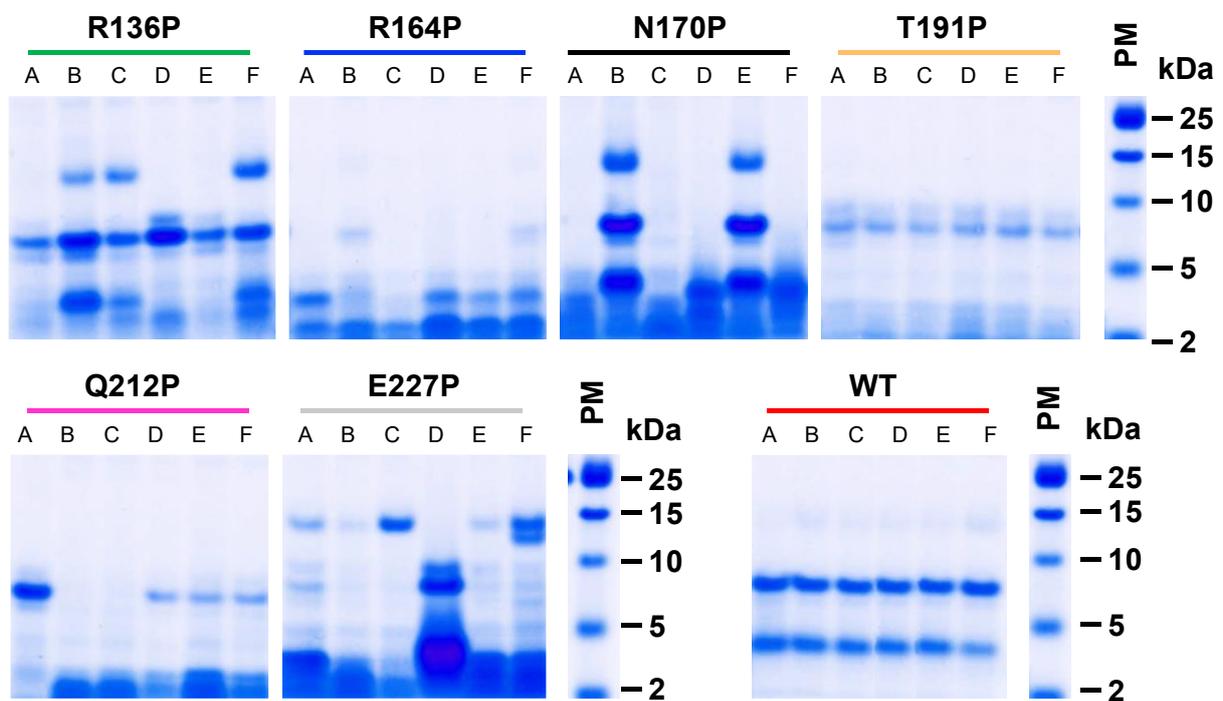


Figura 7: Evaluación de la capacidad de malplegamiento inducido (grupo B): Salvo en el caso de la rec-PrP con la mutación R164P, la propagación con cinco partículas posibilitó el malplegamiento de todas las rec-PrP evaluadas, al mostrar todas ellas señales sobre los 7 kDa. La rec-PrP WT aceptó las cepas inoculadas. PM: Marcador de peso molecular. WT: rec-PrP de TR silvestre.

Posteriormente, con el objetivo confirmar los resultados previos, se propagaron los productos del grupo B en nuevo sustrato correspondiente a cada rec-PrP mutante, y se procedió a un pase adicional de PMSA. Este experimento confirmó lo observado anteriormente (Figura 8). Todos los productos del grupo B, salvo los de la rec-PrP R164P, actuaron como semillas del

proceso de malplegamiento al mostrar señales leves cerca de 14 kDa. Por lo tanto, la mutación R164P parece dotar de resistencia al malplegamiento.

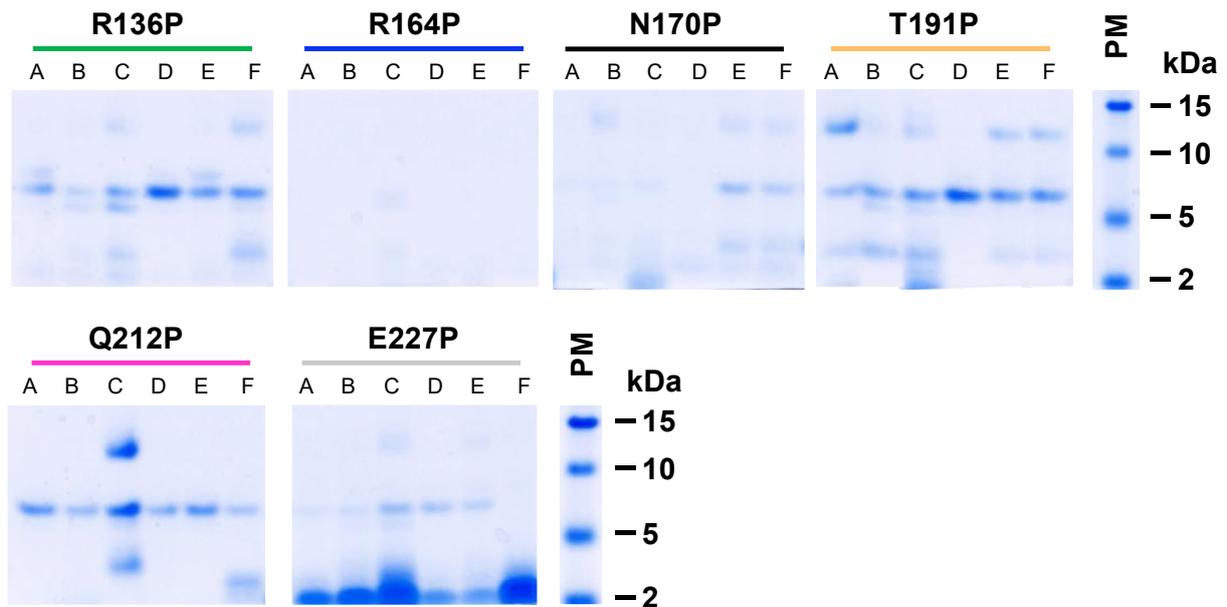


Figura 8: Evaluación de la capacidad de malplegamiento inducido: En términos de intensidad, la inoculación de los productos del grupo B en nuevo sustrato confirmó los resultados previos. Salvo en el caso de R164P, un pase de PMSA fue suficiente para generar rec-PrP^{res} con capacidad autopropagativa en todas las rec-PrP evaluadas, al mostrar señal sobre los 7 y 14 kDa. PM: Marcador de peso molecular. WT: rec-PrP de TR silvestre.

5 DISCUSIÓN

En este trabajo se ha estudiado el concepto de rec-PrP con capacidad dominante negativa como estrategia terapéutica frente a las EET, un grupo de enfermedades neurodegenerativas de fatal pronóstico actualmente sin tratamiento. Utilizando la PMSA como técnica *in vitro* para la inducción del malplegamiento de la proteína priónica, se evaluó la capacidad de malplegamiento de siete rec-PrP de TR mutantes que presentaban un único cambio aminoacídico por prolina, siendo el TR una especie cuya proteína priónica muestra una elevada tendencia al malplegamiento y por ello actúa como modelo de EET (51). Todas las rec-PrP con mutaciones son capaces de adoptar espontáneamente formas amiloides. Aun así, a la hora de estudiar la capacidad de malplegamiento, mediante propagación de cepas previamente caracterizadas, los datos que se presentan en este trabajo evidencian que la mutación R164P en la rec-PrP de TR es de elevado interés, al dificultar la propagación de todas las semillas evaluadas, indicando que podría poseer capacidad DN.

El avance en el área de los priones se ha encontrado limitado por el desconocimiento de la estructura de las fibras amiloides y al fenómeno de conversión de isoforma. Es por este motivo, que los recientes mapas de densidad crioelectrónica de la fibra de PrP^{Sc}, publicados en febrero de 2021 (37), van a marcar un antes y después en la interpretación de resultados

experimentales de este área. Además de posibilitar el diseño racional de rec-PrP^{Sc} mutantes, el estudio de los citados ensayos por crio-EM permite la discusión de los resultados bajo la luz de un modelo estructural real y, por lo tanto, extraer conclusiones con una robustez sin precedentes. Por ello, un análisis técnico del modelo precede a la discusión de los resultados (Figura 9).

El modelo PIRIBS explica que las fibras de PrP^{Sc} están formadas por la superposición de monómeros de naturaleza asimétrica, que se estabilizan en un núcleo hidrófobo constituido por 11 hebras- β . Adicionalmente, define que los monómeros de PrP^{Sc} son no coplanarios, donde cada lateral de los monómeros existe en un plano distinto. Este hecho posibilita secciones protuberantes, concentradas en una *zona de interfase* (aa 168-178), posiblemente relacionadas con el fenómeno de polimerización de las fibras amiloides (52). Se distinguen distintos motivos estructurales a la hora de entender el núcleo hidrófobo de la fibra de PrP^{Sc}. A diferencia del lateral próximo al extremo carboxilo, el lateral próximo al extremo amino presenta una estructura de elevado carácter hidrófobo, caracterizada por el entrelazamiento de dos secciones aminoacídicas (aa 95-107 y 140-148) en forma de cremallera (“dry zipper”).

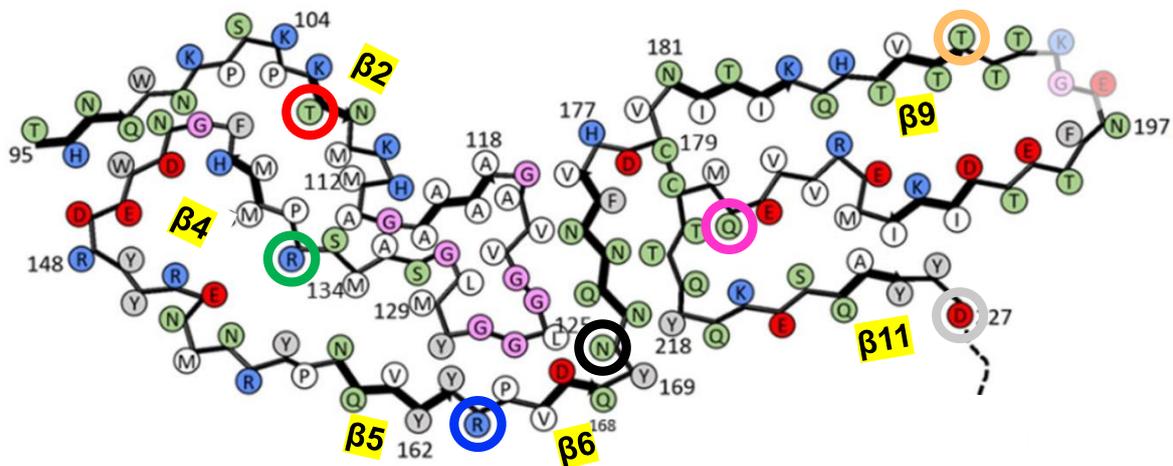


Figura 9: Monómero de PrP^{Sc} según el modelo PIRIBS: Versión esquemática anotada del monómero de PrP^{Sc}. Los enlaces gruesos indican la posición de una hebra- β , las de mayor interés se encuentran resaltadas. La posición de las mutaciones evaluadas se muestra con círculos coloreados, siguiendo el esquema de color: T107P, rojo; R136P, verde; R164P, azul; N170P, negro; T191P, naranja; Q212P, rosa y E227P, gris. Figura adaptada de Kraus et al (36).

Seguidamente, otra estructura relevante en la fibra de PrP^{Sc} es el motivo estructural greca (“Greek key”). Un motivo estructural terciario definido por cuatro hebras- β antiparalelas, que recuerda a los ornamentos griegos del mismo nombre (aa 112-134). Notablemente, las grecas son motivos estructurales comunes entre amiloides, destacando los presentes en α -sinucleína (53). De acuerdo con el modelo PIRIBS, los anclajes GPI se concentran en el lateral próximo al extremo COOH, infiriendo *-por primera vez-* que los amiloides priónicos se presentan paralelos a la extensión de la membrana celular externa. Sumando la naturaleza helicoidal de

las fibras amiloides, este hecho puede explicar las evaginaciones espirales de membrana comúnmente presentes en tejidos de individuos afectados por EET (54). Habiendo subrayado los detalles moleculares del modelo PIRIBS, se podrían explicar algunas razones por las que las rec-PrP basadas en las mutaciones T107P, R136P, N170P, T191P, Q212P y E227P no presentaron resistencia al malplegamiento (Figura 9).

La mutación T107P se localiza en la segunda hebra- β del modelo PIRIBS, es decir, inmediatamente posterior al motivo estructural “dry zipper” hidrófobo. Los motivos estructurales de tipo cremallera son relevantes en la formación de fibras priónicas y otros amiloides, asimismo, el papel de estos motivos en el proceso de transmisión interespecífica se ha descrito (55), pero en otras regiones de la proteína distintas a la del motivo “dry zipper”. Así, una posible explicación de la baja resistencia al malplegamiento de T107P podría ser que la mutación se encuentre adyacente al motivo “dry zipper” y no en su interior. De igual manera, al encontrarse en las inmediaciones del motivo, la mutación R136P se encuentra en una situación similar a T107P. En este caso, la mutación se presenta en las cercanías de la cuarta hebra- β y por ello, en una zona más interna del núcleo hidrófobo. La escasa resistencia al malplegamiento podría atribuirse a la elección de un residuo con escasas interacciones intramoleculares que dotarían integridad estructural a la fibra de PrP^{Sc}.

La mutación N170P se presenta entre los extremos no coplanarios del amiloide, en el inicio de la *zona de interfase* (séptima hebra- β). La escasa eficacia DN de esta rec-PrP resulta sorprendente, al pertenecer a una topología prometedora para la producción rec-PrP con cualidad DN. Diversos ensayos sugieren que los residuos de esta zona, correspondientes a un bucle de conformación semirrígida en la PrP^C (“rigid loop”), son determinantes en la transmisión de PrP^{Sc} entre especies (56). El modelo PIRIBS indica que la *zona de interfase* produce secciones protuberantes en las que cada monómero (N) interactúa con los monómeros inmediatamente anterior y posterior ($N\pm 1$, Figura 10). La escasa resistencia al malplegamiento

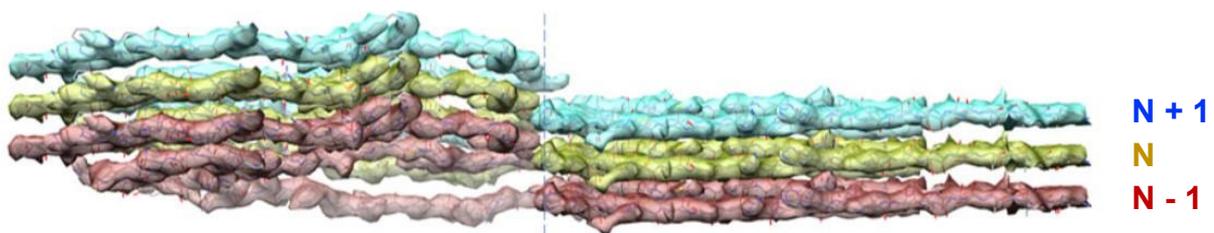


Figura 10: Zona de interfase y no coplanaridad: La *zona de interfase* posibilita la formación de secciones protuberantes y la no coplanaridad de los monómeros. Como se puede observar en la figura, el monómero N (amarillo) interactúa con los monómeros inmediatamente anterior y posterior ($N\pm 1$) en su zona central. Adicionalmente, se puede comprender la no coplanaridad de los monómeros, al estar los laterales de cualquiera de ellos en distintos planos. Figura adaptada de Kraus et al (36).

de la mutación N170P podría deberse a que no se presenta en el interior de la séptima hebra- β , donde específicamente se esperan el máximo número de interacciones intermoleculares. De tal manera, aun siendo parte del bucle rígido en la PrP^C, es posible que N170 no sea determinante en las interacciones que se establecen en la PrP^{Sc}, un hecho que no se había podido demostrar hasta la reciente publicación de los mapas crioeléctricos PIRIBS. Futuros ensayos *in silico* utilizando los datos por crio-EM podrían esclarecer esta situación.

En el caso de la mutación T191P, esta se presenta en el extremo final de la novena hebra- β del modelo PIRIBS, localizada en el lateral próximo al extremo carboxilo de la fibra amiloide. La escasa resistencia al malplegamiento de esta proteína probablemente se deba a una reducida influencia en la estabilización del monómero amiloide. Aun así, la zona es de especial interés al estar presente en las proximidades de los dos sitios de N-glicosilación de la proteína priónica, que también se han relacionado con el malplegamiento inducido dependiente de cepa (57). Al utilizar cepas de origen recombinante, por ello exentas de modificaciones postraduccionales, la ausencia de resistencia al malplegamiento también podría deberse al defecto de N-glicosilaciones. Al igual que en el caso anterior, la rec-PrP con la mutación Q212P, que está localizada a corta distancia del puente disulfuro, no presentó resistencia. La alteración de los residuos adyacentes al puente disulfuro resulta en la desestabilización de la forma amiloide priónica (58), pero, en ocasiones, estas modificaciones inducen también la desnaturalización de la estructura nativa (59). Los resultados de expresión y malplegamiento evidencian que la presencia de Q212P no es suficiente para desestabilizar ninguna de las dos isoformas. Por último, la mutación E227P presente inmediatamente después de la onceava hebra- β del modelo PIRIBS, en el extremo carboxilo del núcleo hidrófobo, mostró nula resistencia al malplegamiento. Similarmente al caso de T191P, las rec-PrP no poseen anclaje GPI por su naturaleza recombinante. La ausencia de esta estructura no posibilita conclusiones muy robustas sobre T191P y E227P, siendo ensayos *ex vivo* o *in vivo* más adecuados para su estudio.

Los resultados más llamativos los recoge la mutación R164P que, aun no impidiendo el malplegamiento espontáneo de rec-PrP, exhibió resistencia al malplegamiento inducido por seis cepas priónicas recombinantes. De manera similar a N170P, la mutación R164P se presenta en las inmediaciones del bucle semirrígido y la *zona de interfase* (entre la quinta y sexta hebra- β del modelo PIRIBS) una región de alto interés por su potencial papel en el fenómeno de conversión (60). La resistencia de R164P podría deberse a una incompatibilidad estructural entre la rec-PrP y las cepas priónicas utilizadas en el ensayo de malplegamiento inducido. Sumando los resultados de malplegamiento espontáneo, el malplegamiento de R164P podría resultar en una nueva conformación radicalmente distinta, pudiéndose tratar de una rec-PrP malplegada sin capacidad de generar EET *in vivo*, un fenómeno habitual en la

generación *in vitro* de amiloides (61) que requeriría de estudios *in vivo* para su esclarecimiento. Los mapas de densidad crioeléctrica, por otro lado, indican que la resistencia al malplegamiento de R164P podría deberse a la desestabilización de una sección protuberante clave durante el proceso de solapamiento de los monómeros amiloides. Teóricamente, al estar la quinta y sexta hebra- β únicamente separadas por dos aminoácidos, una mutación basada en prolina podría imposibilitar, simultáneamente, ambas dos estructuras secundarias e inducir en gran medida la desestabilización de la sección protuberante. Un hecho que desfavorecería la conformación amiloide sobre la nativa y acabaría induciendo resistencia al malplegamiento.

Nuevos avances en el mundo de la biología estructural están cambiando la manera en la que la comunidad científica estudia la estructura proteica. En el caso de la biología de los priones, la revolución de la resolución que aporta la crio-EM (62) ha permitido resolver la arquitectura de la fibra de PrP^{Sc} y posibilitar, por primer vez, una comprensión de las enfermedades priónicas a nivel atómico. Aunque la definición de los mecanismos moleculares, que otorgarían capacidad DN a R164P, requerirían de futuros experimentos, los resultados de este trabajo pueden utilizarse como punto de partida de otras investigaciones que avancen en esa dirección. Un proyecto de interés para el diseño de otras potenciales rec-PrP DN, podría ser la realización de un gran ensayo de mutagénesis dirigida mediante escaneo de prolina (*proline scan site-directed mutagenesis*). En este proyecto, mediante mutaciones secuenciales basadas en prolina, se detectarían los residuos aminoacídicos de mayor interés para la desestabilización de las fibras de PrP^{Sc}. Paralelamente, otro posible proyecto de elevado interés se basaría en la aplicación directa de la tecnología de crio-EM para el estudio de las anteriores fibras. Un trabajo que podría abordarse en el futuro cercano, gracias a la adquisición por la Universidad del País Vasco, de un microscopio crioeléctrico de última generación (Krios G4, Thermo Fisher). Finalmente, esto permitiría definir la *relación estructura-actividad* de las conformaciones estructurales de la proteína priónica y comprender los fenómenos de barrera de transmisión y de cepa.

6 CONCLUSIONES

1. Todas las rec-PrP diseñadas con potencial dominancia negativa se han plegado en su forma nativa para su posterior evaluación.
2. Ninguna de las rec-PrP diseñadas con potencial dominancia negativa han mostrado incapacidad para el malplegamiento espontáneo *in vitro*.
3. Una de las rec-PrP diseñadas, que contenía la mutación R164P, ha mostrado incapacidad para propagar ninguna de las seis cepas priónicas evaluadas. Esto demuestra la validez de un método, basado en estudios estructurales y moleculares, para el diseño y detección de rec-PrP con capacidad dominante negativa.

7 REFERENCIAS

1. Collinge, J. Prion diseases of humans and animals: Their causes and molecular basis. *Annual Review of Neuroscience* vol. 24 519-550 (2001).
2. Carleton Gajdusek, D. Transmissible and non-transmissible amyloidoses: autocatalytic post-translational conversion of host precursor proteins to β -pleated sheet configurations. *J. Neuroimmunol.* **20**, 95-110 (1988).
3. Aguzzi, A. & Calella, A. M. Prions: Protein Aggregation and Infectious Diseases. *Physiol. Rev.* **89**, 1105-1152 (2009).
4. Jucker, M. & Walker, L. C. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* **501**, 45-51 (2013).
5. Asher, D. M. & Gregori, L. Human transmissible spongiform encephalopathies: historic view. en *Handbook of Clinical Neurology* vol. 153 1-17 (Elsevier B.V., 2018).
6. Liberski, P. P. Historical overview of prion diseases: a view from afar. *Folia Neuropathol.* **50**, 1-12 (2012).
7. Prusiner, S. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-144 (1982).
8. Prusiner, S. Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**, 1515-1522 (1991).
9. Imran, M. & Mahmood, S. An overview of human prion diseases. *Viol. J.* **8**, 1-9 (2011).
10. Collins, S., McLean, C. A. & Masters, C. L. Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: A review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies. *J. Clin. Neurosci.* **8**, 387-397 (2001).
11. Collinge, J. Mammalian prions and their wider relevance in neurodegenerative diseases. *Nature* **539**, 217-226 (2016).
12. Puckett, C., Concannon, P., Casey, C. & Hood, L. Genomic structure of the human prion protein gene. *Am. J. Hum. Genet.* **49**, 320-9 (1991).
13. Wulf, M. A., Senatore, A. & Aguzzi, A. The biological function of the cellular prion protein: An update. *BMC Biol.* **15**, 1-13 (2017).
14. Chakrabarti, O., Ashok, A. & Hegde, R. S. Prion protein biosynthesis and its emerging role in neurodegeneration. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 287-295 (2009).
15. Prusiner, S. B. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 13363-13383 (1998).
16. Büeler, H. *et al.* Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**, 577-582 (1992).
17. Linden, R. *et al.* Physiology of the prion protein. *Physiol. Rev.* **88**, 673-728 (2008).
18. Collinge, J. *et al.* Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**, 295-297 (1994).
19. Bremer, J. *et al.* Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat. Neurosci.* **13**, 310-318 (2010).

20. Tobler, I. *et al.* Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**, 639-642 (1996).
21. Sánchez-Alavez, M., Conti, B., Moroncini, G. & Criado, J. R. Contributions of neuronal prion protein on sleep recovery and stress response following sleep deprivation. *Brain Res.* **1158**, 71-80 (2007).
22. Pan, K. M. *et al.* Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 10962-10966 (1993).
23. Bellingier-Kawahara, C., Cleaver, J. E., Diener, T. O. & Prusiner, S. B. Purified scrapie prions resist inactivation by UV irradiation. *J. Virol.* **61**, 159-166 (1987).
24. Safar, J., Roller, P. P., Gajdusek, D. C. & Gibbs, C. J. Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity. *Protein Sci.* **2**, 2206-2216 (1993).
25. McKinley, M. P., Bolton, D. C. & Prusiner, S. B. A protease-resistant protein is a structural component of the Scrapie prion. *Cell* **35**, 57-62 (1983).
26. Wüthrich, K. & Riek, R. Three-dimensional structures of prion proteins. *Adv. Protein Chem.* **57**, 55-82 (2001).
27. Zahn, R. The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site. *J. Mol. Biol.* **334**, 477-488 (2003).
28. Wopfner, F. *et al.* Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein 1 Edited by A. R. Fersht. *J. Mol. Biol.* **289**, 1163-1178 (1999).
29. Zahn, R. *et al.* NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 145-150 (2000).
30. Viles, J. H. *et al.* Local structural plasticity of the prion protein. Analysis of NMR relaxation dynamics. *Biochemistry* **40**, 2743-2753 (2001).
31. Rudd, P. M., Wormald, M. R., Wing, D. R., Prusiner, S. B. & Dwek, R. A. Current Topics Prion Glycoprotein : Structure , Dynamics , and Roles for the Sugars. *Society* **40**, (2001).
32. Toyama, B. H. & Weissman, J. S. Amyloid Structure: Conformational Diversity and Consequences. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 557-585 (2011).
33. Vázquez-Fernández, E., Young, H. S., Requena, J. R. & Wille, H. The Structure of Mammalian Prions and Their Aggregates. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **329**, 277-301 (2017).
34. Chiti, F. & Dobson, C. Amyloid Formation, Protein Homeostasis, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 1-42 (2017).
35. Vázquez-Fernández, E. *et al.* The Structural Architecture of an Infectious Mammalian Prion Using Electron Cryomicroscopy. *PLoS Pathog.* **12**, 1-21 (2016).
36. Groveman, B. R. *et al.* Parallel in-register intermolecular β -sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids. *J. Biol. Chem.* **289**, 24129-24142 (2014).

37. Kraus, A. *et al.* Structure of an infectious mammalian prion. *bioRxiv [Preprint]* (2021) doi:doi.org/10.1101/2021.02.14.431014.
38. Scialò, C., De Cecco, E., Manganotti, P. & Legname, G. Prion and prion-like protein strains: Deciphering the molecular basis of heterogeneity in neurodegeneration. *Viruses* **11**, 1-37 (2019).
39. Colby, D. W. & Prusiner, S. B. De novo generation of prion strains. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 771-777 (2011).
40. Priola, S. A. Species Barriers in Prion Disease. en *Prions and Diseases* vol. 2 139-154 (Springer New York, 2013).
41. Collinge, J. & Clarke, A. R. A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science* **318**, 930-936 (2007).
42. Sheppard, D. Dominant negative mutants: tools for the study of protein function *in vitro* and *in vivo*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **11**, 1-6 (1994).
43. Li, S. C., Goto, N. K., Williams, K. A. & Deber, C. M. α -Helical, but not β -sheet, propensity of proline is determined by peptide environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 6676-6681 (1996).
44. Watts, J. C. *et al.* Evidence That Bank Vole PrP Is a Universal Acceptor for Prions. *PLoS Pathog.* **10**, (2014).
45. Saborio, G. P., Permanne, B. & Soto, C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* **411**, 810-813 (2001).
46. Ferreira, N. do C. & Caughey, B. Proteopathic Seed Amplification Assays for Neurodegenerative Disorders. *Clin. Lab. Med.* **40**, 257-270 (2020).
47. Castilla, J., Saá, P., Hetz, C. & Soto, C. *In vitro* Generation of Infectious Scrapie Prions. *Cell* **121**, 195-206 (2005).
48. Eraña, H. *et al.* Development of a new largely scalable *in vitro* prion propagation method for the production of infectious recombinant prions for high resolution structural studies. *PLoS Pathogens* vol. 15 (2019).
49. Berrow, N. S. *et al.* A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. *Nucleic Acids Res.* **35**, e45-e45 (2007).
50. Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28 (1990).
51. Arshad, H., Bourkas, M. E. C. & Watts, J. C. The utility of bank voles for studying prion disease. en *Progress in Molecular Biology and Translational Science* vol. 175 179-211 (Elsevier B.V., 2020).
52. Perrier, V. *et al.* Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13079-13084 (2002).
53. Tuttle, M. D. *et al.* Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human

- α -synuclein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 409-415 (2016).
54. Jeffrey, M. Review: Membrane-associated misfolded protein propagation in natural transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), synthetic prion diseases and Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **39**, 196-216 (2013).
 55. Zhang, Y. *et al.* Dual amyloid cross-seeding reveals steric zipper-facilitated fibrillization and pathological links between protein misfolding diseases. *J. Mater. Chem. B* **9**, 3300-3316 (2021).
 56. Kurt, T. D. *et al.* Prion transmission prevented by modifying the β 2- α 2 loop structure of host PrPC. *J. Neurosci.* **34**, 1022-1027 (2014).
 57. Burke, C. M. *et al.* Cofactor and glycosylation preferences for *in vitro* prion conversion are predominantly determined by strain conformation. *PLoS Pathog.* **16**, 1-21 (2020).
 58. Honda, R. Role of the Disulfide Bond in Prion Protein Amyloid Formation: A Thermodynamic and Kinetic Analysis. *Biophys. J.* **114**, 885-892 (2018).
 59. Maiti, N. R. & Surewicz, W. K. The Role of Disulfide Bridge in the Folding and Stability of the Recombinant Human Prion Protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 2427-2431 (2001).
 60. Kurt, T. D., Jiang, L., Bett, C., Eisenberg, D. & Sigurdson, C. J. A proposed mechanism for the promotion of prion conversion involving a strictly conserved tyrosine residue in the α 2- β 2 loop of PrPC. *J. Biol. Chem.* **289**, 10660-10667 (2014).
 61. Ziaunys, M., Sneideris, T. & Smirnovas, V. Formation of distinct prion protein amyloid fibrils under identical experimental conditions. *Sci. Rep.* **10**, 4572 (2020).
 62. Blundell, T. L. & Chaplin, A. K. The resolution revolution in X-ray diffraction, Cryo-EM and other Technologies. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* vol. 160 2-4 (2021).