

ARTÍCULOS DE REVISIÓN REVIEW ARTICLES

Encefalopatías espongiformes transmisibles. Bases moleculares, diagnóstico y perspectivas terapéuticas

*Transmissible spongiform encephalopathies. Molecular biology, diagnosis
and therapeutic approaches*

VARGAS AM, SALTO R, SOLA MM, HORTELANO P.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia.
Universidad de Granada. 18071 Granada. España.

RESUMEN

Las encefalopatías espongiformes transmisibles constituyen un grupo de enfermedades neurodegenerativas que están asociadas a la presencia en el tejido nervioso de agregados insolubles constituidos por una isoforma anómala de una proteína denominada prión. Esta isoforma se produce por un cambio conformacional en una molécula que puede transmitirse a otras proteínas priónicas normales. Las proteínas modificadas pierden su actividad biológica, desencadenándose la muerte de las neuronas por apoptosis. Los cambios conformacionales de los priones que derivan en enfermedad pueden deberse a la existencia de mutaciones que disminuyan la estabilidad de las formas celulares. Existe susceptibilidad genética, por tanto, a padecer tipos hereditarios de la enfermedad o adquiridos por infección con isoformas priónicas anormales. En la actualidad se están perfeccionando métodos sensibles de diagnóstico basados en la detección de las isoformas anormales de la proteína priónica. Todavía no existen tratamientos curativos para estas enfermedades aunque se están diseñando métodos terapéuticos que bloqueen los cambios conformacionales que conducen a la precipitación de la proteína priónica.

PALABRAS CLAVE: Prión. Gen. Polimorfismos de DNA. Conformación de proteínas. Enfermedades Neurodegenerativas. Marcadores moleculares. Diseño de fármacos.

ABSTRACT

Transmissible spongiform encephalopathies constitute a group of neurodegenerative diseases associated to the presence in nervous tissue of insoluble aggregates originated by an anomalous isoform of a protein called prion. This isoform is produced by a conformational change in a molecule which is transmitted to normal prion proteins. Modified proteins lose their biological activity, provoking apoptotic death of neurons. Conformational changes of prions occasioning the illness can be due to the existence of mutations diminishing the stability of cellular forms. There is genetic susceptibility for suffering any type of the illness, either hereditary or acquired by infection with abnormal prion isoforms. New sensitive diagnostic methods are presently being developed, based on detection of abnormal isoforms of prion protein. There are no curative treatments for these illnesses, although new therapeutic strategies based on the blockage of conformational changes driving to protein precipitation are being designed.

KEY WORDS: Prion. Gen. DNA polymorphisms. Protein conformation. Neurodegenerative diseases. Molecular markers. Drug desing.

INTRODUCCIÓN

El primer diagnóstico en la década de los 80 en el Reino Unido de la encefalitis espongiiforme bovina, comúnmente conocida como enfermedad de las vacas locas, y la posterior demostración de que puede transmitirse a la especie humana, levantaron una gran preocupación pública sobre ésta y otras enfermedades relacionadas que en conjunto se denominan encefalopatías espongiiformes transmisibles.

Las encefalopatías espongiiformes transmisibles son enfermedades mortales causadas por conformaciones anormales de una proteína denominada prión que se deposita formando placas amiloides en determinados órganos, principalmente en el cerebro. El nombre de prión deriva de proteína infecciosa. Constituyó un gran hito bioquímico el descubrimiento de que una proteína puede provocar y transmitir una enfermedad sin necesidad de ácidos nucleicos (Prusiner, 1995).

Se conocen distintas enfermedades de este tipo que afectan a la especie humana, a muchos mamíferos de interés agropecuario como ovejas, cabras y vacas, y a otros domésticos como los gatos o salvajes como ciervos, visones y alces, además de a diversos animales que viven en cautividad en los parques zoológicos. Las sospechas posteriormente confirmadas de que estas enfermedades son infecciosas y de que pueden ser transmitidas de unas especies a otras, y sobre todo que puede ser transmitida por el consumo de animales enfermos, potenciaron las investigaciones científicas sobre todos los aspectos relacionados con los priones.

Los priones son glucoproteínas de membrana que se anclan a la misma por una molécula de glicosil-fosfatidil-inositol y cumplen funciones biológicas todavía no bien conocidas. Las isoformas celulares normales se nombran como PrP^C y las isoformas patológicas como PrP^{Sc}, correspondiendo las siglas Sc a "scrapie", una enfermedad priónica padecida por ovejas y cabras que en español se conoce como "tembladera".

ESTRUCTURA DE LOS PRIONES

La proteína priónica humana está codificada por un gen del cromosoma 20 que contiene dos exones separados por un intrón de 10 kilobases. El primer exón no codificante es de 56 a 82

INTRODUCTION

The first diagnosis in the eighties in the United Kingdom of bovine spongiform encephalitis, commonly known as mad-cow disease, and the later demonstration that it can be transmitted to the human species, raised a great public concern on this and other related diseases, as a whole named as transmissible spongiform encephalopathies.

Transmissible spongiform encephalopathies are mortal diseases caused mainly by abnormal conformations of a protein called prion that are deposited in certain organs, principally in the brain, forming amyloid deposits. The name of prion comes from "proteinaceous infectious particles". The discovery that a protein can be the cause and can transmit a disease without need of nucleic acids constituted a great biochemical finding (Prusiner, 1995).

Different diseases of this type are known affecting human species, many mammals of agricultural interest as sheep, goats and cows, and other domestic animals as cats or wild as deer, minks and elks, further to diverse animals living in captivity in zoological parks. Suspicions concerning the infections origin of these diseases were confirmed. They can be transmitted from one species to other, mainly by the consumption of sick animals. These findings stimulated scientific investigations on all aspects related to prions.

Prions are membrane glycoproteins anchored by a glycosil-phosphatidyl-inositol molecule, which have biological functions not well-known still. Normal cellular isoforms are named as PrP^C and pathological as PrP^{Sc}, Sc initials corresponding to "scrapie", a prion disease suffered by sheep and goats that is known in Spanish as "tembladera."

STRUCTURE OF PRIONS

The human prion is codified by a gene of the chromosome 20 that contains two exons separated by an intron of 10 kilobases. The first non coding exon is from 56 to 82 base pairs and the second presents an unique open reading frame of 2 kilobases. The nucleotide sequence of the cDNA (Kretzschmar *et al.* 1986) and that of the coded amino acids are shown in the figure 1. The protein has a disulfide bridge between residues 179

pares de bases y el segundo presenta un único marco abierto de lectura de 2 kilobases. La secuencia nucleotídica del cDNA (Kretzschmar *et al.* 1986) y la de los aminoácidos codificados se muestran en la Figura 1. La proteína posee un enlace por puente disulfuro entre los residuos 179 y 214, contiene dos sitios para N-glicosilación y cuatro repeticiones de 8 aminoácidos que pueden ligar cobre (Basler *et al.* 1986). Bajo condiciones fisiológicas las células sintetizan la proteína PrP^C con un péptido señal hidrofóbico (residuos 1-22) que la dirige al retículo endoplásmico, donde se unen sendos carbohidratos a las asparaginas 181 y 197, se añade una molécula de glicosil-fosfatidil-inositol al resto 231 y se eliminan 23 restos aminoácidos del extremo carboxilo (Stahl *et al.* 1990). Finalmente es remodelada en el aparato de Golgi en su tránsito hacia la superficie celular (Endo *et al.* 1989). La mayoría de la proteína celular PrP^C termina anclada a la membrana plasmática por el resto de glicosil-fosfatidil-inositol, orientada hacia el espacio extracelular.

Se han descrito numerosas variantes en esta secuencia que dan lugar a muchos polimorfismos. Algunas de las mutaciones que se conoce que predisponen o que ocasionan enfermedades hereditarias están resaltadas en la Figura 1.

Se han determinado por resonancia magnética nuclear las estructuras de las formas celulares del prión de ratón (Riek *et al.* 1998), hamster (Liu *et al.* 1999), humano (Zahn *et al.* 2000) y bovino (López-García *et al.* 2000). Básicamente las estructuras son muy semejantes, aunque la mayor similitud se presenta entre los priones humano y bovino. Las secuencias de aminoácidos de estas dos proteínas se comparan en la Figura 2. Todos los priones estudiados presentan una cola N-terminal no estructurada de unos 100 residuos y un dominio globular en el que existen tres hélices α (residuos 144-154, 173-194 y 200-226) y dos cortas secuencias con estructura β (residuos 128-131 y 161-164). La hélice 1 se caracteriza por poseer una secuencia muy inusual ya que está compuesta exclusivamente por residuos hidrofílicos por lo que no puede establecer interacciones hidrofóbicas que estabilicen la estructura terciaria (Morrissey y Shakhnovich, 1999). Esta propiedad determina que la hélice 1 desempeñe un papel fundamental en la infectividad de los priones.

and 214. It contains two N-glycosylation sites and four repetitions of eight copper-binding amino acids (Basler *et al.* 1986). Under physiologic conditions, cells synthesize the protein PrP^C with a hydrophobic signal peptide (residues 1-22) that directs it to the endoplasmic reticulum, where two carbohydrates are bound to asparagines 181 and 197, a glycosyl-phosphatidylinositol molecule is added to residue 231 and 23 amino acids of the carboxylic end are eliminated (Stahl *et al.* 1990). Finally, the protein is remodelled in the Golgi apparatus in its way towards the cellular surface (Endo *et al.* 1989). Most of the cellular protein PrP^C finishes anchored to the plasmatic membrane by the glycosyl-phosphatidylinositol molecule, facing the extracellular space.

Numerous variants in this sequence has been described giving many different polymorphisms. Some of the known mutations that predispose or cause hereditary diseases are shown in the figure 1.

The structures of the mouse (Riek *et al.* 1998), hamster (Liu *et al.* 1999), human (Zahn *et al.* 2000) and bovine (López-García *et al.* 2000) prions have been determined by nuclear magnetic resonance. Basically, the structures are very similar, although the strongest similarity is presented among human and bovine prions. Amino acid sequences of these two proteins are compared in the Figure 2. All the studied prions present a not structured N-terminal end of about 100 residues, a globular domain in which three α helices exist (residues 144-154, 173-194 and 200-226) and two short sequences with β structure (residues 128-131 and 161-164). The helix 1 is characterised by a very unusual sequence since it is composed exclusively by hydrophilic residues, thus hydrophobic interactions stabilising tertiary structure cannot establish (Morrissey and Shakhnovich, 1999). This characteristic determines that the helix 1 can play a fundamental part in the infectivity of prions.

Cellular and pathological isoforms of the prions share a common sequence and the same pattern of post-translational modifications although they differ in essential structural aspects.

Although the structure of PrP^{Sc} has not been definitively established yet, it is known that the protein acquires a great content in β structure that is stabilised by the formation of salt bridges among different chains, settling down aggregates that precipitate in a way similar to the amyloid

FIGURA 1.- Secuencias del cDNA y de los aminoácidos correspondientes en el gen PrP humano. Algunas de las mutaciones descritas en la secuencia de aminoácidos que provocan algún tipo de enfermedad se muestran resaltadas en gris. Los guiones representan deleciones.

FIGURE 1.- cDNA sequence and corresponding amino acids to the human PrP gen. Several described mutations within amino acids sequence, causing different diseases, are shown in grey squares. Deletions are represented by dashes.

```

1  atg gcg aac ctt ggc tgc tgg atg ctg gtt ctc ttt gtg gcc aca tgg agt gac ctg ggc
   M  A  N  L  G  C  W  M  L  V  L  F  V  A  T  W  S  D  L  G

61  ctc tgc aag aag cgc ccg aag cct gga gga tgg aac act ggg ggc agc cga tac ccg ggg
   L  C  K  K  R  P  K  P  G  G  W  N  T  G  G  S  R  Y  P  G

121 cag ggc agc cct gga ggc aac cgc tac cca cct cag ggc ggt ggt ggc tgg ggg cag cct
   Q  G  S  P  G  G  N  R  Y  P  P  Q  G  G  G  G  W  G  Q  P

181 cat ggt ggt ggc tgg ggg cag cct cat ggt ggt ggc tgg ggg cag ccc cat ggt ggt ggc
   H  G  G  G  W  G  Q  P  H  G  G  G  W  G  Q  P  P  H  G  G  G
   -  -  -  -  -

241 tgg ggg cag cct cat ggt ggt ggc tgg ggt caa gga ggt ggc acc cac agt cag tgg aac
   W  G  Q  P  H  G  G  G  W  G  Q  G  G  G  T  H  S  Q  W  N
   -  -  -  -

301 aag ccg agt aag cca aaa acc aac atg aag cac atg gct ggt gct gca gca gct ggg gca
   K  P  S  K  P  K  T  N  M  K  H  M  A  G  A  A  A  A  A  G  A
   L  L  L  V

361 gtg gtg ggg ggc ctt ggc ggc tac atg ctg gga agt gcc atg agc agg ccc atc ata cat
   V  V  G  G  L  G  G  Y  M  L  G  S  A  M  S  R  P  I  I  H
   V

421 ttc ggc agt gac tat gag gac cgt tac tat cgt gaa aac atg cac cgt tac ccc aac caa
   F  G  S  D  Y  E  D  R  Y  Y  R  E  N  M  H  R  Y  P  N  Q
   Fin Fin

481 gtg tac tac agg ccc atg gat gag tac agc aac cag aac aac ttt gtg cac gac tgc gtc
   V  Y  Y  R  P  M  D  E  Y  S  N  Q  N  N  F  V  H  D  C  V
   S  S  I

541 aat atc aca atc aag cag cac acg gtc acc aca acc acc aag ggg gag aac ttc acc gag
   N  I  T  I  K  Q  H  T  V  T  T  T  T  K  G  E  N  F  T  E
   A  R  RK  S  K

601 acc gac gtt aag atg atg gag cgc gtg gtt gag cag atg tgt atc acc cag tac gag agg
   T  D  V  K  M  M  E  R  V  V  E  Q  M  C  I  T  Q  Y  E  R
   N  A  H  I  Q  P

661 gaa tct cag gcc tat tac cag aga gga tcg agc atg gtc ctc ttg tcc tct cca cct gtg
   E  S  Q  A  Y  Y  Q  R  G  S  S  M  V  L  F  S  S  P  P  V
   R

721 atc ctc ctg atc tct ttc ctc atc ttc ctg ata gtg gga tga
   I  L  L  I  S  F  L  I  F  L  I  V  G
    
```

FIGURA 2.- Secuencias de las proteínas priónicas humana y bovina. Las secuencias se han alineado para mostrar su similitud. Los restos de aminoácidos comunes a ambas secuencias se muestran resaltados en gris.

FIGURE 2.- Sequences of human and bovine prion proteins. Sequences have been aligned to show similarities. Identical amino acids in both sequences are shown in grey squares.

```

Humano  MANLGCWM. .LVLFVATWSDLGLCKKRPKP. GGWNTGGSRYPGQSPGGNRYPQGGGGWGQPHGGGW
Bovino  MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQSPGGNRYPQGGGGWGQPHGGGW

Humano  GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGG. WGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGS
Bovino  GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGG. SHSQWNKPSKPKTNMKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGS

Humano  AMSRPIIHFSGSDYEDRYRENMHRYPNQVYRPMDEYSNQNNFVHDCVNIITIKQHTVTTTTTKGENFTE
Bovino  AMSRPLIRFGNDYEDRYRENMYRYPNQVYRPMVDQYSNQNNFVHDCVNIITVKQHTVTTTTTKGENFTE

Humano  TDVKMMERVVEQMCITQYERESQAYYQRGSSMVLFSPPVILLISFLIFLIVG
Bovino  TDLKIMERVVEQMCITQYQRESQAYYQRGASVILFSPPVILLISFLIFLIVG
    
```

Las isoformas celulares y patológicas de los priones comparten una secuencia común y el mismo patrón de modificaciones postraduccionales pero difieren en aspectos estructurales esenciales.

Aunque no se ha podido todavía establecer definitivamente la estructura de PrP^{Sc}, se sabe que la proteína adquiere un gran contenido en estructura de hoja plegada β que resulta estabilizada por la formación de puentes salinos entre diferentes cadenas, estableciéndose agregados que precipitan de una manera semejante a la proteína amiloide. La hélice hidrofílica 1 desempeña un papel crucial en esta transformación pues su conformación puede ser modificada por interacción con otra proteína que la induce a adquirir conformación β (Morrissey and Shakhnovich, 1999). Una molécula de PrP^{Sc} puede inducir el plegamiento anómalo de muchas moléculas de PrP^C que formarían agregados proteicos. Así, se ha demostrado que cuando se mezclan en un tubo de ensayo PrP^C y PrP^{Sc}, la proteína anormal dirige la conversión de la proteína celular en patológica modificando su estructura secundaria (Caughey *et al.* 1995). No obstante, experimentos *in vivo* con ratones transgénicos indican que para que se produzca el cambio de un estado conformacional al otro es necesario el concurso de una molécula posiblemente proteica que se conoce como proteína X (Perrier *et al.* 2000) (Figura 3). La conversión de PrP^C en PrP^{Sc} es dependiente de la estructura primaria de la proteína, por lo que individuos con determinados polimorfismos son más susceptibles que otros a desarrollar la enfermedad.

Es importante señalar que los agregados proteicos resultan parcialmente resistentes a la acción de diferentes proteasas que tras su acción dejan sin digerir el fragmento correspondiente a los aminoácidos 90 a 231.

FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LOS PRIONES

Aunque las enfermedades priónicas podrían ser causadas por la falta de PrP^C que impediría su actividad biológica o por las lesiones provocadas por los depósitos amiloides que se generan cuando PrP^C se transforma en PrP^{Sc}, hoy día parece claro que es la ausencia de la forma celular del prión la responsable de las patologías.

The hydrophilic helix 1 plays a crucial role in this transformation modifying its secondary structure to a β folded sheet (Morrissey and Shakhnovich, 1999). One PrP^{Sc} molecule may induce the abnormal folding of many PrP^C forming protein aggregates. It has been demonstrated that, when PrP^C and PrP^{Sc} are mixed in a test tube, the abnormal protein directs the conversion of the cellular protein into the pathological isoform modifying its secondary structure (Caughey *et al.* 1995). Nevertheless, experiments *in vivo* with transgenic mice indicate that a new molecule, probably a protein, is necessary for the change from an isoform to another. This molecule is known as protein X (Perrier *et al.* 2000) (Figure 3). Conversion of PrP^C into PrP^{Sc} is dependent on the primary structure of the protein which implies that individuals having the different polymorphisms have variable susceptibility to suffer the disease.

It is important to point out that these protein aggregates are partially resistant to the action of different proteases that will leave undigested the fragment corresponding to the aminoacids 90 at 231.

BIOLOGICAL FUNCTIONS OF THE PRIONS

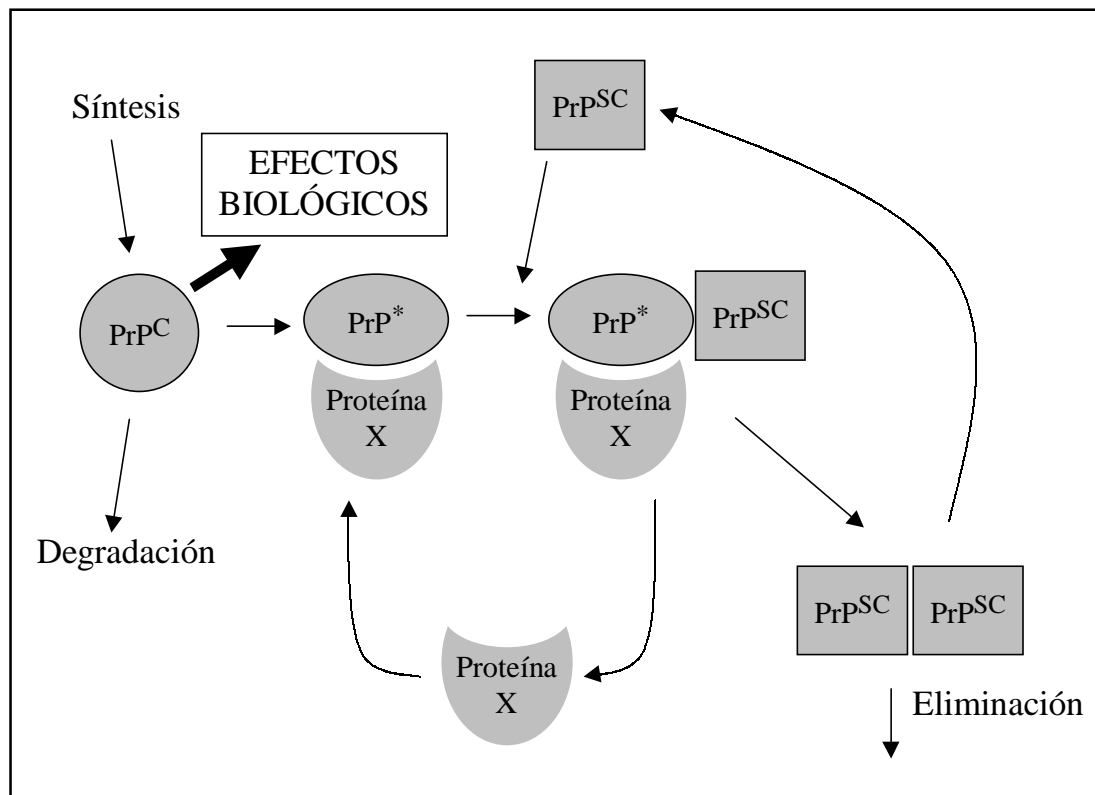
Prions diseases may be originated either by the lack of PrP^C that determines absence of its biological activity or for the lesions caused by the amyloid deposits generated when PrP^C becomes PrP^{Sc}. Nowadays, it seems clear that the absence of the cellular isoform of the prion is responsible for the pathologies.

The biological functions of PrP^C have not been clarified, although several hypothesis have been proposed. The four octarepetitions of copper-binding amino acids and the recent discovery that the protein possesses superoxide dismutase activity (Brown *et al.* 1999) seem to suggest a function in antioxidant defence. Essential roles in the synapses have also been proposed (Brown, 2001), as well as in membrane transduction signal pathways related to apoptosis (Thellung *et al.* 2000).

Anyway, it appears that the loss of function of PrP^C by conversion into PrP^{Sc} directs the cells to apoptotic death. When this happens in tissues with null or little capacity of cellular proliferation as is the nervous tissue, the loss of neuro-

FIGURA 3.- Modelo para la formación de PrP^{SC} y estrategias para el diseño de drogas.
Adaptado de Perrier *et al.* 2000.

FIGURE 3.- Model of PrP^{SC} formation and strategies for drug design. Adapted from Perrier *et al.* 2000.



La función biológica de PrP^C todavía no ha podido ser establecida con claridad, aunque se han propuesto varias hipótesis. Las cuatro octa-repeticiones de aminoácidos con capacidad para unir cobre y que recientemente se ha encontrado que la proteína posee actividad superóxido dismutasa (Brown *et al.* 1999) parecen sugerir un papel en la defensa antioxidante. También se han asignado a la proteína papeles esenciales en la sinapsis (Brown, 2001) y en rutas de transducción de señales de membrana relacionadas con la apoptosis (Thellung *et al.* 2000).

En cualquier caso, parece que la pérdida de función de PrP^C por su conversión en PrP^{SC} dirige a las células a la muerte por apoptosis. Cuando esto ocurre en tejidos con nula o poca capacidad de proliferación celular como el tejido nervioso, la pérdida de neuronas, principalmente de células de Purkinje en el encéfalo, produce huecos que microscópicamente confieren un aspecto esponjiforme al tejido, lo que da nombre a este tipo de enfermedades.

nes, mainly of Purkinje cells in the encephalon, produces holes that microscopically confer an spongiform aspect to the tissue, giving name to this type of diseases.

PRION DISEASES IN ANIMALS

The most common form of spongiform encephalitis in animals is the “tembladera” or scrapie suffered by sheep and goats. The disease produces loss of coordination in movements, tremor in neck and head and itch sensation. Animals scratch driving sheep to lose the wool, a very characteristic sign. Although the scrapie has been known for several hundreds of years, it was only in 1982 when prions were recognised as decisive agents of the illness (Prusiner, 1982). Other encephalopathies happen in deer, minks and felines. Bovine spongiform encephalitis is the most recent form of a prion disease, which has produced a great epidemic in bovine livestock in the

ENFERMEDADES PRIÓNICAS EN ANIMALES

La forma más común de encefalitis espongi-forme en animales es la tembladera o scrapie padecida por ovejas y cabras. La enfermedad produce pérdida de coordinación de los movimientos, temblor en cuello y cabeza y sensación de picor por lo que los animales se rascan llegando las ovejas a perder la lana, un signo muy característico. Aunque la tembladera se conoce desde hace varios cientos de años, no fue hasta 1982 cuando se reconoció a los priones como agentes determinantes de la enfermedad (Prusiner, 1982). Otras encefalopatías ocurren en venados, visones y felinos. La encefalitis espongi-forme bovina es la forma más reciente de enfermedad priónica que ha producido una gran epidemia en el ganado vacuno en el Reino Unido, habiéndose extendido también a otros países de Europa. La diseminación de la epidemia ha sido debida al uso de piensos con harinas de procedencia animal para incrementar el rendimiento de las granjas. Muy posiblemente los cambios introducidos en los procedimientos industriales para la elaboración de las harinas, entre ellos una disminución drástica de la temperatura para eliminar las grasas de los despojos utilizados, propiciaron que los priones patológicos presentes en restos de ovejas o cabras con tembladera permanecieran activos en los piensos para el ganado.

Durante mucho tiempo se había creído que la enfermedad no podía transmitirse de unas especies a otras por la existencia de barreras entre las especies. Hoy está bien establecido que cuanto mayor sea la similitud estructural entre los priones de dos especies diferentes más probable es la infección interespecífica. De hecho, la similitud entre los priones humano y bovino ha permitido la transmisión de la enfermedad de las vacas locas al hombre.

ENFERMEDADES PRIÓNICAS EN HUMANOS

Existen varias enfermedades en el hombre causadas por isoformas anormales de proteínas priónicas. La más común, una persona por millón, es la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob que se manifiesta a edades próximas a los 60 años y

United Kingdom, being also extended to other european countries. The dissemination of the epidemic has been originated by breeding with animal origin flours in order to increase the yield of the farms. Very possibly, changes introduced in the industrial procedures for the elaboration of flours, among them a drastic decrease in temperature to eliminate fat in the used spoils, propitiated that pathological prions present in carcasses from sheep or goats with scrapie remained active in the livestock food.

For a long time the disease was considered as non-transmissible from one species to another due to the existence of species-barriers. Today it is well established that as closer the prion structure between different species, as probable is the interspecies infection. In fact, the similarity between human and bovine prions has allowed the transmission of the disease from mad-cows to the human species.

PRION DISEASES IN HUMANS

Several diseases exist in man caused by abnormal isoforms of prion proteins. The most common, a person in a million, is the Creutzfeldt-Jakob disease that is manifested in persons over 60 years old. Around 10% or 15% of cases are inherited, indicating the transmission of gene mutations affecting the stability of PrP^C. Sometimes, the origin of the disease is iatrogenic; several cases of transmission through administration of growth hormone obtained from pituitary from sick individuals have been demonstrated. Transplant of sick tissues such as cornea and duramater, installation of electrodes in the brain or the use of contaminated surgical instruments, can also be origins of infection.

In 1957 a disease suffered by indigenous of the Fore tribes in New Guinea was described, the kuru, a fatal disease characterised by loss of coordination and dementia. This disease is practically eradicated since practices of ritual cannibalism have been suppressed. This illness could have its origin in an individual mutation, transmitted when eating the sick brain of the deceased. Other prion diseases in man are the German-Sträussler-Scheinker disease (Schlote *et al.* 1980) and the fatal familial insomnia (Lugaresi *et al.* 1986). The syndrome of Alper is the name received by prion diseases in children.

curso con demencia. Entre el 10% y el 15% de los casos tienen un origen genético, lo que indica la transmisión de mutaciones génicas que afectan a la estabilidad de Pr^{PC}. A veces, el origen de la enfermedad es iatrogénico, habiéndose demostrado casos de transmisión por administración de hormona del crecimiento obtenida de pituitaria de algún individuo enfermo, por trasplante de tejidos enfermos como córnea y dura madre, o por la implantación en el cerebro de electrodos o el uso de materiales quirúrgicos contaminados.

En el año 1957 se describió una enfermedad padecida por indígenas de las tribus Fore en Nueva Guinea, el kuru, que cursaba con pérdida de coordinación y demencia. Se considera que esta enfermedad está erradicada desde que se suprimieron las prácticas de canibalismo ritual de estos pueblos. El kuru pudo tener su origen en una mutación individual que se transmitiera al comer el cerebro enfermo de los difuntos. Otras enfermedades priónicas en el hombre son la de German-Sträussler-Scheinker (Schlote *et al.* 1980) y el insomnio familiar fatal (Lugaresi *et al.* 1986). El síndrome de Alper es el nombre que reciben las enfermedades priónicas en niños.

Cada una de estas enfermedades está originada por la existencia de diferentes mutaciones en el gen que codifica al prión humano. Actualmente se conocen, además de la delección de una de las octarrepeticiones, más de 50 mutaciones puntuales que producen codones de parada o sustituciones de aminoácidos y provocan enfermedad (Figura 1). La mayoría de las mutaciones descubiertas están en las regiones helicoidales o en sus bordes por lo que se cree que la inserción de aminoácidos anormales en estas zonas podría desestabilizar la estructura secundaria en hélice y favorecer la formación de estructuras β que, como se ha descrito anteriormente, tienden a precipitar como placas amiloides.

La enfermedad de las vacas locas, transmitida al hombre por la ingestión de productos bovinos contaminados, ha originado la llamada nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (nvCJD). Aparentemente hay susceptibilidad genética para la aparición de la enfermedad en humanos ya que, hasta el momento, todos los pacientes de la misma son homocigotos para metionina en el codón 129, uno de los codones polimórficos. La nvCJD difiere de la enfermedad clásica, además de que los síntomas clínicos

Each of these diseases is originated by the existence of different mutations in the gene that codes for human prion. At the moment, besides the deletion of one of the octarepetitions, more than 50 punctual mutations originating a stop codon or amino acids substitutions causing illness are known (Figures 1). Most of the discovered mutations are in the helical regions or in their borders. The insert of these abnormal amino acids destabilize secondary structure favoring the formation of β structures, and provoking precipitation as amyloid deposits. These illnesses present particular symptoms helping to clinical diagnosis.

The illness of mad cows, transmitted to man by the ingestion of polluted bovine products, has originated the so-called new variant of Creutzfeldt-Jakob disease (nvCJD). Seemingly there is genetic susceptibility for developing the illness in humans since up to the moment, all patients suffering the disease are homozygotes for methionine in codon 129, one of the polymorphic codons. The nvCJD differs from classic illness, in the age of appearance of clinical symptoms, which take place in youth, and in the appearance of pathological prions in the lymphoid tissue out of central nervous system, indicating routes of prion transfer through circulating lymphocytes (Ironside 1998).

DIAGNOSIS OF PRION DISEASES

The diagnosis of these diseases is carried out by symptoms and certain medical tests as is the electroencephalogram obviously. Nevertheless, definite confirmation depends on anatomopathologic examination of brain samples taken by biopsy or in post-mortem autopsy. Classic results are the observation of the spongiform aspect, which is very marked in the basal ganglion, the existence of multiple amyloid badges in brain and cerebellum, astrocytosis of brain cortex and of cerebellum and severe gliosis of the thalamus. Symptomatology and neuropathologic analysis are characteristic in each different human disease.

The use of image technics as nuclear magnetic resonance constitutes a great help for the diagnosis. At the moment it seems that magnetic resonance spectroscopy of protons is more precise than photon emission computerised tomography (Konaka *et al.* 2000).

aparecen en la juventud, en que se encuentran priones patológicos en el tejido linfoide fuera del sistema nervioso central, lo que es indicativo de que hay rutas de transferencia de priones hasta el cerebro a través de linfocitos circulantes (Ironside, 1998).

DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES PRIÓNICAS

El diagnóstico de estas enfermedades se realiza atendiendo a la sintomatología y a ciertas pruebas médicas entre las que se incluye obviamente el electroencefalograma. No obstante, la confirmación definitiva depende del examen anatomopatológico de muestras de cerebro tomadas por biopsia o en la autopsia después del fallecimiento. Resultados clásicos son la observación de aspecto esponjiforme, muy marcado en los ganglios basales, la existencia de múltiples placas amiloides en el cerebro y cerebelo, astrocitosis de la corteza cerebral y del cerebelo y gliosis severa del tálamo. El tipo de sintomatología y el análisis neuropatológico son característicos de cada una de las diferentes enfermedades humanas.

La utilización de técnicas de imagen por resonancia magnética nuclear constituye una gran ayuda para el diagnóstico. Actualmente parece que la espectroscopía por resonancia magnética de protones es más precisa que la tomografía computerizada por emisión de fotones (Konaka *et al.* 2000).

Se realizan también análisis de líquido cefalorraquídeo para determinar la presencia de diversas proteínas. Los marcadores que se están empleando son las proteínas 14-3-3, la enolasa específica de neuronas y la proteína S-100 (Beaudry *et al.* 1999). La familia de proteínas 14-3-3 está compuesta por, al menos, 7 isoformas. Fueron descubiertas en 1967 tras un estudio intensivo de proteínas de cerebro bovino (Moore and Perez, 1967) y recibieron esta nomenclatura, que todavía se mantiene, por sus perfiles de elución cromatográfica y de movilidad electroforética. Son proteínas de distribución ubicua, habiéndose encontrado en todos los tejidos de todos los organismos eucarióticos estudiados, que están implicadas en la regulación del ciclo celular y de la apoptosis mediante su unión a motivos estructurales de proteínas reguladoras específi-

Analysis of cerebrospinal fluid to investigate the presence of diverse proteins are also carried out. Markers used are, proteins 14-3-3, specific enolase of neurons and the protein S-100 (Beaudry *et al.* 1999). The family of proteins 14-3-3 is composed by, at least, seven isophorms. They were discovered in 1967 after an intensive study of bovine brain proteins (Moore and Pérez, 1967) and their denomination is attributed to their chromatographic elution profiles and electrophoretic mobility. They are ubiquitous proteins, being found in every tissue of every eucariotic organism studied, involved in cellular cycle regulation and apoptosis by means of their union to structural domains of regulatory proteins specifically phosphorylated in serine residues (Rittinger *et al.* 1999). In a research carried out on 349 patients susceptible of suffering the Creutzfeldt-Jakob disease the presence of the protein 14-3-3 in cerebrospinal fluid allows to discriminate between this disease and other encephalitis, included Hashimoto and Alzheimer diseases (Poser *et al.* 1999). However, other authors do not consider this assay as characteristic of prion diseases (Satoh *et al.* 1999) as the protein is constitutively expressed in all neurons, oligodendrocytes, astrocytes and microglia. Its liberation to cerebrospinal fluid could then be the result of extensive damage in brain appearing also in meningoencephalitis of viral or bacterial origins, multiple sclerosis, mitochondrial diseases, etc. Nevertheless, it constitutes a very utilised test at the moment that with other clinical tests can be quite indicative of Creutzfeldt-Jakob disease.

An entire battery of tests exists, most still in development, for diagnosing in a precise way prion diseases. For example, total content of glycosaminoglycans in the brain of cows that have suffered spongiform encephalitis diminishes in an approximate proportion of 40%, without modifying their composition. These data are in good correlation with the neuroprotector role of glycosaminoglycans and can be useful as an additional approach to the diagnosis (Papakonstantinou *et al.* 1999).

A new analytic approach has appeared after proving that submitting to multispectral fluorescence spectroscopy techniques samples of brain of mice and of infected hamsters, the proteins Pr^{PC} and Pr^{PSC} have been discriminated with great sensibility. The signs are also distinct for pathological prions, making even possible differential

cas fosforiladas en restos de serina (Rittinger *et al.* 1999). En un trabajo en el que se investiga a 349 pacientes sospechosos de padecer la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob se confirma que la presencia de la proteína 14-3-3 en líquido cefalorraquídeo permite discriminar entre esta enfermedad y otras encefalitis, incluida la de Hashimoto y la enfermedad de Alzheimer (Poser *et al.* 1999). Sin embargo, otros autores consideran que este test no es característico de enfermedades priónicas (Sato *et al.* 1999) ya que la proteína se expresa constitutivamente en todas las neuronas, oligodendrocitos, astrocitos y microglía, por lo que su liberación al líquido cefalorraquídeo es el resultado de daño extenso en el cerebro que puede ocurrir también por meningoencefalitis de origen viral o bacteriano, esclerosis múltiple, enfermedades mitocondriales, etc. No obstante, constituye un test muy empleado actualmente que junto a otras pruebas clínicas es bastante indicativo de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

Existe toda una batería de pruebas, la mayoría en desarrollo, para poder diagnosticar de forma precisa las enfermedades priónicas. Por ejemplo, el contenido total de glicosaminoglicanos en el cerebro de vacas que han padecido la encefalitis esponjiforme disminuye en una proporción que llega al 40%, aunque no se modifica su composición. Estos datos están en buena correlación con el papel neuroprotector de los glicosaminoglicanos y puede servir como un criterio adicional para el diagnóstico (Papakonstantinou *et al.* 1999).

Una nueva vía analítica se ha abierto al comprobar que mediante técnicas espectroscópicas de fluorescencia multiespectral de muestras de cerebro de ratones y de hamsters infectados se ha podido discriminar entre las proteínas PrP^C y PrP^{SC} con gran sensibilidad. Además, las señales son diferentes para los distintos tipos de priones patológicos, lo que hace posible incluso el diagnóstico diferencial de varias enfermedades priónicas (Rubenstein *et al.* 1998).

Experimentos de amplificación diferencial por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para identificar genes sobreexpresados en cerebro de hamsters infectados por priones han demostrado que en estadios preclínicos, 19 días después de la inoculación, se induce el gen de la nexina-I, que es un inhibidor de serín-proteasas. Esta inducción ha sido confirmada por Northern blots. La cantidad total de RNA mensajero permanece

diagnosis of various prion diseases (Rubenstein *et al.* 1998).

Experiments of differential amplification by PCR (polimerase chain reaction) to identify overexpressed genes in hamster brain infected by prions have demonstrated that in preclinical stages, 19 days after inoculation, the gene of nexin-I (an inhibitor of serine proteases) is induced. This induction has been confirmed by Northern blots. Total messenger RNA quantity remains high when encephalopathy is evident clinically and through anatomopathologic studies (Cavallaro *et al.* 1999). In the future the discovery of new prion induced genes can help the development of other reliable methods of diagnosis.

The surest method for diagnosis of a prion disease consists on the unequivocal detection of PrP^{SC} protein as immunologic techniques, mainly Western blots and immunohistochemistry, are widely used (Yokohama *et al.* 1999). Many polyclonal and monoclonal antibodies have been described for prions detection (Kasczak *et al.* 1997, Bodemer, 1999). Most of the antibodies recognise both cellular and pathological forms, although monoclonal antibodies exist that can distinguish among prion isoforms, their use can even be more important in the prognosis of the disease. It is fundamental to have specific antibodies towards every mutation described in the PrP gene to selectively recognise prone individuals to any type of prion disease.

At the moment, due to the mad cow disease, the detection of the disease in animals that can go to human consumption is of the biggest importance. This is why a series of tests have been developed. Certain of them have been authorised for their use in the European Union. The most employed is the test Prionics that has been validated by Schaller *et al.* (1999) using brain samples of animals affected by the disease, of animals clinically normal and of others with not related neurological diseases.

All the tests that are used at the present time are based on protease resistance shown by pathologic protein deposits and in the immunologic detection with Western blots in resistant forms. An outline of these methods is described in the Figure 4. The biggest problem this technique presents is that its sensibility is not sufficiently high as to detect the pathological isoforms in samples of live animals, this is why brain samples can only be analysed after the sacrifice.

elevada cuando la encefalopatía es evidente tanto clínicamente como por estudios anatomopatológicos (Cavallaro *et al.* 1999). En el futuro el descubrimiento de nuevos genes inducidos por priones puede llevar al desarrollo de otros métodos fiables de diagnóstico.

El método más seguro para el diagnóstico de una enfermedad priónica consiste en la detección inequívoca de la proteína PrP^{SC} por lo que las técnicas inmunológicas, principalmente Western blots e inmunohistoquímica, son muy utilizadas (Yokohama *et al.* 1999). Se han descrito muchos anticuerpos policlonales y monoclonales para la detección de priones (Kascsak *et al.* 1997, Bodemer, 1999). La mayoría de los anticuerpos reconocen tanto a las formas celulares como a las patológicas, aunque existen anticuerpos monoclonales que pueden distinguir entre isoformas de priones, por lo que su uso puede ser muy importante para la prognosis de la enfermedad. Es fundamental disponer de anticuerpos específicos frente a todas las mutaciones descritas en el gen PrP para reconocer selectivamente a los individuos propensos a cualquier tipo de enfermedad priónica.

Actualmente, debido a la enfermedad de las vacas locas, es de la mayor importancia la detección de la enfermedad en animales que puedan dirigirse al consumo humano. Para ello se han desarrollado una serie de tests, de los que algunos han sido autorizados para su uso en la Unión Europea. El más empleado es el test Prionics que ha sido validado por Schaller *et al.* (1999) utilizando muestras de cerebro de animales afectados por la enfermedad, de animales clínicamente normales y de otros con enfermedades neurológicas no relacionadas.

Todos los tests que se están empleando en la actualidad se basan en la resistencia a proteasas que presentan los agregados proteicos patológicos y en la detección inmunológica con técnicas de Western blots de las formas resistentes. Un esquema de estos métodos se describe en la Figura 4. El mayor problema que se plantea con la utilización de esta técnica es que su sensibilidad no es suficientemente alta como para detectar las isoformas patológicas en muestras de animales vivos, por lo que únicamente se pueden analizar muestras de cerebro tras el sacrificio. Recientemente se han presentado para su aprobación otros tests que pueden detectar la enfermedad en animales vivos, su uso permitiría la incineración

Recently, new tests detecting the disease in live animals have been presented for their approval. Their use would allow the selective incineration of sick animals and the emission of health certificates to animals for human consumption.

With fluorescent antibodies against pathological prions it has been possible to detect specific signals in samples of cerebrospinal fluid from patients of Creutzfeldt-Jakob disease by confocal-fluorescence spectroscopy techniques. In a model system for the diagnosis it is possible to detect the protein PrP^{SC} to a concentration as low as 2 femtomolar (Bieschke *et al.* 2000), what means the biggest sensibility got obtained until the moment.

Recently an unsuspected property of the plasminogen has been published (Fischer *et al.* 2000). The plasminogen is a plasmatic preprotease related to neuronal excitotoxicity. At the moment, it is the only protein in which it has been possible to evidence the capacity to discriminate between the cellular and pathological forms of the prions, binding selectively to the form PrP^{SC}. Denaturation of PrP^{SC} annuls the capacity of binding. This property of the plasminogen could be exploited for the diagnoses.

THERAPEUTIC PROSPECTIVES

Although at the moment there is no treatment capable of curing prion diseases, numerous investigations focused on avoiding the formation of amyloid protein or facilitating its elimination are being carried out, in accordance with the routes schematised in the Figure 3. In some cases clinical trials are already being carried out. It is likely that the results obtained may have benefits on the treatment of other non prion diseases in which amyloid deposits are present, as Alzheimer disease.

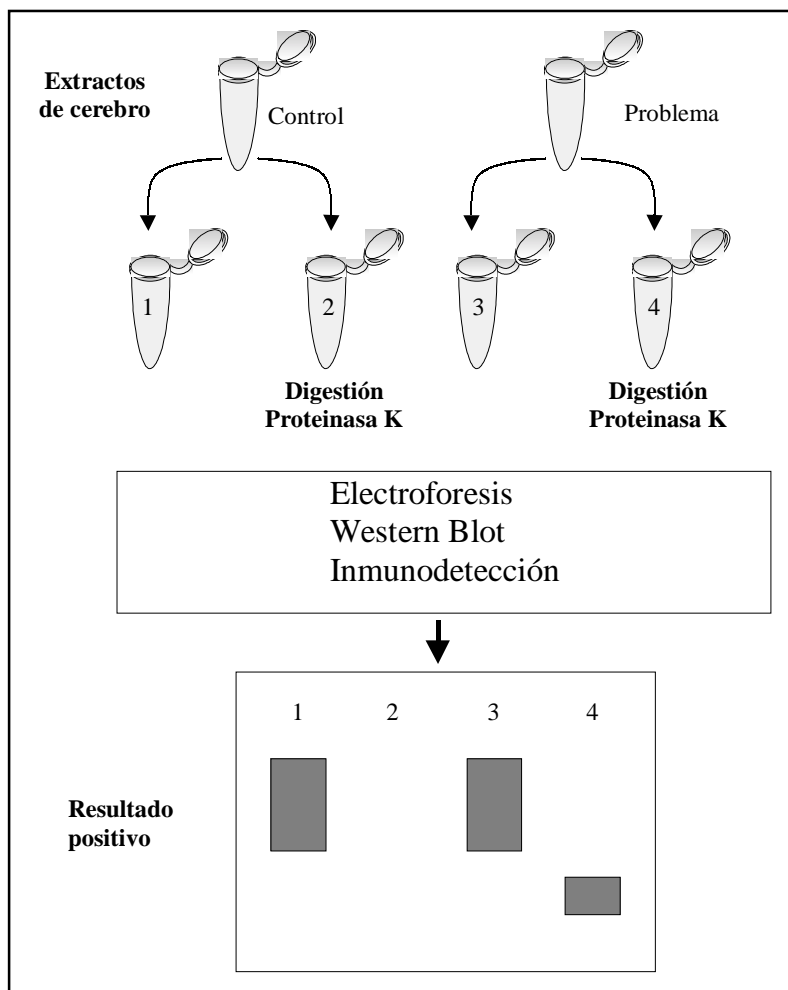
It is known from long ago that congo red, a pigment with structure of pentosan sulphate, blocks the formation of β -amyloid. Nowadays, there are founded hopes in that the employment of this, or of other less toxic pentosan sulphates, can slow down the course of these diseases. The congo red does not improve the symptoms once the disease has developed but when it is administered to experimental animals at the same time that PrP^{SC}, it blocks the development of the disease (Caspi *et al.* 1998), possibly by the inter-

selectiva de los animales enfermos y la emisión de certificados de salud para los animales dirigidos al consumo humano.

calation and masking of amino acid residues needed for aggregation. However, the polyanionic structure of congo red interferes with the

FIGURA 4.- Procedimiento experimental para la detección de formas patológicas de priones. El procedimiento se basa en la digestión con proteinasa K de muestras de cerebro controles y problemas. PrP^C es sensible a la digestión, mientras que PrP^{SC} es sólo parcialmente digerida. Las muestras se someten posteriormente a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, seguida de transferencia a una membrana (Western Blot) y posterior detección inmunológica con anticuerpos frente a proteínas priónicas. Las bandas encontradas en los carriles 1 y 3 corresponden a proteínas priónicas normales o patológicas que son indistinguibles con este procedimiento. La anchura de estas bandas es debida a los diferentes patrones de glicosilación. En el carril 2, la proteína PrP ha sido digerida por lo que no hay señal. La señal encontrada en el carril 4 indica el menor tamaño molecular del fragmento de PrP^{SC} resistente a proteasas y constituye un indudable resultado positivo.

FIGURE 4.- Experimental procedure for the detection of pathological isoforms of prions. The procedure is based on a proteinase K digestion of samples from control and problem brain extracts. PrP^C is sensible to protease while PrP^{SC} is only partially digested. The samples are later subjected to electrophoresis in polyacrylamide gels in the presence of SDS, followed by the transference to a membrane (Western Blot) and immunological detection with antibody against prion proteins. Bands in lanes 1 and 3 correspond to normal or pathological prions, which are not distinguished by this procedure. The wideness of these bands is due to different glycosilation patterns. In lane 2, PrP has been digested and no band is seen. The signal found in lane 4 indicates the smaller molecular size of the PrP^{SC} fragment, which is resistant to protease digestion, and it constitutes an undoubtedly positive result.



Con anticuerpos fluorescentes frente a priones patológicos se han podido detectar señales específicas en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes de Creutzfeldt-Jakob por técnicas de espectroscopía de fluorescencia confocal. En un sistema modelo para el diagnóstico se consigue detectar la proteína PrP^{Sc} a una concentración de 2 femtomolar (Bieschke *et al.* 2000), lo que significa la mayor sensibilidad conseguida hasta el momento.

Recientemente se ha publicado una propiedad insospechada del plasminógeno (Fischer *et al.* 2000). El plasminógeno es una preproteasa plasmática relacionada con excitotoxicidad neuronal. De momento, es la única proteína en la que se ha demostrado que presenta capacidad para discriminar entre las formas celulares y patológicas de los priones ya que se une selectivamente a la forma PrP^{Sc}. La desnaturalización de PrP^{Sc} anula la capacidad de unión. Esta propiedad del plasminógeno podría ser explotada con fines diagnósticos.

PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS

Aunque actualmente no existe ningún tratamiento para curar las enfermedades priónicas, se están realizando numerosas investigaciones enfocadas al diseño de fármacos para evitar la formación de la proteína amiloide o para facilitar su eliminación, de acuerdo con las rutas esquematizadas en la Figura 3. En algunos casos ya se están realizando ensayos en clínica. Muy posiblemente los resultados que se obtengan tendrán repercusiones positivas sobre el tratamiento de otras enfermedades no priónicas pero que se producen por deposición de placas amiloides, como en la enfermedad de Alzheimer.

Hace tiempo que se conoce que el rojo congo, un colorante con estructura de pentosan sulfato, bloquea la formación de β -amiloides. Hoy día hay fundadas esperanzas en que el empleo de éste, o de otros pentosan sulfatos menos tóxicos, puedan ralentizar el curso de estas enfermedades. El rojo congo no mejora la sintomatología una vez que la enfermedad se ha desarrollado pero cuando se administra a animales de experimentación al mismo tiempo que PrP^{Sc} bloquea el desarrollo de la enfermedad (Caspi *et al.* 1998), posiblemente por intercalación y enmascaramiento de los residuos de aminoácidos necesarios para

transport through the blood brain barrier (Ingrosso *et al.* 1995).

An alternative to congo red consists on the use of some antracyclins like doxorubicine and derivatives. To demonstrate their effectiveness experiments have been carried out in hamsters to which the drug and brain extracts of infected mice with PrP^{Sc} were administered simultaneously. It has been proven that the appearance of clinical symptoms of the disease is delayed and the survival of mice is significantly prolonged (Tagliavini *et al.* 1997).

The administration of 4-iodo-4desoxy-doxorubicine has facilitated the elimination of amyloid deposits in sick persons presenting amyloidosis due to the deposition of light immunoglobulin chains. It has also been demonstrated that *in vitro* this compound is able to block the formation of insulin amyloid deposits (Caughey *et al.* 1994).

Some tetrapyrroles inhibit *in vitro* the formation of PrP^{Sc}. Studies *in vivo* with infected transgenic mice have demonstrated the increased survival from 50 to 300% with this treatment, possibly by their stabilizing effect on the conformation of PrP^C (Priola *et al.* 2000).

Another experimental approach is to diminish the negative effects of the lack of prion proteins on normal cellular functions. A non-opioid analgesic, flupirtine, is a very promising drug to treat prion and other neurodegenerative diseases like Alzheimer. It has been demonstrated its *in vitro* strong protective effect on neurons infected with PrP^{Sc}, probably because it increases the intracellular levels of the antiapoptotic protein Bcl-1 and the antioxidant glutathione (Muller *et al.* 2000).

Possibly the best therapeutic approach consists on the blockade of the interaction between PrP^C and the X protein that takes place in a small area of PrP^C in which the residues Q168, Q172, T215 and Q219 are implied (Kaneko *et al.* 1997, Zulianello *et al.* 2000). The employment of small molecules that may interfere with the union of the X protein at these points can become the basis for the treatment of the transmissible spongiform encephalitis in a near future.

la agregación. Sin embargo, la estructura polianiónica del rojo congo interfiere con el transporte a través de la barrera hematoencefálica (Ingrosso *et al.* 1995).

Una alternativa al rojo congo consiste en el uso de algunas antraciclinas como la doxorrubicina y derivados. Para demostrar su eficacia se han realizado ensayos en hamsters a los que se les administraba simultáneamente la droga y homogenados de cerebro de ratones infectados con PrP^{Sc}. Se comprobó que se retrasa la aparición de los síntomas clínicos de la enfermedad y se prolonga significativamente el periodo de supervivencia de los ratones (Tagliavini *et al.* 1997).

La administración del derivado 4-iodo-4desoxi-doxorrubicina ha permitido la eliminación de placas amiloides en enfermos que presentaban amiloidosis producida por deposición de cadenas ligeras de inmunoglobulina, habiéndose demostrado también su acción *in vitro* bloqueando la formación de depósitos amiloides de insulina (Caughey *et al.* 1994).

Algunos tetrapirroles han presentado *in vitro* efectos inhibidores sobre la formación de PrP^{Sc}, mientras que estudios *in vivo* con ratones transgénicos infectados han demostrado que la supervivencia se incrementa entre el 50% y el 300% con este tratamiento, posiblemente por su efecto estabilizador de la conformación de PrP^C (Priola *et al.* 2000).

Otro enfoque experimental es disminuir los efectos negativos de la ausencia de formas celulares normales de las proteínas priónicas. La flupirtina, un analgésico no opioide, es una droga muy prometedora para tratar enfermedades priónicas y otras neurodegenerativas como el Alzheimer. Se ha demostrado que *in vitro* tiene un fuerte efecto citoprotector de neuronas infectadas con PrP^{Sc} porque incrementa los niveles intracelulares de la proteína antiapoptótica Bcl-1 y del antioxidante glutatión (Muller *et al.* 2000).

Posiblemente el mejor enfoque terapéutico consista en el bloqueo de la interacción entre PrP^C y la proteína X, que tiene lugar en un área pequeña de PrP^C en la que están implicados los restos Q168, Q172, T215 y Q219 (Kaneko *et al.* 1997, Zulianello *et al.* 2000). El empleo de moléculas pequeñas que interfieran con la unión de la proteína X en estos puntos puede convertirse en la base para el tratamiento de las encefalitis espongiformes transmisibles en un futuro cercano.

BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

- Basler K., Oesch B., Scott M., Westaway D., Walchli M., Groth D. F., McKinley M. P., Prusiner S. B. and Weissmann C. (1986) Scrapie and Cellular PrP Isoforms Are Encoded by the Same Chromosomal Gene. *Cell* **46**, 417-428.
- Beaudry P., Cohen P., Brandel J. P., Delasnerielaupretre N., Richard S. Launay J. M. and Laplanche J. L. (1999) 14-3-3-Protein, Neuron-Specific Enolase, and S-100-Protein in Cerebrospinal-Fluid of Patients with Creutzfeldt-Jakob-Disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Dis.* **10**, 40-46.
- Bieschke J., Giese A., Schulzschaeffer W., Zerr I., Poser S., Eigen M. and Kretzschmar H. (2000) Ultrasensitive Detection of Pathological Prion Protein Aggregates by Dual-Color Scanning for Intensely Fluorescent Targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5468-5473.
- Bodemer W. (1999) The Use of Monoclonal-Antibodies in Human Prion Disease. *Naturwissenschaften* **86**, 212-220.
- Brown D. R. (2001) Prion and prejudice: normal protein and the synapse *Trends Neurosci.* **24**, 85-90.
- Brown D. R., Wong B. S., Hafiz F., Clive C., Haswell S. J. and Jones I. M. (1999) Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem. J.* **344**, 1-5.
- Caspi S., Halimi M., Yanai A., Sasson S. B., Taraboulos A. and Gabizon R. (1998) The anti-prion activity of Congo red. Putative mechanism. *J. Biol. Chem.* **273**, 3484-3489.
- Caughey B., Brown K., Raymond G. J., Katzenstein G. E. and Thresher W. (1994) Binding of the protease-sensitive form of PrP (prion protein) to sulfated glycosaminoglycan and congo red. *J. Virol.* **68**, 2135-2141.
- Caughey B., Kocisko D.A., Raymond G.J. and Lansbury P. T. Jr. (1995) Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem. Biol.* **2**, 807-817.
- Cavallaro S., Gibbs C. J. and Pergami P. (1999) Early Induction of Protein Nexin-I in Scrapie. *Neuroreport.* **8**, 1677-1681.
- Endo T., Groth D., Prusiner S. B. and Kobata A. (1989) Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* **28**, 8380-8388.
- Fischer M. B., Roeckl C., Parizek P., Schwarz H. P., and Aguzzi A (2000) Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature* **23**, 479-483.
- Ingrosso L., Ladogana A. and Pocchiari M. (1995) Congo red prolongs the incubation period in scrapie-infected hamsters. *J. Virol.* **69**, 506-508.
- Ironside J. W. (1998) Neuropathological Findings in New Variant Cjd and Experimental Transmission of Bse. *Fems Immunol. Med. Microbiol.* **21**, 91-95.
- Kaneko K., Zulianello L., Scott M., Cooper C. M., Wallace A. C., James T. L., Cohen F. E. and Prusiner S. B. (1997) Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10069-10074.
- Kacsak R. J., Fersko R., Pulgiano D., Rubenstein R. and Carp R. I. (1997) Immunodiagnosis of Prion Disease. *Immunol. Invest.* **26**, 259-268.
- Konaka K., Kaido M., Okuda Y., Aoike F., Abe K., Kitamoto T. and Yanagihara T. (2000) Proton Magnetic-Resonance Spectroscopy of a Patient with Gerstmann-Straussler-Scheinker-Disease. *Neuroradiology* **42**, 662-665.
- Kretzschmar H. A., Stowring L. E., Westaway D., Stubblebine W. H., Prusiner S. B. and Dearmond S. J. (1986) Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* **5**, 315-324.
- Liu H., Farrjones S., Ulyanov N. B., Llinas M., Marqusee S., Groth D., Cohen F. E., Prusiner S. B. and James T. L. (1999) Solution Structure of Syrian-Hamster Prion Protein Rprp (90-231). *Biochemistry* **38**, 5362-5377.
- López-García F., Zahn R., Riek R. and Wuthrich K. (2000) NMR Structure of the Bovine Prion Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8334-8339.
- Lugaresi E., Montagna P., Baruzzi A., Cortelli P., Tinuper P., Zucconi M., Gambetti P. L. and Medori R. (1986) Familial insomnia with a malignant course: a new thalamic disease. *Rev. Neurol. (Paris)* **142**, 791-792.
- Moore B. V. and Pérez V. J. (1967) Specific acidic proteins of the nervous system. In: Calson (ed.) *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*. Prentice-Hall. pp. 343-359.
- Morrissey M. P. and Shakhnovich E. I. (1999) Evidence for the Role of PrP^C Helix-1 in the Hydrophilic Seeding of Prion Aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11293-11298.
- Muller W. E. G., Laplanche J. L., Ushijima H. and Schroder H. C. (2000) Novel Approaches in Diagnosis and Therapy of Creutzfeldt-Jakob-Disease. *Mech. Ageing Dev.* **116**, 193-218.
- Papakonstantinou E., Karakioulakis G., Roth M., Verghesenikolaki S., Dawson M., Papadopoulos O. and Sklayiadiis T. (1999) Glycosaminoglycan Analysis in Brain Stems from Animals Infected with the Bovine Spongiform Encephalopathy Agent. *Arch. Biochem. Biophys.* **370**, 250-257.
- Parchi P., Giese A., Capellari S., Brown P., Schulz-Schaeffer W., Windl O., Zerr I., Budka H., Kopp N. and Piccardo (1999) Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann. Neurol.* **46**, 224-233.
- Perrier V., Wallace A. C., Kaneko K., Safar J., Prusiner S. B. And Cohen F. E. (2000) Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6073-6078.
- Poser S., Mollenhauer B., Krauss A., Zerr I., Steinhoff B.J., Schroeter A., Finkenstaedt M., Schulzschaeffer W.J., Kretzschmar H.A. and Felgenhauer K. (1999) How to Improve the Clinical Diagnosis of Creutzfeldt Jakob Disease. *Brain*, **122**, 2345-2351.
- Priola S. A., Raines A. and Caughey W. S. (2000) Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science* **287**, 1503-1506.

- Prusiner S. B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-144.
- Prusiner S.B. (1995) The Prion Diseases. *Sci. Am.* **272**, 48-56.
- Riek R., Wider G., Billeter M., Hornemann S., Glockshuber R. And Wüthrich K. (1998) Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 11667-11672.
- Rittinger K., Budman J., Xu J. A., Volinia S., Cantley L. C., Smerdon S. J., Gamblin S. J. and Yaffe M. B. (1999) Structural-Analysis of 14-3-3 Phosphopeptide Complexes Identifies a Dual Role for the Nuclear Export Signal of 14-3-3 in Ligand-Binding. *Mol. Cell* **4**, 153-166.
- Rubenstein R., Gray P. C. Wehlburg C. M., Wagner J. S. and Tisone G. C. (1998) Detection and Discrimination of PrP^{Sc} by Multispectral Ultraviolet Fluorescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 100-106.
- Satoh J., Kurohara K., Yukiatake M. and Kuroda Y. (1999) The 14-3-3-Protein Detectable in the Cerebrospinal-Fluid of Patients with Prion-Unrelated Neurological Diseases Is Expressed Constitutively in Neurons and Glial-Cells in Culture. *Eur. Neurol.*, **41**, 216-225.
- Schaller O., Fatzer R., Stack M., Clark J., Cooley W., Biffiger K., Egli S., Doherr M., Vandeveld M., Heim D., Oesch B. and Moser M. (1999) Validation of a Western Immunoblotting Procedure for Bovine PrP^{Sc} Detection and Its Use as a Rapid Surveillance Method for the Diagnosis of Bovine Spongiform Encephalopathy (Bse). *Acta Neuropathol.* **98**, 437-443.
- Schlote W., Boellaard J. W., Schumm F. and Stöhr M. (1980) Gerstmann-Sträussler-Scheinker's disease. Electron-microscopic observations on a brain biopsy. *Acta Neuropathol. (Berl)* **52**, 203-211.
- Stahl N., Baldwin M. A., Burlingame A. L. and Prusiner S. B. (1990) Identification of glycoinositol phospholipid linked and truncated forms of the scrapie prion protein. *Biochemistry* **29**, 8879-8884.
- Tagliavini F., McArthur R. A., Canciani B., Giaccone G., Porro M., Bugiani M., Lievens P. M. J., Bugiani O., Peri E., Dall'Ara P., Rocchi M., Poli G., Forloni G., Bandiera T., Varasi M., Suarato A., Cassutti P., Cervini M. A., Lanseri J., Salmona M. and Post C. (1997) Effectiveness of Anthracycline Against Experimental Prion Disease in Syrian Hamsters. *Science* **16**, 1119-1121.
- Thellung S., Florio T., Villa V., Corsaro A., Arena S., Amico C., Robello M., Salmona M., Forloni G., Bugiani O., Tagliavini F. and Schettini, G. (2000) Apoptotic cell death and impairment of L-type voltage-sensitive calcium channel activity in rat cerebellar granule cells treated with the prion protein fragment 106-126. *J. Neurobiol. Dis.* **7**, 299-309.
- Weber T., Otto M., Bodemer M. and Zerr I. (1997) Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob-Disease and Related Human Spongiform Encephalopathies. *Biomed. Pharmacother.* **51**, 381-387.
- Yokoyama T. (1999) The Immunodetection of the Abnormal Isoform of Prion Protein. *Histochem J.* **31**, 209-212.
- Zahn R., Liu A. Z., Luhrs T., Riek R., Vonschroetter C., Garcia-Lopez F., Billeter M., Calzolari L., Wider G. and Wuthrich K. (2000) NMR Solution Structure of the Human Prion Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 145-150.
- Zulianello L., Kaneko K., Scott M., Erpel S., Han D., Cohen F. E. and Prusiner S. B. (2000) Dominant-negative inhibition of prion formation diminished by deletion mutagenesis of the prion protein. *J. Virol.* **74**, 4351-4360.