

Tomás Barrio Alegre

Fenómeno de cepas y
determinantes moleculares de la
barrera de transmisión y la
neurodegeneración en las
enfermedades priónicas

Director/es

BADIOLA DIEZ, JUAN JOSÉ
BOLEA BAILO, ROSA

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606





Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

FENÓMENO DE CEPAS Y DETERMINANTES
MOLECULARES DE LA BARRERA DE
TRANSMISIÓN Y LA NEURODEGENERACIÓN EN
LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS

Autor

Tomás Barrio Alegre

Director/es

BADIOLA DIEZ, JUAN JOSÉ
BOLEA BAILO, ROSA

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2019



Universidad
Zaragoza

Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes

Departamento de Patología Animal

Facultad de Veterinaria

**FENÓMENO DE CEPAS Y DETERMINANTES
MOLECULARES DE LA BARRERA DE
TRANSMISIÓN Y LA
NEURODEGENERACIÓN EN LAS
ENFERMEDADES PRIÓNICAS**

Memoria de tesis presentada por el licenciado

Tomás Barrio Alegre

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Directores:

Dra. Rosa M^a Bolea Bailo

Dr. Juan José Badiola Díez

Zaragoza, octubre de 2019

Este trabajo ha sido posible gracias a una ayuda para la formación del profesorado universitario (FPU, convocatoria 2014) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (**FPU 14/04348**), y gracias a la Universidad de Zaragoza, que ha aportado las instalaciones y a la cual pertenecen los Directores del trabajo. Asimismo, este trabajo ha sido posible gracias al apoyo de los siguientes programas y sus proyectos:

- Programa de Cooperación Transfronteriza España, Francia, Andorra con contribución del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (POCTEFA-FEDER): Proyecto “Red de Investigación Transfronteriza en Enfermedades Priónicas Humanas y Animales”, EFA 148/16 (Redprion)
- Proyecto AGL2015-65560-R: Implicación de la glicosilación en la Transmisión de las Enfermedades Priónicas, Biomarcadores Moleculares y Papel de las Neurotrofinas en la Neurodegeneración, del Ministerio de Economía y Competitividad.



Departamento de
Patología Animal
Universidad Zaragoza



Centro de
Encefalopatías y Enfermedades
Transmisibles Emergentes
Universidad Zaragoza

Dña. ROSA M^a BOLEA BAILO y D. JUAN JOSÉ BADIOLA DÍEZ, Profesora Titular y Catedrático del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza

INFORMAN

Que D. Tomás Barrio Alegre, bajo nuestra dirección, presenta el trabajo correspondiente a su Tesis Doctoral titulada **“FENÓMENO DE CEPAS Y DETERMINANTES MOLECULARES DE LA BARRERA DE TRANSMISIÓN Y LA NEURODEGENERACIÓN EN LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS”** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza con “Mención Internacional”. Cumpliendo con la legislación vigente, este trabajo incluye dos informes de los siguientes expertos doctores pertenecientes a instituciones extranjeras:

- Dra. Alicia Otero, Postdoctoral fellow, Department of Biological Sciences and Centre for Prions and Protein Folding Diseases, University of Alberta (Edmonton, Alberta, Canadá). Doctora por la Universidad de Zaragoza el 18/09/2018.
- Dr. Jaber Lyahyai, Professeur Assistant en Génétique, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Departement of Medical Genetics, Université Mohammed V (Impasse Souissi, Rabat 10100, Rabat, Marruecos). Doctor por la Universidad de Zaragoza el 21/06/2007.

Asimismo, avalamos la realización por parte del doctorando de una estancia en una institución de investigación extranjera durante tres meses:

Estancia desde el 1 de abril hasta el 30 de junio de 2017 (90 días) en el Prion Research Centre (PRC), Colorado State University, Fort Collins, Colorado, United States of America, bajo la supervisión del Dr. Glenn Telling, en la que el estudiante de doctorado trabajó en el uso de técnicas de infección de cultivos celulares para la modelización *in vitro* de las enfermedades priónicas y el análisis de factores de susceptibilidad a los priones. Por tanto,

cumple con los requisitos necesarios para optar al Título de Doctor con Mención Internacional.

En Zaragoza, a 9 de octubre de 2019

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo.: Rosa Mª Bolea Bailo

A handwritten signature in blue ink, featuring a large 'R' and 'D' followed by a long horizontal stroke.

Fdo.: Juan José Badiola Díez



INFORME VALORACIÓN TESIS DOCTORAL / PhD THESIS ASSESSMENT REPORT

Doctorando-a / Doctoral Student: TOMÁS BARRIO ALEGRE

Título de la Tesis / Title of the Thesis:

Fenómeno de cepas y determinantes moleculares de la barrera de transmisión y la neurodegeneración en las enfermedades priónicas

Dr./D^a ALICIA OTERO GARCÍA

Como del Tribunal que ha juzgado la tesis doctoral / As of the Doctoral Committee that has evaluated the PhD thesis

Como evaluador de la tesis con mención de doctorado internacional o europea / As external examiner of the PhD thesis (International or European Mention PhD) emite el informe que sigue / issues the following report.

En Edmonton, a 23 de septiembre de 2019

Firma/Sign.: 

Informe de Valoración para la Comisión de Doctorado / Evaluation Report.

Comente la originalidad del trabajo presentado, la relevancia del mismo dentro del dominio al que pertenece la tesis, la metodología y la calidad de la memoria presentada. Incluya, en su caso, los comentarios que desee hacer llegar al doctorando (adjunte las hojas que sean necesarias). Discuss the originality and relevance of the work as well as the quality of the dissertation. You may include any comments that you want to send to the PhD student (please, attach as many pages as necessary).

I have read with great interest the Ph.D. thesis of Mr. Tomás Barrio Alegre entitled “Fenómeno de cepas y determinantes moleculares de la barrera de transmisión y la neurodegeneración en las enfermedades priónicas”. In the ample literature review, Mr. Barrio extensively revises, with up to date references, the general aspects of prion diseases such as the etiologic agent, PrP^C to PrP^{Sc} conversion mechanisms, transmission barrier phenomenon, pathogenesis and diagnosis; giving special relevance to the aspects studied in this thesis.

This Ph.D. thesis is well structured and clearly written, enriched with numerous figures supporting the main conclusions of each of the studies presented. It is organized in four studies, one of them already published in the high-impact neurosciences journal *Molecular Neurobiology*.

In the first study, Mr. Barrio presents a thorough work in which he analyzes one of the most complicated aspects of prion diseases: the prion strain characterization. After the inoculation of different scrapie isolates in transgenic ovine mice, he is able to differentiate at least three different scrapie substrains. I would like to acknowledge the exhaustive biochemical, neuropathological and survival period analyses included in this first study, that were necessary to discern between the different strains co-infecting the scrapie-affected sheep donors.

In the second study, he investigates the effect of the absence of glycans in the human PrP^C on the propagation of atypical human prions using the TgNN6h transgenic mouse line. Through several *in vitro* and *in vivo* studies, he concludes that the absence of glycans facilitates the amplification of atypical human prions, whereas the glycosylation of the human PrP^C impedes their propagation. These results are of great interest since he demonstrates the transmission of prion strains that are poorly transmissible *in vivo* and suggest that mechanisms such as PrP glycosylation could be implicated in the human prion transmission barrier.

In study number three, Mr. Barrio analyzes the distribution of p75NTR marker in the brains of naturally and experimentally scrapie infected animals. In the experimental model, he finds that the protein is more abundant in infected animals and that the expression is correlated with spongiosis. On the other hand, in the natural model, p75NTR protein seems to be upregulated in the preclinical stage of the disease.

In the last study, published in the prestigious journal *Molecular Neurobiology*, the PhD candidate evaluates the value of CSF-based diagnostic test in preclinical and clinical naturally occurring scrapie. They find that prion protein levels and PrP seeding activity are detectable at presymptomatic stages of the disease, preceding neuronal damage. These results are of great importance since current *ante-mortem* diagnostic techniques for prion diseases are of limited effectiveness.

Overall, this reviewed Doctoral Thesis shows the ability of Mr. Tomás Barrio to produce a high quality research work, presenting results of great importance in the field of prion diseases. This Thesis also widely meets the requirements for obtaining PhD degree, having my total recommendation to be submitted for examination as a Doctoral Thesis.

Finally, I would like to congratulate Mr. Tomás Barrio for his excellent research work and for producing a high quality Thesis.

September 23, 2019

Yours sincerely,



Alicia Otero García, DVM, PhD
Postdoctoral fellow

*Department of Biological Sciences and Centre for Prions and Protein Folding Diseases.
204 Brain and Aging Research Building, University of Alberta.*

Edmonton, Alberta T6G 2M8,
e -mail: oterogar@ualberta.ca
Phone: +1 780248-1718





INFORME VALORACIÓN TESIS DOCTORAL / PhD THESIS ASSESSMENT REPORT

Doctorando-a / Doctoral Student: **Tomás Barrio**.....

Título de la Tesis / Title of the Thesis:

Fenómeno de cepas y determinantes moleculares de la barrera de transmisión y la neurodegeneración en las enfermedades priónicas

D./D^a. **Jaber LYAHYAL**.....

- Como del Tribunal que ha juzgado la tesis doctoral / As of the Doctoral Committee that has evaluated the PhD thesis
- Como evaluador de la tesis con mención de doctorado internacional o europea / As external examiner of the PhD thesis (International or European Mention PhD emite el informe que sigue / issues the following report.

En Rabat, a 04 de Octubre de 2019

Firma/Sign.: 

Informe de Valoración para la Comisión de Doctorado / Evaluation Report

Comente la originalidad del trabajo presentado, la relevancia del mismo dentro del dominio al que pertenece la tesis, la metodología y la calidad de la memoria presentada. Incluya, en su caso, los comentarios que desee hacer llegar al doctorando (adjunte las hojas que sean necesarias). Discuss the originality and relevance of the work as well as the quality of the dissertation. You may include any comments that you want to send to the PhD student (please, attach as many pages as necessary).

Firstly, I'm thankful for the invitation to review the Ph.D. thesis of **Mr. Tomás Barrio**.

The submitted thesis entitled "**Fenómeno de cepas y determinantes moleculares de la barrera de transmisión y la neurodegeneración en las enfermedades priónicas**" contributes to the current knowledge of certain mechanisms related to the transmission barrier for Transmissible Spongiform Encephalopathies and their pathogenesis.

This PhD thesis is correctly presented. It is written in about 250 pages, and enriched by number of figures (38) and tables (5).

The thesis consists of five chapters, beginning with the presentation and the aim of thesis as the first part of thesis, the second part is a general bibliography review (49 pages). The results are presented in the form of four scientific studies of which one has already been published in a highly ranked journal "**Molecular Neurobiology**" and three are presented as preliminary manuscript for main article. The two last chapters contain a general discussion and conclusions of the thesis.

The structure of thesis conforms to principles and requests to the structure of scientific thesis.

The first study presents a characterization of several natural scrapie isolates from the Pyrenean transboundary region. This study highlights that some scrapie isolates contained mixtures of substrains and the coinfection of animals with more than one scrapie strain is more frequent than infection with a single component.

The second Manuscript explores the relationship between PrP^C glycosylation and "atypicality" by studying in vivo and in vitro the role of glycosylation in the transmission and propagation of prions responsible for various types of human prion disease with atypical features. The findings suggest that the abolishment of PrP^C glycosylation facilitates the selective amplification of prions with atypical characteristics, with maintenance of their specific pathobiological properties.

The third study analyze the distribution and expression of p75^{NTR} in the brain of naturally scrapie-affected sheep and experimentally infected animals, as well as its correlation with other neuropathological markers of prion disease. The preliminary results conclude the interest of the inclusion of a preclinical mouse group.

And the last paper describes the usefulness of the diagnostic tests based on cerebrospinal fluid biomarkers in pre-clinical and clinical naturally infected sheep. The results support the effectiveness of these tests in the screening of pre-symptomatic scrapie and human prion disease cases.

Finally, the author has studied and used appropriate number of bibliography sources. It is the evidence of the deep theoretical knowledge and very good orientation in the discussion of the thesis findings.

Overall, the reviewed thesis presents original research results of large importance and it fulfills all requirements aimed for obtaining PhD degree. This thesis is ready to be defended orally, in front of respective committee.



CERTIFICADO DE ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN

El abajo firmante, director del departamento de de la Universidad de Zaragoza o coordinador del programa de doctorado en Medicina y Sanidad Animal de la Universidad de Zaragoza (elijase una de las dos opciones),


CERTIFICA que

D/D.^a Tomás Barrio Alegre , procedente de la Universidad de Zaragoza ha realizado desde el 01-abr-2017 (fecha de inicio) hasta el 30-jun-2017 (fecha final)

una estancia de investigación enmarcada en el desarrollo de su tesis doctoral en el departamento/instituto/centro de Prion Research Center (CSU), Co, EEUU... (identifíquese lo que proceda).

Y para que así conste, firmo la presente

en Zaragoza, a de de 201

<p>Fdo.: Dr. Lluís Luján Lerma.....</p> <p><input type="checkbox"/> El director del Departamento</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> El coordinador del programa de doctorado</p>	<p>Visto bueno del responsable/tutor Durante la estancia</p>  <p>Fdo.: Dr. Glenn Telling.....</p>
--	---

ÍNDICE GENERAL

I.	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	pág. 1
	Antecedentes	pág. 3
	Objetivos	pág. 8
II.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	pág. 13
1.	INTRODUCCIÓN	pág. 15
	1.1. <u>Breve revisión de las EET en los animales</u>	pág. 15
	1.2. <u>Breve revisión de las EET en los seres humanos</u>	pág. 17
2.	LA NATURALEZA DEL AGENTE INFECCIOSO	pág. 18
	2.1. <u>Hipótesis sobre la naturaleza del agente infeccioso</u>	pág. 18
	2.2. <u>El descubrimiento de la PrP^{Sc}</u>	pág. 20
	2.3. <u>La identificación de la PrP^C y el gen <i>Prnp</i></u>	pág. 21
3.	PrP^C, PrP^{Sc} Y EL PROCESO DE CONVERSIÓN	pág. 22
	3.1. <u>La proteína prión celular o PrP^C</u>	pág. 22
	3.1.1 El gen <i>Prnp</i> y la síntesis de PrP ^C	pág. 22
	3.1.2 La estructura de la PrP ^C	pág. 23
	3.1.3 La distribución de la PrP ^C en el organismo.....	pág.24
	3.1.4 Las funciones de la PrP ^C	pág. 24
	3.2. <u>La proteína prión patológica o PrP^{Sc}</u>	pág. 25
	3.3. <u>El mecanismo de conversión</u>	pág. 26
4.	LOS FENÓMENOS DE CEPAS Y BARRERA DE TRANSMISIÓN	pág. 28
	4.1. <u>El fenómeno de cepa</u>	pág. 29
	4.1.1 El desarrollo del concepto de cepa priónica	pág. 29
	4.1.2 Metodología clásica de caracterización de cepas de scrapie	pág. 30
	4.1.2.1 El gen <i>Sinc</i> y los periodos de incubación	pág. 30
	4.1.2.2 El perfil lesional.....	pág. 31

4.1.3	Bases moleculares del fenómeno de cepa.....	pág. 32
4.2.	<u>La barrera de transmisión</u>	pág. 33
4.2.1	La noción primitiva de “barrera de especie”	pág. 33
4.2.2	La “barrera genotípica”	pág. 34
4.2.2.1	Ejemplos concretos de la influencia del genotipo en la barrera de transmisión	pág. 34
4.2.3	La “barrera de cepa”	pág. 36
4.2.4	Otros factores que afectan a la barrera de transmisión: la glicosilación de la PrP ^C	pág. 37
4.3.	<u>La interacción entre la cepa y la barrera de transmisión</u>	pág. 38
4.3.1	Adaptabilidad de los aislados priónicos: fenómenos de selección y mutación en el scrapie murino	pág. 40
4.3.2	Fenómeno de cepa, selección y mutación en otras EET	pág. 41
4.3.2.1	La TME	pág. 41
4.3.2.2	La BSE clásica	pág. 41
4.3.2.3	Las BSE atípica.....	pág. 43
4.3.3.	Fenómenos replicativos alternativos: NAPA	pág. 44
4.4.	<u>El modelo de selección conformacional</u>	pág. 44
4.5.	<u>La hipótesis del modelado deformado</u>	pág. 46
5.	PATOGENIA DE LAS EET	pág. 47
5.1.	<u>Patogenia y transmisión de las EET de tipo adquirido</u>	pág. 47
5.1.1.	El scrapie como prototipo de las EET de tipo adquirido.....	pág. 47
5.1.1.1	Vías de transmisión y contagio	pág. 47
5.1.1.2	Infección y puertas de entrada del agente	pág. 49
5.1.1.3	Papel del linfotropismo en la patogenia	pág. 50
5.1.1.4	Neuroinvasión.....	pág. 50
5.2.	<u>Patogenia de las EET de tipo genético</u>	pág. 53
5.2.1	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob genética	pág. 54
5.2.2	Insomnio familiar fatal.....	pág. 55
5.2.3	Síndrome de Gerstmann-Sträussker-Scheinker	pág. 55

5.2.4	EET genéticas con mutaciones en la zona de repetición de octapéptido	
5.3.	<u>Patogenia de las EET de tipo espontáneo</u>	pág. 55
5.3.1.	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica e insomnio fatal esporádico	pág. 55
5.3.2.	Prionopatía de sensibilidad variable a proteasas	pág. 56
5.3.3.	Scrapie atípico y BSE atípicas.....	pág. 57
5.4.	<u>Neurodegeneración</u>	pág. 51
5.4.1	La molécula responsable de la neurotoxicidad	pág. 57
5.4.2	Mecanismos implicados en la neurodegeneración	pág. 59
5.4.2.1	Muerte neuronal.....	pág. 59
5.4.2.2	Neuroinflamación: la implicación de la glía	pág. 62
6.	DIAGNÓSTICO DE LAS EET	pág. 63
6.1.	<u>Diagnóstico <i>in vivo</i></u>	pág. 63
6.1.1	Diagnóstico clínico.....	pág. 63
6.1.2	Biomarcadores diagnósticos y posibilidades de diagnóstico preclínico.....	pág. 64
6.2.	<u>Diagnóstico <i>post-mortem</i></u>	pág. 65
6.2.1	Diagnóstico histopatológico	pág. 65
6.2.2	Técnicas basadas en la detección directa de la PrP ^{Sc}	pág. 66
6.3.	<u>Técnicas de amplificación de los priones</u>	pág. 61
6.3.1	La PMCA.....	pág. 61
6.3.1.1	Concepto y desarrollo de la PMCA y sus aplicaciones diagnósticas	pág. 67
6.3.1.2	Las aplicaciones de la PMCA más allá del diagnóstico	pág. 69
6.3.2	La RT-QuIC	pág. 70
III.	ESTUDIOS	pág. 71
	Estudio nº 1: Mixtures of prion substrains in natural scrapie cases revealed by mice bioassay	pág. 73
	Abstract	pág. 75
	Introduction	pág. 76
	Material and methods.....	pág. 78
	Results	pág. 82

Discussion.....	pág. 93
References.....	pág. 97
Estudio nº 2: Removal of PrP^C-attached glycans favors the propagation and transmission of human strains with atypical characteristics.....	pág. 107
Abstract	pág. 109
Introduction	pág. 109
Material and methods.....	pág. 113
Results	pág. 115
Discussion.....	pág. 124
References.....	pág. 127
Estudio nº 3: Distribution of neurotrophins and role of p75^{NTR} receptor in neurodegeneration in natural and experimental scrapie models	pág. 133
Abstract	pág. 135
Introduction	pág. 135
Material and methods.....	pág. 137
Results	pág. 140
Discussion.....	pág. 154
References.....	pág. 157
Supplementary material.....	pág. 165
Estudio nº 4: Cerebrospinal fluid prion disease biomarkers in pre-clinical and clinical naturally occurring scrapie.....	pág. 167
Abstract	pág. 169
Introduction	pág. 169
Material and methods.....	pág. 170
Results	pág. 172
Discussion.....	pág. 174
References.....	pág. 175
IV. DISCUSIÓN GENERAL	pág. 179
V. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	pág. 191

VI.	RESUMEN / <i>ABSTRACT</i>	pág. 195
VII.	ANEXOS	pág. 203
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	pág. 215

ÍNDICE DE FIGURAS

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Síntesis y maduración de la PrP ^C y su conversión a PrP ^{Sc}	pág. 23
Figura 2. Modelos de la estructura de la PrP ^{Sc}	pág. 25
Figura 3. Modelos de replicación de los priones.....	pág. 28
Figura 4. Metodología del perfil lesional propuesta por Fraser y Dickinson	pág. 31
Figura 5. Esquema que representa el aislamiento de las cepas priónicas más empleadas, así como los fenómenos de divergencia entre ellas.....	pág. 39
Figura 6. Modelo de selección conformacional	pág. 45
Figura 7. Vías de neuroinvasión	pág. 51
Figura 8. Polimorfismos y mutaciones del gen <i>PRNP</i> asociadas a EET en humanos.....	pág. 53
Figura 9. Rutas de señalización y respuestas celulares inducidas por la activación de p75 ^{NTR} solo o en presencia de sus correceptores	pág. 62
Figura 10. Hallazgos neuropatológicos característicos de las EET	pág. 66
Figura 11: Fases de la PMCA	pág. 68

ESTUDIO N° 1

Figure 1. Western blot of inocula sourced from sheep tissues.....	pág. 83
Figure 2. Western blot of spinal cord homogenates from 2nd-passage TgShp XI mice	pág. 86
Figure 3. Western blot of spinal cord homogenates from 2nd-passage Tg338 mice	pág. 87
Figure 4. Lesion profiles in 2nd-passage TgShp XI mice.....	pág. 88
Figure 5. Lesion profiles in 2nd-passage Tg338 mice.....	pág. 89
Figure 6. PET-blot and IHC of representative brain sections from TgShp XI.....	pág. 90
Figure 7. PET-blot of representative brain sections from Tg338 mice	pág. 91
Figure 8. Unicentric, florid and amorphous perivascular plaques in brain of 2nd-passage Tg338 mice infected with inocula 6L and 8L.....	pág. 91

ESTUDIO N° 2

Figure 1. Propagation of classical and atypical human prion strains on TgNN6h substrate by PMCA.....	pág. 116
Figure 2. Tg340 mice infected with sCJMM1.....	pág. 118
Figure 3. TgNN6h mice infected with VPSPr-129V/V.....	pág. 119
Figure 4. TgNN6h mice infected with PMCA-adapted GSS A117V.....	pág. 121
Figure 5. Tg340 and TgNN6h mice infected with GSS 6OPRI.....	pág. 122
Figure 6. Western blot of original 6OPRI isolate and brains from 6OPRI-infected Tg340 mice.....	pág. 123

ESTUDIO N° 3

Figure 1. Neurotrophins in the brain of infected and control mice and sheep.....	pág. 141
Figure 2. Neurotrophin receptors in the brain of infected and control mice and sheep ..	pág. 142
Figure 3. p75 ^{NTR} labeling patterns in mice.....	pág. 143
Figure 4. Visual comparison of p75 ^{NTR} glial immunolabeling between control, preclinical and terminal mice.....	pág. 144
Figure 5. Image analysis of global p75 ^{NTR} immunostaining in mice brains.....	pág. 145
Figure 6. Immunohistochemistry for p75 ^{NTR} in brain of a healthy control sheep and a naturally scrapie-infected sheep at terminal stage.....	pág. 146
Figure 7. Image analysis of p75 ^{NTR} immunostaining in sheep brains showed significant differences between groups of animals in a number of brain areas and nuclei.....	pág. 148
Figure 8. Comparison between p75 ^{NTR} and GFAP immunostaining patterns in mice.....	pág. 149
Figure 9. Comparison between p75 ^{NTR} and GFAP immunostaining patterns in sheep ...	pág. 150
Figure 10. Distribution of spongiform change, PrP ^{Sc} deposits and gliosis in comparison with the distribution of glial p75 ^{NTR} labeling in the brain of control, preclinical and terminal mice.....	pág. 151
Figure 11. Distribution of spongiform change and PrP ^{Sc} deposits in comparison with the distribution of global p75 ^{NTR} labeling in the brain of control, preclinical and terminal sheep.....	pág. 152
Figure 12. Confocal microscopy for p75 ^{NTR} and PrP in sheep brain samples.....	pág. 153
Figure 13. Confocal microscopy for GFAP and p75 ^{NTR} in sheep and mouse brain samples	pág. 154

ESTUDIO N° 4

Figure 1. Detection of pathogenic PrP in naturally occurring scrapie.....pág. 172

Figure 2. CSF prion biomarkers in naturally occurring scrapie.....pág. 173

ÍNDICE DE TABLAS

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Tabla 1. Enfermedades priónicas en los animales y el ser humano.....pág. 15

ESTUDIO Nº 1

Table 1. Clinical stage, clinical signs, genotype, age at sacrifice and geographical origin of sheep included in the study, and references of the inocula prepared from their tissuespág. 80

Table 2. Banding patterns of source sheep tissues and survival periods, attack rates and banding patterns of experimentally challenged first and 2nd-passage TgShp XI and Tg338 mice. pág. 85

Table 3. Overview of prion variants propagated from nervous and lymphoid tissues of sheep.... pág. 95

ESTUDIO Nº 2

Table 1. Incubation periods and attack rates in bioassaypág. 117

Supplementary Table 1. Statistical comparison between terminal, preclinical and control mice for the semi-quantitative parameters evaluated.....pág. 165

Supplementary Table 2. Statistical comparison between terminal, preclinical and control sheep for the semi-quantitative parameters evaluated.....pág. 166

SECCIÓN **I**

Antecedentes y objetivos

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) o enfermedades priónicas son un conjunto de patologías neurodegenerativas progresivas y fatales, causadas por un agente etiológico poco convencional denominado prión. Según la hipótesis más ampliamente aceptada en la actualidad, los priones están constituidos únicamente por una proteína patológica denominada PrP^{Sc} (Prusiner, 1982). La PrP^{Sc} es una isoforma conformacional de una proteína fisiológica denominada proteína prión celular o PrP^C. La PrP^C se halla codificada en el genoma del hospedador (gen *Prnp*) y se expresa en prácticamente todos los tejidos del organismo, aunque las mayores concentraciones de la misma se encuentran a nivel del sistema nervioso. Esta proteína se encuentra anclada a la membrana celular mediante una molécula de GPI y posee diversas funciones fisiológicas, incluyendo la defensa contra los radicales libres de oxígeno (función antioxidante), transducción de señales, y regulación de la apoptosis (función anti-apoptótica). Además, se trata de una glicoproteína que contiene en su secuencia dos residuos de asparagina susceptibles a la N-glicosilación, lo que da lugar a tres glicofomas posibles de la PrP^C: no glicosilada, mono-glicosilada y di-glicosilada.

Por su parte, la PrP^{Sc} es idéntica a la PrP^C en su secuencia o estructura primaria, pero difiere de la misma en el plegamiento (estructuras secundaria y terciaria). Éste le confiere una serie de propiedades bioquímicas que la distinguen de la PrP^C, incluyendo insolubilidad en detergentes, resistencia al calor y las radiaciones ionizantes y resistencia parcial a la digestión con proteinasa K. El hecho crucial es que la PrP^{Sc} tiene la capacidad de transmitir su conformación aberrante a la PrP^C, la cual adquiere el plegamiento patológico y puede a su vez “contagiar” a nuevas moléculas de PrP^C de forma autocatalítica. Este modelo de propagación, que en su momento fue considerado “herético” al ir en contra de los principios básicos conocidos de la biología molecular, provee de una explicación molecular para la transmisión y la patogenia de las EET.

Existen distintos tipos de EET que afectan a diversas especies animales, entre ellas, el ser humano. Las enfermedades priónicas pueden tener tres orígenes distintos: adquirido, genético o esporádico. Las de tipo adquirido o infeccioso aparecen tras la entrada en el organismo de priones de origen exógeno, las de tipo genético o hereditario se deben a mutaciones en el gen que codifica la PrP^C, que la vuelven propensa al cambio conformacional espontáneo, y las de tipo esporádico tiene un origen espontáneo de causa idiopática. La mayor parte de las enfermedades priónicas en los animales son de tipo adquirido, aunque se conocen algunos ejemplos de EET espontáneas en rumiantes. Por el contrario, en la especie humana existen ejemplos de los tres tipos. La variabilidad en los fenotipos de las EET en seres humanos es muy amplia y existen extensas clasificaciones basadas en los hallazgos clínicos y neuropatológicos de la enfermedad, las características bioquímicas de la PrP^{Sc} responsable y, en el caso de las EET genéticas, la mutación causal.

La más estudiada de las enfermedades priónicas animales es el scrapie o tembladera, que afecta de forma natural a los pequeños rumiantes (ovejas y cabras), aunque se ha conseguido transmitir de forma experimental a multitud de especies (bovinos, ratones, ratas, hámsteres, etc.). El scrapie constituye el prototipo de las EET de tipo adquirido y el estudio concienzudo de su patogenia ha permitido ahondar en la comprensión de numerosas facetas de la biología de los priones, incluyendo el fenómeno de cepas y la barrera de transmisión.

Por su parte, la encefalopatía espongiforme bovina (BSE) es posiblemente la más conocida de las EET animales, ya que tuvo una enorme repercusión social, política, económica y sanitaria después de que se demostrara su asociación con la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en humanos (Hill *et al.*, 1997). No obstante, son las formas esporádicas de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (sCJD) las que suponen el 85% de los casos diagnosticados en la especie humana.

A pesar de estar causadas por un agente que carece completamente de ácidos nucleicos, se ha evidenciado la existencia de distintas variantes del agente responsable de las enfermedades priónicas, a las que se denomina comúnmente “cepas”. De nuevo, la EET donde se ha estudiado más profundamente este fenómeno ha sido el scrapie. La primera evidencia de la existencia de cepas en el scrapie ovino procede de estudios de transmisión experimental de la enfermedad a cabras, en las que se observaron dos síndromes clínicos perfectamente diferenciables que se mantenían en pases seriados (Pattison & Millson, 1961). Con la transmisión posterior del scrapie a modelos murinos de fácil manejo, se disparó el número de supuestas cepas de scrapie identificadas, y se comenzó a ver esta enfermedad como un cajón de sastre en el que se incluía un número desconocido de variantes del agente (Bruce, M. E., 1993). Sin embargo, estas transmisiones entre especies hicieron emerger un nuevo problema: la existencia de un fenómeno inicialmente llamado “barrera de especie”, que reducía la eficiencia de transmisión interespecífica al prolongar, en ocasiones muy sustancialmente, los periodos de incubación y disminuir las tasas de ataque en los bioensayos (Priola, 1999). Posteriormente, el concepto de barrera de especie se amplió al descubrirse que otros factores, como la cepa, el tipo de tejido o los cofactores presentes, jugaban un papel muy importante en la eficiencia de transmisión, y se pasó a hablar de “barrera de transmisión” (Collinge, 1999).

Las investigaciones posteriores, utilizando las cepas priónicas derivadas de la encefalopatía transmisible del visón (TME) (Bessen & Marsh, 1994) y cepas priónicas de origen humano (Telling, Parchi *et al.*, 1996), demostraron que las diferencias entre cepas estaban codificadas a nivel de la estructura de la PrP^{Sc}, que podía adquirir distintos plegamientos patológicos. Estos estudios sentaron las bases para el desarrollo del concepto de la selección conformacional. Según ese modelo, los aislados priónicos no contienen casi nunca cepas puras, si no que son una mezcla o “nube” de

confórmeros, “subcepas” o “cuasi-especies”, de los cuales uno predomina y determina el fenotipo de la enfermedad. Una determinada secuencia aminoacídica se asocia con un rango limitado de conformaciones posibles de la PrP. El grado de solapamiento entre las conformaciones contenidas en el inóculo y las conformaciones permitidas o preferidas por el hospedador determina la fuerza de la barrera de transmisión. Así, el modelo de selección conformacional interpreta las cepas y las barreras de transmisión como dos manifestaciones del mismo fenómeno (Collinge & Clarke, 2007).

La existencia de diferentes cepas priónicas en el scrapie natural dificulta las labores de control y erradicación de la enfermedad. La naturaleza intrínsecamente adaptable de los priones supone un riesgo de que en el futuro puedan aparecer nuevas variantes con capacidad de transmisión a otras especies, incluido el ser humano, como se piensa que ocurrió, de hecho, con la BSE. En efecto, algunos aislados naturales de scrapie ya han demostrado su potencial zoonótico en ratones transgénicos que expresan la PrP^C humana (Cassard *et al.*, 2014).

Por estas razones, resulta crucial controlar las cepas de scrapie natural presentes de forma natural en la cabaña ovina europea. En el primer estudio de esta tesis se hace un análisis exhaustivo de varios aislados de scrapie natural de la zona fronteriza transpirenaica mediante bioensayo en dos líneas transgénicas ovinas. El objetivo es conocer la variedad de cepas presentes en nuestros rebaños, así como mejorar nuestra comprensión de los fenómenos de selección y mutación de cepas que tienen lugar en transmisiones a modelos experimentales.

Como ya se ha dicho, existen otros factores que afectan a las barreras de transmisión además de la especie y el genotipo del hospedador. Algunos autores sugieren que el grado de glicosilación de la proteína prión es uno de estos factores, ya que se ha visto que la eliminación de los glicanos anclados a los residuos de asparagina de la PrP^C mediante transgénesis es capaz de modificar tanto la eficiencia de propagación *in vitro* (Nishina *et al.*, 2006) como la capacidad de transmisión *in vivo* (Wiseman *et al.*, 2015) de los priones. El segundo estudio de esta tesis examina el efecto de la glicosilación de la PrP^C humana sobre la propagación y la transmisión de las cepas priónicas responsables de algunas EET genéticas humanas históricamente asociadas con una transmisibilidad pobre o nula. Así, se busca obtener una comprensión más profunda sobre la relación que existe entre la glicosilación de la PrP^C y la “atipicidad”.

Las enfermedades priónicas se caracterizan por un proceso neurodegenerativo progresivo en el que predomina la muerte neuronal, generalmente por apoptosis. Sin embargo, los desencadenantes de este fenómeno de muerte celular programada no se han aclarado por completo. Entre los posibles mecanismos implicados en la patogenia de la muerte neuronal, se encuentra una familia de proteínas estructural y funcionalmente relacionadas, denominadas neurotrofinas, que actúan como factores de crecimiento específicamente en el sistema nervioso. Son sintetizadas por neuronas

y otros tipos celulares y actúan a través de dos tipos de receptores de membrana: tres tipos de receptores de tipo tirosina kinasa (TrkA, TrkB y TrkC) y el receptor p75^{NTR}. Éste último resulta de gran interés ya que, dependiendo de diversos factores, como su activación por las formas maduras o pre-procesadas de las neurotrofinas o la interacción con correceptores de membrana como la sortilina, puede desencadenar respuestas biológicas opuestas, de forma que en ocasiones media la supervivencia celular, y en otras la muerte por apoptosis.

Algunos estudios han vinculado las neurotrofinas, y en concreto el receptor p75^{NTR}, con la patogenia de las EET. Por ejemplo, se ha visto que la molécula PrP106-126, un péptido homólogo a la región neurotóxica de la PrP humana, es capaz unirse al receptor p75^{NTR} y desencadenar fenómenos de apoptosis en un modelo celular (Bai *et al.*, 2008). Además, estudios en modelos murinos transgénicos han encontrado una asociación entre la alteración en los niveles de este receptor y las lesiones neuropatológicas de BSE (Marco-Salazar *et al.*, 2014). Por este motivo, el tercer estudio de esta tesis analiza la distribución y expresión del receptor p75^{NTR} y otros factores neurotróficos en el encéfalo de ovinos naturalmente infectados y de ratones transgénicos experimentalmente inoculados con scrapie, así como su correlación con otros biomarcadores de enfermedad priónica.

El diagnóstico de las enfermedades priónicas está dificultado por el hecho de que el único biomarcador patognomónico es la presencia de PrP^{Sc} en el tejido nervioso. Además, los signos clínicos no aparecen hasta que el daño nervioso está muy avanzando, impidiendo cualquier aproximación terapéutica incluso en el caso de que existiera un tratamiento efectivo. Por este motivo, el descubrimiento de biomarcadores alternativos de estas enfermedades, que idealmente puedan identificarse en tejidos y fluidos fácilmente accesibles, como la sangre o el líquido cefalorraquídeo (LCR), y que sean efectivos para la detección de casos preclínicos, supondría un importante avance. Algunos de estos biomarcadores ya se utilizan de forma rutinaria en el diagnóstico de las EET humanas. Los más importantes son la proteína 14-3-3 y la proteína tau total, cuya presencia en LCR indica daño neuronal. Por otra parte, la cantidad total de PrP en LCR se utiliza para complementar el diagnóstico, ya que se encuentra disminuida en pacientes de EET. La detección directa del agente causal en LCR mediante técnicas ultrasensibles, como la RT-QuIC, constituye otra de las herramientas diagnósticas disponibles y presenta una sensibilidad más alta que el resto de biomarcadores “subrogados”.

La identificación de individuos preclínicos entre los seres humanos es extremadamente complicada debido a que la mayor parte de los casos corresponden a formas esporádicas de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (sCJD), que no manifiestan ninguna alteración hasta la instauración de los signos clínicos. Las mutaciones causales de EET familiares poseen una alta penetrancia, por lo que los individuos portadores se

consideran preclínicos a efectos de los estudios; sin embargo, la cantidad de estos casos resulta insuficiente. Por estos motivos, se hace preciso el uso de modelos alternativos de enfermedad priónica en los que sea posible identificar individuos preclínicos.

En el caso del scrapie clásico, la identificación de individuos infectados en fase preclínica resulta relativamente sencilla debido a las especiales características de la patogenia de esta patología. En los casos de infección natural, la PrP^{Sc} se acumula en el tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (GALT) antes de que se produzca la neuroinvasión, al menos en la mayoría de los genotipos sensibles del gen *Prnp*. Así, es posible detectar animales preclínicos mediante la identificación de la proteína prión en muestras de mucosa rectal obtenidas mediante biopsia (Gonzalez *et al.*, 2005). En el cuarto estudio de esta tesis, se utilizan muestras de LCR extraído de ovinos infectados por scrapie en estadios preclínico y terminal, así como de ovinos sanos, para testar, por una parte, la efectividad de los biomarcadores utilizados en el diagnóstico de EET humanas en fluidos ovinos, y por otra, para comprobar su sensibilidad de detección de casos preclínicos.

El objetivo global de esta tesis doctoral titulada **“Fenómeno de cepas y determinantes moleculares de la barrera de transmisión y la neurodegeneración en las enfermedades priónicas”** es ahondar en el conocimiento de varias facetas de la biología de los priones y la patogenia de las EET. En la primera parte del trabajo, se exploran el fenómeno de cepas y la barrera de transmisión, dos fenómenos característicos de los priones que a día de hoy se consideran indisolublemente asociados. El objetivo no es sólo arrojar luz sobre la variabilidad de cepas priónicas existente, si no también comprender mejor los mecanismos que subyacen a la propagación y transmisión selectiva de los priones. La segunda parte del trabajo se adentra en el campo de la patogenia de las EET al estudiar la implicación de las neurotrofinas en los procesos neurodegenerativos. Comprender estos mecanismos es fundamental para encontrar una aproximación terapéutica a estos trastornos. Por último, se explora la eficacia diagnóstica de algunos biomarcadores de EET humanas en individuos preclínicos mediante el uso de modelos animales alternativos. La mejora de las herramientas diagnósticas es clave para optimizar el pronóstico de los pacientes humanos, así como para identificar animales infectados potencialmente peligrosos para la salud pública.

Esta tesis está, por tanto, organizada en cuatro estudios cuyos objetivos se detallan a continuación.

Estudio nº 1: “Mixtures of prion substrains in mice bioassay of natural scrapie cases”.

Objetivo general: Caracterizar mediante bioensayo la variabilidad de cepas presente en aislados priónicos de origen nervioso y linfoide, obtenidos de individuos clínicos y preclínicos de la cabaña ovina de la región fronteriza transpirenaica.

Objetivos específicos:

1. Realización de dos pases de diez aislados de scrapie natural en la línea transgénica ovina Tg338. Monitorización del desarrollo de signos clínicos en los ratones hasta el estadio terminal de la enfermedad. Sacrificio y necropsia con obtención de muestras de encéfalo y médula espinal para estudios histopatológicos y bioquímicos. Cálculo de las tasas de ataque y los periodos de supervivencia de cada grupo de ratones inoculados en cada uno de los pases.
2. Análisis de los patrones de bandas de la PrP^{Sc} acumulada en los inóculos originales y en la medula espinal de los ratones ambos pases.
3. Análisis de los perfiles lesionales en el encéfalo de los ratones de ambos pases.
4. Análisis de la distribución de PrP^{Sc} en el encéfalo de los ratones de ambos pases mediante PET-Blot e inmunohistoquímica.
5. Clasificación de los aislados utilizados, discusión y análisis de las variantes priónicas que contienen a la luz de estos resultados, resultados de una tesis

previa con la línea transgénica ovina TgShp XI (Sheleby-Elías, 2014) y resultados de estudios similares en la bibliografía.

Estudio nº 2: “Removal of PrP^C-attached glycans favors the propagation and transmission of human strains with atypical characteristics”.

Objetivo general: Estudiar el efecto de la eliminación de los glicanos de la PrP^C humana sobre la capacidad de propagación *in vitro* y de transmisión *in vivo* de priones responsables de EET genéticas humanas con características atípicas, y la naturaleza de la relación entre glicosilación y “atipicidad”.

Objetivos específicos:

1. Propagación de varias cepas priónicas humanas clásicas (sCJDMM1, sCJDMM2, sFl) y atípicas (VSPPr-129V/V, VSPPr-129M/V, GSS A117V-129M/V, GSS A117V-129M/M, GSS 6OPRI-129M/V) en sustrato de PrP^C humana no glicosilada (ratones TgNN6h) mediante la técnica de amplificación cíclica del malplegamiento de proteínas (PMCA).
2. Inoculación experimental de ratones TgNN6h, que expresan una PrP^C humana con dos mutaciones puntuales (N181Q y N197Q) que bloquean los sitios de glicosilación, con las cepas directas sCJDMM1, VSPPr-129V/V, GSS A117V-129M/V y GSS 6OPRI-129M/V y las cepas previamente adaptadas por PMCA GSS A117V_PMCA y GSS 6OPRI_PMCA.
3. Inoculación experimental de ratones Tg340, que expresan una PrP^C humana normalmente glicosilada, con los mismos aislados.
4. Monitorización del desarrollo de signos clínicos en los ratones hasta el estadio terminal de la enfermedad. Sacrificio y necropsia con obtención de muestras de encéfalo para estudios histopatológicos y bioquímicos. Cálculo de las tasas de ataque y los periodos de supervivencia de cada grupo de ratones inoculados.
5. Estudio de las eficiencias de transmisión a ambos modelos de cada uno de los aislados directos y adaptados por PMCA en base a sus periodos de incubación y tasas de ataque.
6. Análisis de la presencia de PrP^{Sc} y de sus patrones de bandas en los inóculos originales y en el encéfalo de los ratones.
7. Análisis de los perfiles lesionales en el encéfalo de los ratones.
8. Análisis de la distribución de PrP^{Sc} en el encéfalo de los ratones mediante inmunohistoquímica.

Estudio nº 3: “Distribution of neurotrophins and role of p75^{NTR} receptor in neurodegeneration in natural and experimental scrapie models”.

Objetivo general: Estudiar la expresión y distribución de las neurotrofinas en el encéfalo del modelo natural (oveja) y el experimental (ratón Tg338) de la enfermedad de scrapie, con especial atención al receptor p75^{NTR}, y su correlación con otras alteraciones neuropatológicas características de esta enfermedad.

Objetivos específicos:

1. Selección de ovinos afectados por scrapie en estadios terminal y preclínico, así como de ovinos controles no infectados, para la realización de estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos*.
2. Inoculación de ratones de la línea transgénica ovina Tg338 con aislados de scrapie adaptados. Monitorización de signos clínicos. Sacrificio y necropsia en estadios preclínico y terminal para la obtención de muestras de encéfalo para estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos.
3. Estudio piloto de la distribución de tres neurotrofinas (NGF, BDNF y NT-3) y cuatro receptores (TrkA, TrkB, TrkC y p75^{NTR}) en el encéfalo de ovinos y ratones Tg338 infectados y controles, mediante inmunohistoquímica.
4. Estudio de los patrones de distribución de p75^{NTR} en encéfalos de ovinos y ratones Tg338 terminales, preclínicos y controles, mediante inmunohistoquímica y microscopia confocal. Estudio de las diferencias entre grupos de animales mediante análisis semicuantitativo y análisis de imagen.
5. Estudio de la correlación del inmunomarcaje de p75^{NTR} con otras alteraciones histopatológicas características de las EET (espongiosis, depósito de PrP^{Sc} y gliosis) en ovinos y ratones Tg338 terminales, preclínicos y controles
6. Estudio de la co-localización de p75^{NTR} y astrocitos en ovinos y ratones Tg338 mediante microscopia confocal para p75^{NTR} y GFAP.

Estudio nº 4: “Cerebrospinal fluid prion disease biomarkers in pre-clinical and clinical naturally occurring scrapie”.

Objetivo general: Investigar la eficacia de los biomarcadores de enfermedad priónica humana en LCR para el diagnóstico del scrapie en estadios preclínico y clínico.

Objetivos específicos:

1. Selección de muestras de LCR procedentes de ovinos afectados por scrapie en estadios terminal y preclínico, así como controles no infectados*.
2. Análisis de la positividad de los animales seleccionados mediante el kit IDEXX HerdCheck BSE-Scrapie Antigen Test.

3. Análisis de la distribución de PrP^{Sc} en el encéfalo y otros tejidos de animales afectados clínicos y preclínicos.
4. Estudio de los biomarcadores subrogados proteína 14-3-3 y tau total en LCR mediante ELISA.
5. Estudio de los niveles de PrP total en LCR mediante ELISA y Western blot.
6. Estudio de la “seeding activity” mediante RT-QuIC.
7. Comparación estadística de los grupos de animales terminal, preclínico y control, y estudios de correlación estadística entre biomarcadores.

*En la medida de lo posible, se seleccionaron los mismos animales para los estudios nº3 y nº4.



SECCIÓN **II**

**Revisión
bibliográfica**

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades priónicas son un grupo de patologías neurodegenerativas, de curso progresivo e invariablemente fatal, que afectan a diversas especies animales, entre ellas el ser humano. Se las conoce también por la denominación de “encefalopatías espongiformes transmisibles” (EET), debido a que la característica neuropatológica más relevante de las mismas es la vacuolización del tejido nervioso (cambio espongiforme), y a que la mayoría de estos trastornos pueden transmitirse de unos individuos a otros, incluso de especies diferentes, por diversas vías de forma experimental y, en ocasiones, naturalmente.

Las enfermedades priónicas tienen la particularidad de poseer un triple origen: adquirido, genético o espontáneo. Casi todas las EET en los animales son de naturaleza infecciosa, es decir, de origen adquirido, aunque existen formas del scrapie y la BSE de tipo esporádico. Por el contrario, entre las EET humanas existen ejemplos de los tres tipos.

Tabla 1. Enfermedades priónicas en los animales y el ser humano

Nombre completo	Abreviatura	Hospedador (natural)	Etiología
Scrapie	-	Ovinos, caprinos	Adquirida (infecciosa)
Encefalopatía espongiforme bovina	BSE, EEB	Bovinos	Adquirida (infecciosa)
Enfermedad caquetizante crónica	CWD, ECC	Cévidos	Adquirida (infecciosa)
Encefalopatía transmisible del visón	TME, ETV	Visones	Adquirida (infecciosa)
Enfermedad priónica de los camellos	CPD	Dromedarios	Adquirida (infecciosa)
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica	sCJD, ECJe	Humanos	Espontánea
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob genética o familiar	fCJD, ECJf	Humanos	Genética
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica	iCJD, ECJi	Humanos	Adquirida (iatrogénica)
Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob	vCJD, vECJ	Humanos	Adquirida (infecciosa)
Kuru	-	Humanos	Adquirida (infecciosa)
Insomnio familiar fatal	FFI, IFF	Humanos	Genética
Insomnio fatal esporádico	sFI, IFE	Humanos	Espontánea
Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker	GSS	Humanos	Genética
Prionopatía de sensibilidad variable a las proteasas	VPSPr	Humanos	Espontánea

1.1 Breve revisión de las EET en los animales

La enfermedad priónica que ha sido objeto del mayor número de estudios, y que constituye el prototipo de las EET en animales, es el scrapie. También es conocido como “tembladera” o “prurigo lumbar”, y en otros idiomas ha recibido multitud de nombres, todos ellos referentes a su sintomatología clínica caracterizada por el prurito y las alteraciones de la movilidad (Liberski, 2012). Se trata de una enfermedad de naturaleza infecciosa, que se transmite fundamentalmente por contaminación del entorno con el agente causal y se adquiere por vía oral. Esta patología infecciosa se conoce desde hace siglos (las primeras descripciones de la misma se realizaron a mediados del siglo XVIII), estando presente de forma enzoótica en las poblaciones de pequeños rumiantes domésticos (ovinos y caprinos) de gran parte de Europa, así como en otros muchos países del mundo. Actualmente, los únicos países que parecen haber

conseguido erradicar la enfermedad son Australia y Nueva Zelanda (Cosseddu *et al.*, 2007).

En el año 1998, se identificó en Noruega el primer caso de scrapie atípico, una forma de la enfermedad que presentaba características clínicas y patológicas distintas y que parecía tener un origen espontáneo (Benestad *et al.*, 2003). Los estudios subsiguientes demostraron que estos casos estaban causados por una cepa distinta del agente (Nor98).

Por su parte, la encefalopatía espongiforme bovina es la EET que ha tenido mayor impacto social y mediático debido a su demostrada capacidad de infectar a numerosas especies, entre ellas el ser humano, en el que produce la conocida como variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) (Hill *et al.*, 1997). Esta enfermedad se adquiere por vía oral, a través del consumo de harinas de carne y hueso contaminadas, en el caso del ganado, y de productos cárnicos, en el caso de las personas, aunque también puede transmitirse por otras vías. La introducción del prión responsable de la BSE en la cadena alimentaria humana y la descripción de los primeros casos de vCJD en humanos en la década de los 90 desencadenaron una crisis alimentaria sin precedentes en la Unión Europea, con enormes repercusiones a nivel sanitario, económico y político. A pesar de que las medidas adoptadas por la Comisión Europea han conseguido erradicar prácticamente la enfermedad en el territorio comunitario, a día de hoy no se ha aclarado por completo el origen de la epidemia. Por ello, se recomienda cautela y el mantenimiento de las políticas de vigilancia y control de esta y otras EET, en tanto los misterios en torno al origen y los mecanismos de transmisión y divergencia de estas enfermedades no se resuelvan por completo. En esta línea, es importante señalar que se han descrito casos naturales de transmisión de la BSE a otras especies domésticas destinadas al consumo humano, como la cabra (Eloit *et al.*, 2005; Spiropoulos *et al.*, 2011), así como casos de BSE atípicas, de origen esporádico, cuyo potencial zoonótico no es plenamente conocido (Biacabe *et al.*, 2004; Casalone *et al.*, 2004).

Otra EET de gran importancia, especialmente en América del Norte, es la enfermedad caquetizante crónica (CWD), que afecta de forma natural a diversas especies de cérvidos domésticos y de vida silvestre como el ciervo mula (*Odocoileus hemionus*), el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), el uapití de las Montañas rocosas (*Cervus canadensis nelsoni*), el alce (*Alces alces*) y el reno (*Rangifer tarandus*). Experimentalmente se ha conseguido transmitir también al ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y al gamo (*Dama dama*). Se diagnosticó por primera vez en un ciervo mula cautivo en Colorado en 1978. A partir de esa primera descripción, se fueron sucediendo los casos, hasta alcanzarse prevalencias muy elevadas en la zona central de los Estados Unidos. Posteriormente, se detectaron varios animales positivos en Corea del Norte, y recientemente se han diagnosticado en Europa los primeros cérvidos

afectados, en Noruega, Suecia y Finlandia. El agente responsable de esta patología tiene una gran capacidad de diseminación, por lo que supone una grave amenaza para las poblaciones de cérvidos de vida libre, lo que justifica las estrictas medidas de control que se están llevando a cabo (Hannaoui *et al.*, 2017; Mathiason, 2017).

La encefalopatía transmisible del visón (TME) es una enfermedad infecciosa que afecta a visones domésticos y que se describió en Estados Unidos por primera vez en 1947. Se piensa que el origen de esta enfermedad es la ingesta de piensos contaminados con el agente del scrapie (Mathiason, 2017). Su importancia radica en que el estudio de los patrones de transmisión de la TME contribuyó a la comprensión de las bases moleculares del fenómeno de cepa, como se detalla en la sección 4.1.3.

Recientemente, se ha descrito una enfermedad priónica que afecta a los dromedarios (*Camelus dromedarius*). El estudio de los casos de animales afectados, sacrificados en el matadero de Ouargla (Algeria) entre 2015 y 2016, ha permitido descartar que se trate de una infección con BSE o scrapie. Sin embargo, la identificación de este nuevo miembro de la familia de las EET hace necesaria la evaluación del riesgo que supone para la sanidad animal y la salud pública (Babelhadj *et al.*, 2018).

1.2 Breve revisión de las EET en los seres humanos

En seres humanos, la enfermedad priónica más importante es la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) esporádica (sCJD). El nombre procede de dos neurólogos alemanes, Hans Gerhard Creutzfeldt y Alfons Maria Jakob, que describieron varios casos de un nuevo trastorno neurodegenerativo, similar a otras patologías como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, pero de evolución mucho más rápida, y etiología, en ese momento, desconocida (Henry & Murphy, 2017). Clínicamente, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica se caracteriza por una demencia multifocal de progresión rápida. En unas pocas semanas, generalmente entre dos y cinco meses, el cuadro evoluciona a mutismo acinético y muerte (Johnson & Gibbs, 1998). Actualmente no existen tratamientos efectivos contra esta enfermedad, ni forma de prevenir o retrasar su avance.

Como se explorará en profundidad en la sección 5 (Patogenia de las EET), existen formas de CJD asociadas a la presencia de mutaciones en el gen que codifica la proteína prión celular (*PRNP*), un elemento central en la patogenia de las EET. A estos casos se los engloba bajo la denominación de CJD genético o familiar (fCJD). Junto con ellos, el grupo de las EET de origen genético incluye otros casos que, si bien también se asocian con mutaciones en el gen *PRNP*, presentan fenotipos clínicos que permiten clasificarlos como patologías diferentes. Éstos son el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) y el insomnio familiar fatal (FFI).

El GSS se caracteriza por un curso clínico muy largo (puede ser de décadas) y por una afectación fundamentalmente cerebelar, con el desarrollo de signos piramidales y una

ataxia cerebelosa progresiva, finalmente acompañados por un trastorno cognitivo. Sin embargo, existe una gran heterogeneidad en las manifestaciones clínicas entre familias afectadas e incluso entre individuos de la misma familia, lo que hace que el GSS se defina fundamentalmente por los hallazgos neuropatológicos (presencia de placas de amiloide uni y multicéntricas, sobre todo en la capa molecular del cerebelo) y bioquímicas (patrones atípicos con presencia de múltiples bandas de PrP^{res}) (Takada *et al.*, 2017).

En el insomnio familiar fatal son características las lesiones a nivel del tálamo y las alteraciones en los ciclos de sueño-vigilia (Kretschmar *et al.*, 1995). Adicionalmente, existe una forma espontánea del insomnio fatal, denominada insomnio fatal esporádico (sFI).

Por otra parte, una enfermedad de reciente descripción, llamada proteinopatía de sensibilidad variable a las proteasas (VPSPr), se caracteriza por compartir ciertas características clínicas, neuropatológicas y bioquímicas con el GSS pero en ausencia de mutaciones en el gen *PRNP*, por lo que algunos autores la consideran la forma esporádica del GSS (Gambetti *et al.*, 2008).

Dentro de las EET de tipo adquirido en la especie humana, se incluye la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, que como ya se ha dicho, se produce tras la infección con el agente de la BSE. Por otra parte, antes de que se introdujese en la medicina moderna el concepto de enfermedad priónica, ocurrieron varios casos de CJD iatrogénico (iCJD) derivados del uso de hormona de crecimiento de origen cadavérico (Bonda *et al.*, 2016) y de trasplantes de duramadre (Thadani *et al.*, 1988) y de córnea (Duffy *et al.*, 1974) contaminados con el agente de la sCJD.

Por último, el kuru es una enfermedad infecciosa que se transmitía entre los miembros del pueblo *fore* de Papúa-Nueva Guinea mediante prácticas rituales caníbales. El estudio de esta enfermedad por Carleton Gajdusek y su asociación con el scrapie, que fue acertadamente propuesta por el patólogo veterinario William Hadlow, se sitúan en los comienzos de la investigación de esta curiosa patología (Asher & Gregori, 2018).

2. LA NATURALEZA DEL AGENTE INFECCIOSO

2.1 Hipótesis sobre la naturaleza del agente infeccioso

Las enfermedades priónicas están causadas por un tipo de agente no convencional denominado prión. La naturaleza de este agente estuvo durante años sujeta a debate, debido a que los datos experimentales y los modelos que se propusieron para explicarlos parecían contradecir los principios básicos de la biología molecular conocida en aquel entonces.

Como ya se ha dicho, el prototipo de las enfermedades priónicas está representado por el scrapie. A pesar de estar documentada por lo menos desde el año 1732 (Liberski, 2012), no fue hasta dos siglos después, en 1936, que Cuillé y Chelle demostraron su transmisibilidad intra-específica (de oveja a oveja), al mismo tiempo que se constató el largo periodo de incubación necesario para la aparición de signos clínicos (Liberski, 2012). Estos estudios reavivaron el interés por la enfermedad y por su esquivo agente causal. Unas décadas más tarde, la transmisión del scrapie a ratones (Chandler, 1961), ratas y hámsteres (Zlotnik & Rennie, 1965) facilitó enormemente la investigación en ese campo al aportar modelos experimentales mucho más convenientes.

Así, en 1966, Alper y colaboradores calcularon el tamaño del agente infeccioso responsable del scrapie y descubrieron que era sorprendentemente pequeño (Alper *et al.*, 1966), y un año más tarde demostraron que no era inactivado por radiaciones ultravioletas, lo que sugería que no contenía ácidos nucleicos (Alper *et al.*, 1967). Posteriormente, Pattison y Jones propusieron que podría tratarse de una proteína básica de bajo peso molecular, aunque no llegaron a elaborar un modelo de la infección (Pattison & Jones, 1967).

Poco después, un matemático llamado Griffith recogió estas ideas y propuso tres mecanismos distintos por los que una proteína podría poseer la capacidad de autoreplicarse sin salirse de los principios básicos de la biología molecular (Griffith, 1967).

A partir de entonces, se publicaron numerosas evidencias experimentales a favor de la hipótesis “sólo proteína”, es decir, la idea de que el agente etiológico responsable del scrapie era una proteína. A la demostración de que este agente era resistente al tratamiento con nucleasas (Prusiner *et al.*, 1980) y radiaciones ultravioletas e ionizantes (Alper *et al.*, 1967), y por lo tanto no contenía ácidos nucleicos, se le unieron las observaciones de que era estable en detergentes no-iónicos y no desnaturizantes, y presentaba mayoritariamente carga negativa (Prusiner, 1982). Estaba íntimamente asociado con la membrana celular (Gibbons & Hunter, 1967) y presentaba dominios hidrofóbicos en su superficie (Prusiner *et al.*, 1981), lo que podía explicarse por la presencia de cadenas laterales apolares próximas dentro de la proteína. Además, el agente infeccioso era inactivado mediante digestión con enzimas proteolíticas como la proteinasa K y la tripsina, y mediante reactivos que desnaturizan las proteínas pero que permiten aislar ácidos nucleicos biológicamente activos, como el SDS, agentes caotrópicos iónicos como el tiocianato de guanidinio, y el fenol (Prusiner *et al.*, 1981; Prusiner, 1982).

Todas estas evidencias experimentales llevaron a Prusiner a recoger la visionaria propuesta de Griffith y acuñar, en 1982, el término “prión” para referirse a una partícula de naturaleza fundamentalmente, si no exclusivamente, proteica, capaz de

replicarse en el organismo de los mamíferos mediante un mecanismo que en esa fecha todavía no se había identificado (Prusiner, 1982). Esta hipótesis entraba en conflicto con el “dogma central” de la biología molecular, que afirmaba que los ácidos nucleicos (DNA y RNA) eran las únicas moléculas capaces de transmitir información, por lo que la idea de que una proteína pudiera codificar su propia biosíntesis parecía ciertamente herética y fue inicialmente rechazada por muchos investigadores. Además, este modelo no era capaz de explicar la existencia de distintas variantes fenotípicas de la enfermedad, es decir, la existencia de “cepas”, ya que este concepto se consideraba vinculado a la existencia de variaciones (polimorfismos) en el material genético de los agentes infecciosos clásicos.

2.2 El descubrimiento de la PrP^{Sc}

Estos estudios, sin embargo, dispararon la investigación orientada a identificar la proteína responsable. Merz y colaboradores aportaron la primera evidencia morfológica del agente del scrapie al describir por primera vez en 1981 lo que ellos denominaron “fibrillas asociadas a scrapie” (“scrapie-associated fibrils” o SAF) en extractos de cerebros de ratones infectados con varias cepas de scrapie murino, pero no en cerebros de ratones sanos (Merz *et al.*, 1981), y más tarde en casos de pacientes humanos de CJD y GSS y en CJD transmitido a modelos experimentales (Merz *et al.*, 1983).

Prácticamente de forma simultánea, Prusiner y colaboradores describieron estas mismas estructuras, denominándolas “varillas priónicas” (“prion rods”) (Prusiner *et al.*, 1982), y mostraron que poseían propiedades similares a las de los amiloides purificados (color rojo y birrefringencia verde bajo luz polarizada tras tinción con Rojo Congo), algo que también se vinculó acertadamente con la presencia de placas de amiloide reportadas en algunos casos de scrapie, así como de otras enfermedades que ya empezaban a relacionarse con el scrapie, como la enfermedad caquetizante crónica, el kuru y el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (Prusiner *et al.*, 1983).

Mediante una mejora progresiva de los protocolos de purificación, el grupo de Prusiner consiguió finalmente aislar un polipéptido de 27-30 kDa a partir de homogenizados de cerebros de ratones y hámsteres infectados y que se co-purificaba con la infectividad (Bolton *et al.*, 1982). Poco después demostraron que este péptido, al que llamaron PrP²⁷⁻³⁰, era un componente del agente infeccioso y no un producto derivado de la patogenicidad de la infección (McKinley *et al.*, 1983). La cuasi-purificación de la PrP²⁷⁻³⁰ permitió la secuenciación de su extremo amino-terminal, una información que posteriormente fue utilizada por otros investigadores (Chesebro *et al.*, 1985; Oesch *et al.*, 1985) para sintetizar polinucleótidos isocodificantes y, con ellos, identificar el gen que codificaba la proteína en librerías de cDNA de ratón y hámster. Así, se descubrió que se trataba de un gen propio del hospedador, y no del agente

infeccioso. Es más, las bajas concentraciones de cDNA codificante que se encontraron en muestras de priones purificados no eran compatibles con la noción de que este gen fuera un componente fundamental del agente infeccioso (Oesch *et al.*, 1985).

2.3 La identificación de la PrP^C y el gen *Prnp*

La identificación de este gen cromosómico llevó al descubrimiento de su producto fisiológico, una proteína de unos 33-35 kDa, que se denominó proteína prión celular o PrP^C (Basler *et al.*, 1986). Estos estudios confirmaron que un único gen codificaba tanto la proteína celular como la patológica. La PrP^C es una proteína fisiológica de membrana, sensible a las proteasas y soluble en detergentes, mientras que la PrP^{Sc} es la forma patológica de la PrP^C y presenta una serie de propiedades físico-químicas peculiares entre las que se cuenta una resistencia parcial a las proteasas; el tratamiento de esta molécula con proteinasa K libera un residuo de 27-30 kDa que se denomina PrP^{res} y que coincide con la secuencia del péptido PrP²⁷⁻³⁰ identificado por Prusiner. Los datos parecían sugerir que la diferencia entre PrP^C y PrP^{Sc} no se hallaban a nivel de sus secuencias aminoacídicas, puesto que ambas estaban codificadas por el mismo gen (y no existen evidencias de *splicing* alternativo), si no que estribaban en modificaciones post-traduccionales o diferencias en la conformación o el estado de agregación de la proteína (Basler *et al.*, 1986).

Actualmente, la revolucionaria hipótesis “sólo proteína” está ampliamente respaldada por multitud de resultados experimentales, que incluyen la replicación *in vitro* de priones con mantenimiento de la infectividad y las propiedades de cepa (Castilla, Saá, Hetz *et al.*, 2005) e incluso la generación de priones recombinantes en ausencia total de ácidos nucleicos (Kim *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Este campo de estudio ha visto una enorme expansión en las últimas décadas con el descubrimiento de otros péptidos con propiedades similares a las de los priones de PrP, algunos de los cuales parecen tener funciones fisiológicas (MacLea, 2017). El concepto de prión ha trascendido la frontera de las llamadas “encefalopatías transmisibles emergentes” para dar el salto a otras enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer o el Parkinson; algunos autores ya proponen una ampliación del concepto de “enfermedad priónica” que incluya a todas aquellas patologías causadas por proteínas con plegamientos anómalos, capacidad de “contagiar” su conformación a sus respectivas isoformas fisiológicas, y en ocasiones, capacidad de transmisión inter-individual (Prusiner, 2013; Soto, 2012). A pesar de todo, a día de hoy no existe un consenso claro al respecto entre los miembros de la comunidad científica (Erana, 2019).

3. PrP^C, PrP^{Sc} Y EL PROCESO DE CONVERSIÓN

3.1 La proteína prión celular o PrP^C

3.1.1 El gen *Prnp* y la síntesis de PrP^C

La PrP^C es una glicoproteína de unos 230-250 aminoácidos, localizada en la membrana celular, a la que se une a través de un ancla de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). La PrP^C está codificada por el gen *PRNP* en humanos, que se localiza en el cromosoma 20 (Robakis *et al.*, 1986; Sparkes *et al.*, 1986), y por el gen *Prnp* en animales, localizado en el cromosoma 2 del ratón (Sparkes *et al.*, 1986) y el cromosoma 13 en rumiantes (Ryan & Womack, 1993), por citar algunas de las especies susceptibles. Este gen posee una secuencia muy conservada entre las distintas especies de mamíferos. En la mayoría de ellas, posee dos intrones, de los cuales sólo se transcribe y traduce el exón 2, que están separados por un intrón de unos 10 kb, aunque en algunas especies el gen posee tres exones (Westaway *et al.*, 1994). En cualquier caso, el gen sólo posee un marco de lectura abierto (ORF) y no existe constancia de que ocurran fenómenos de *splicing* alternativo durante el procesamiento del RNA mensajero.

Tras la transcripción del gen y maduración del mRNA, el inicio de la traducción tiene lugar en los ribosomas anclados a la cara citosólica del retículo endoplasmático rugoso (RER). Se sintetiza primeramente un péptido señal de unos 22 aminoácidos (Locht *et al.*, 1986), el cual se une a una traslocasa que lo orienta al interior del RER para continuar la síntesis (Caughey *et al.*, 1989). Antes de que termine la traducción, ya comienza el procesamiento de la proteína, que incluye la eliminación del péptido señal (Caughey *et al.*, 1989), la formación de un puente disulfuro entre los residuos de cisteína (C176 y C214 en la PrP^C de hámster) (Turk *et al.*, 1988), y la glicosilación de los residuos de asparagina (N181 y N197 en la PrP^C de hámster) (Haraguchi *et al.*, 1989). Con respecto a esto último, estos primeros estudios detectaron tres formas de PrP^C con distinto peso molecular y se evidenció que correspondían con tres variantes de glicosilación, según se unieran N-glicanos a ambos residuos de asparagina (diglicosilada), a uno de ellos (monoglicosilada), o a ninguno (no glicosilada) (Caughey *et al.*, 1989). La proporción relativa de las tres glicofomas depende de varios factores como la especie, el tejido y la región del cerebro, lo que tiene implicaciones a nivel de la transmisión de los priones y la neuropatología (Beringue *et al.*, 2003; DeArmond *et al.*, 1999; Somerville *et al.*, 2005).

Al final de la traducción, se elimina una secuencia hidrofóbica de 22-23 aminoácidos del extremo carboxi-terminal y mediante la acción de una transaminidasa se incorpora una molécula de glicosil-fosfatidil-inositol que actúa como anclaje a la membrana (Stahl *et al.*, 1987). Posteriormente, la PrP^C madura es transportada por el aparato de Golgi hasta la membrana celular, dónde se localiza fundamentalmente a nivel de microdominios ricos en colesterol y esfingolípicos denominados balsas lipídicas (Vey *et*

al., 1996), aunque también ha sido detectada a nivel del citosol (Mironov *et al.*, 2003). Se piensa que existe una recirculación continua de la PrP^C entre los compartimentos intracelulares y la superficie celular a lo largo de la vía endosomal (Peters *et al.*, 2003; Vey *et al.*, 1996).

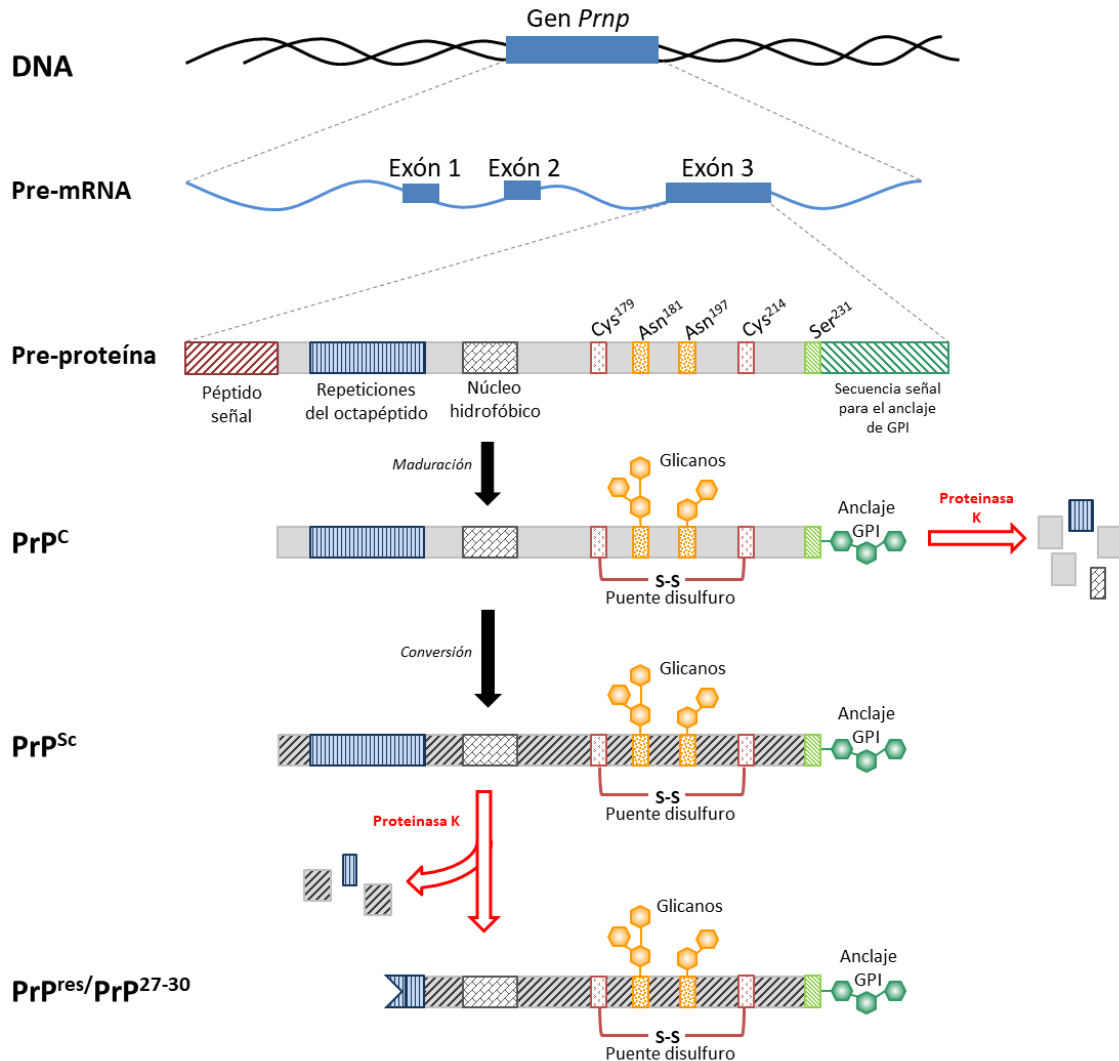


Figura 1. Síntesis y maduración de la PrP^C y su conversión a PrP^{Sc}.

3.1.2 La estructura de la PrP^C

La estructura secundaria de la PrP^C ha sido investigada en profundidad mediante estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (Riek *et al.*, 1997). Se conoce que su extremo amino-terminal se halla desestructurado y posee una estructura flexible, y que contiene una región denominada zona de repeticiones de octapéptido (OPR), consistente en un número variable de repeticiones de una secuencia de 8 aminoácidos altamente conservada en los mamíferos (PHGGGWGQ) (Zahn, 2003). Por el contrario, el extremo carboxi-terminal de la PrP^C conforma un dominio globular altamente estructurado compuesto por tres zonas de hélice α y dos pequeñas láminas β antiparalelas; el dominio globular es estabilizado por el puente disulfuro que se

establece entre dos residuos de cisteína (Turk *et al.*, 1988) y contiene además los dos residuos de asparagina susceptibles a glicosilarse durante el procesamiento post-traduccional de la proteína (Haraguchi *et al.*, 1989). Al residuo serina-231 se le une el ancla de glicosil-fosfatidil-inositol (Stahl *et al.*, 1987). Entre el dominio desestructurado y el dominio globular, existe una región denominada núcleo hidrofóbico, que posee también una secuencia altamente conservada entre especies. La mayoría de las mutaciones responsables de las formas familiares de enfermedad priónica en humanos se localizan en el dominio globular, aunque existen algunas formas atípicas de GSS causadas por inserciones o deleciones en la zona OPR (Takada *et al.*, 2017).

3.1.3 La distribución de la PrP^C en el organismo

Esta proteína celular se expresa de forma constitutiva en prácticamente todos los tejidos del organismo, aunque está ampliamente descrito que los mayores niveles de expresión se localizan a nivel del cerebro (Chesebro *et al.*, 1985), fundamentalmente en neuronas y células gliales (Adle-Biassette *et al.*, 2006). Además, ha sido detectada a nivel de diversos tejidos no neurales, incluyendo bazo, pulmón, glándula adrenal, linfonodos, útero, corazón, músculo esquelético, glándula parótida, riñón, proventrículos y mama en rumiantes (Horiuchi *et al.*, 1995), y en leucocitos circulantes, corazón, músculo esquelético, pulmón, tracto intestinal, bazo, testículos y ovarios en ratones (Bendheim *et al.*, 1992).

3.1.4 Las funciones de la PrP^C

A pesar de la concienzuda caracterización que se ha hecho de la estructura y la localización de la PrP^C, sus funciones fisiológicas aún no se conocen por completo. Se sabe que esta proteína interactúa con otras macromoléculas de la membrana plasmática, de compartimentos subcelulares y de las vías de secreción celular, como la laminina y la ST1, ambas implicadas en la consolidación de la memoria (Coitinho *et al.*, 2006; Coitinho *et al.*, 2007), o la tubulina, el componente principal del citoesqueleto (Hachiya *et al.*, 2004). Por otra parte, la zona de repetición de octapéptidos posee capacidad de unión al cobre (Brown, D. R. *et al.*, 1997), lo que provee a la proteína de una función superóxido-dismutasa y sugiere su papel en la protección contra los radicales libres de oxígeno (función antioxidante) (Brown, D. R. *et al.*, 1999). Además, su localización en la membrana celular a nivel de las balsas lipídicas sugiere su participación en vías de transducción y señalización intracelular (Zomosa-Signoret *et al.*, 2008). Por último, se sabe que la PrP^C participa en la regulación de la muerte y la supervivencia celular. Aunque el mecanismo no está claro, se piensa que posee una función anti-apoptótica. Ciertas similitudes entre las estructuras de la PrP^C y el grupo de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 sugieren que la PrP^C podría ser un miembro de esta familia proteica, que actúa protegiendo a las células de la acción pro-apoptótica de las proteínas de tipo Bax (Bounhar *et al.*, 2001; Roucou *et al.*, 2003).

A pesar de todo, existen evidencias de que la presencia de esta proteína no es crítica para la supervivencia de los individuos, ya que los ratones *knock-out* para la PrP^C permanecen fundamentalmente sanos durante toda su vida (Bueler *et al.*, 1992).

3.2 La proteína prión patológica o PrP^{Sc}

Como ya se ha comentado, la diferencia entre la PrP^C y la PrP^{Sc} estriba únicamente en su estructura tridimensional. Al contrario de lo que ocurre con la de la PrP^C, la estructura de la PrP^{Sc} no ha podido discernirse por completo todavía, debido a que las técnicas biofísica clásicas que se emplean para estos estudios, como la cristalografía de rayos X o la resonancia magnética nuclear (RMN), requieren de preparaciones muy puras de proteína en estado monomérico, una condición que no se cumple en el caso de la PrP^{Sc}, que tiende a formar agregados y a manifestarse como una mezcla variable de polímeros con distintos pesos moleculares (Silveira *et al.*, 2005; Tixador *et al.*, 2010). En consecuencia, los modelos actuales de la estructura de los priones se basan en una miríada de datos procedentes de técnicas de baja resolución (fundamentalmente dicroísmo circular y espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)) y en predicciones teóricas (Diaz-Espinoza & Soto, 2012).

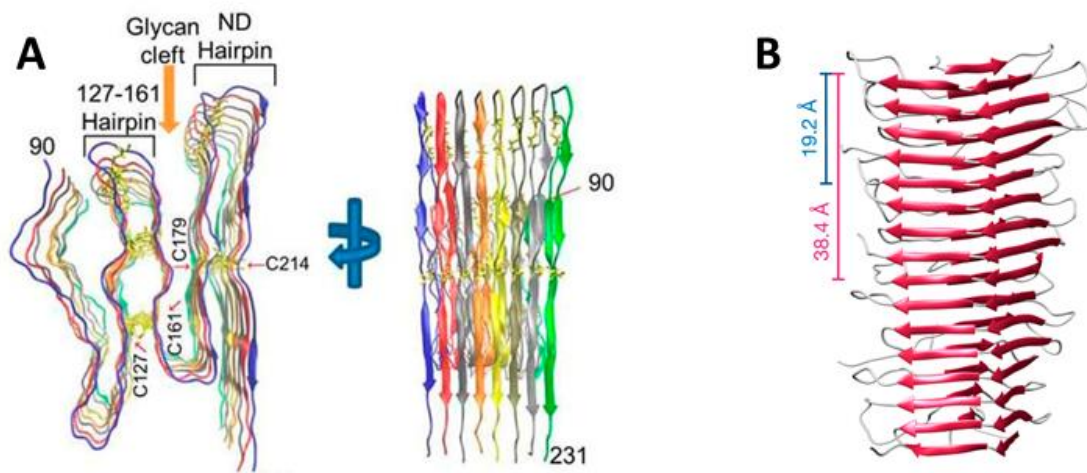


Figura 2. Los dos modelos más cercanos hoy en día a la estructura de la PrP^{Sc}. A) Modelo “parallel in-register intermolecular β -sheet” (PIRIBS): cada monómero de PrP^{Sc} es un piso de la fibra de amiloide. B) Modelo “four-rung β -solenoid” (4R β S): cada monómero de PrP^{Sc} se estructura en cuatro pisos de la fibra de amiloide. Adaptado de:(Grovetman *et al.*, 2014; Spagnolli *et al.*, 2019)

Sin embargo, ninguno de los modelos propuestos logra satisfacer por completo las exigencias de los datos experimentales. Actualmente, los dos modelos que parecen más cerca de la estructura real de la PrP^{Sc} son el modelo de lámina β intermolecular paralela en registro (“Parallel In Register Intermolecular β -Sheet” o PIRIBS) (Grovetman *et al.*, 2014) y el modelo de β -solenoides de cuatro escalones (“4-rung β -solenoid”) (Silva *et al.*, 2015). Estos dos modelos difieren sustancialmente en la disposición de las

láminas β y en cómo cada monómero de PrP^{Sc} se posiciona dentro de la fibra e interacciona con los monómeros adyacentes. Sin embargo, ambos coinciden en señalar que la PrP^{Sc} está compuesta enteramente por estructura en lámina β , giros y lazos, en contra de lo postulado por modelos anteriores, que afirmaban que la PrP^{Sc} estaba formada aproximadamente por un 30% de estructura en α -hélice y un 40% de lámina β (Pan *et al.*, 1993).

Lo que sí parece cierto es que la PrP^{Sc} tiene tendencia a agregarse y formar fibras de sustancia amiloidea, descritas como SAF por Merz (Merz *et al.*, 1981; Merz *et al.*, 1983) y como varillas priónicas por Prusiner (Prusiner *et al.*, 1982). Esta capacidad es la que le aporta sus propiedades características, en las que difiere de la PrP^C: insolubilidad en detergentes, resistencia al calor, las radiaciones ultravioletas e ionizantes y a la mayor parte de los desinfectantes químicos, y resistencia parcial a la digestión con proteinasa K. Como ya se ha explicado, el tratamiento de la PrP^{Sc} con proteinasa K degrada un fragmento N-terminal de unos 90 aminoácidos y da lugar a un residuo C-terminal con un peso molecular de 27-30 kDa denominado PrP^{res}, que retiene la infectividad (Bolton *et al.*, 1982) y que ha sido utilizado rutinariamente como el principal biomarcador para el diagnóstico de la enfermedad, así como para la discriminación de cepas priónicas, como se expone en secciones posteriores.

3.3 El mecanismo de conversión

Independientemente de la estructura terciaria y cuaternaria de la PrP^{Sc} y de cómo ésta se relaciona con la infectividad y las propiedades bioquímicas y biopatológicas de los priones, el evento central en la patogenia de las EET es la conversión de la PrP^C en su isoforma patológica mediante un cambio conformacional. La presencia de PrP^C es por lo tanto indispensable para el desarrollo de una EET; los primeros estudios con ratones *knock-out* para el gen *Prnp* demostraron que la ausencia de la isoforma celular prevenía la propagación de los priones y el desarrollo de enfermedad clínica (Bueler *et al.*, 1993; Sailer *et al.*, 1994; Weissmann *et al.*, 1994).

Las primeras evidencias experimentales señalaron que la conversión ocurría tras la formación de un complejo PrP^C/PrP^{Sc}, y se hipotetizó que éste podría ser heterodimérico (Prusiner *et al.*, 1990) o multimérico (Oesch *et al.*, 1990). La homología entre las secuencias de los dos componentes de este complejo, la PrP^C y la PrP^{Sc}, facilitaría la interacción y el proceso de conversión, lo que proveía de una base molecular para explicar el fenómeno de las barreras de transmisión (Horiuchi *et al.*, 2000). Sin embargo, este complejo nunca ha sido purificado y no se conocen con exactitud los mecanismos implicados en la conversión (Aguzzi & Calella, 2009).

Dentro del marco de la hipótesis “solo proteína” y a partir de estos limitados conocimientos sobre la interacción entre PrP^C y PrP^{Sc}, se han propuesto dos modelos que explican la propagación de los priones:

- Modelo de “replegamiento asistido por molde” (“template-directed refolding”): defendida por el grupo de investigación de Stanley Prusiner (Cohen & Prusiner, 1998), esta hipótesis propone que la PrP^{Sc} actúa como un “molde” que dirige el cambio conformacional de la PrP^C. La transformación espontánea de PrP^C a PrP^{Sc} estaría impedida por la existencia de una barrera energética sustancial. Dicha conversión se daría tras la interacción de la PrP^{Sc} con un estado conformacional alternativo de la PrP^C, denominado PrP*^C; se formaría así un heterodímero PrP^{Sc}-PrP*^C que posteriormente se convertiría en un homodímero PrP^{Sc}-PrP^{Sc}. Para que este modelo funcione, la presencia del intermediario PrP*^C requiere de un factor adicional que lo estabilice, la largamente buscada “proteína X”, que a día de hoy todavía no ha sido identificada. Este proceso de replicación sería exponencial y continuaría hasta formar agregados de amiloide de PrP, que serían una consecuencia de la patogenia de la enfermedad y no un elemento central en el mecanismo de propagación de la PrP^{Sc}, como sugiere el segundo modelo. En ese marco teórico, las formas adquiridas de enfermedad priónica estarían causadas por la entrada en el organismo de moléculas de PrP^{Sc} de origen exógeno que desencadenarían el proceso; las formas genéticas, por un efecto desestabilizador de la mutación que incrementaría la concentración de PrP*^C o la estabilidad del dímero PrP*^C-PrP*^C; y las formas esporádicas, por un raro evento de formación y conversión de un dímero PrP*^C-PrP*^C o por mutaciones somáticas.
- Modelo de “nucleación sembrada” o de “nucleación-polimerización”: esta hipótesis establece que la PrP^C y la PrP^{Sc}, en solución, se hallan en un estado de equilibrio termodinámico que en condiciones fisiológicas está desplazado hacia la PrP^C. La PrP^{Sc} en estado monomérico sería altamente inestable y tendería a formar agregados con arquitectura amiloidea. El concepto de “polimerización dependiente de nucleación”, aplicado a los amiloides, y en concreto al amiloide de PrP (Jarrett & Lansbury, 1993), ofrece un modelo de replicación en el que el inductor de la conversión de la PrP^C sería un agregado altamente ordenador de moléculas de PrP^{Sc}. Esta “semilla” reclutaría monómeros de PrP^C de origen endógeno, generando un crecimiento progresivo de la fibra de amiloide. Posteriormente, la fragmentación de la fibra daría lugar a nuevos núcleos de polimerización que continuarían el proceso de forma exponencial. Esta teoría interpreta a los priones infecciosos, en los casos de EET adquiridas, como agregados de PrP^{Sc} que penetran en el organismo y actúan como una “semilla” que inicia el proceso de polimerización, mientras que, en las EET de tipo espontáneo, la formación de los primeros núcleos sería un proceso lento e infrecuente, que se vería acelerado por la presencia de mutaciones en el caso de las EET hereditarias. Estudios más recientes sugieren que los iniciadores más efectivos de la polimerización son oligómeros de pequeño tamaño (de entre 14

y 28 moléculas de PrP^{Sc}) (Silveira *et al.*, 2005), mientras que los grandes agregados amiloideos, observados en cierto número de enfermedades priónicas, son de hecho relativamente inocuos y posiblemente constituyan un mecanismo de defensa para secuestrar las especies más pequeñas y peligrosas (Collinge & Clarke, 2007; Chesebro *et al.*, 2005; Hill & Collinge, 2003; Piccardo *et al.*, 2007; Tuzi *et al.*, 2008).

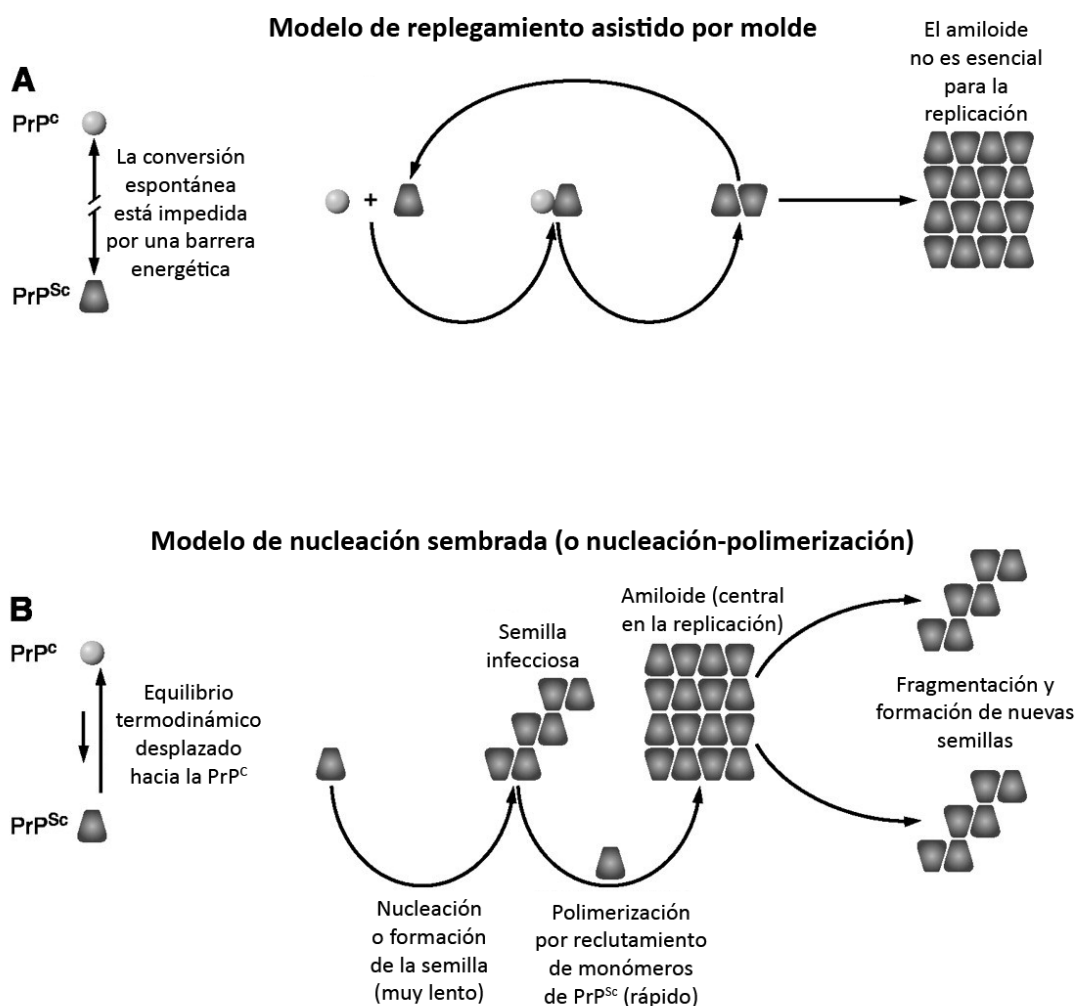


Figura 3. Modelos de replicación de los priones. A) Modelo de replegamiento asistido por molde. B) Modelo de nucleación sembrada. Adaptado de: (Aguzzi & Calella, 2009)

4. LOS FENÓMENOS DE CEPAS Y BARRERA DE TRANSMISIÓN

La existencia de distintas cepas de priones es tal vez la más controvertida de las propiedades de estos agentes infecciosos y mantuvo en jaque durante décadas a los defensores de la teoría del prión, puesto que en el marco teórico de la biología molecular clásica era impensable que una simple proteína pudiera explicar una variabilidad tan amplia en el fenotipo de la enfermedad que causaba.

Por su parte, el concepto de barrera de transmisión ha evolucionado enormemente hasta englobar, actualmente, numerosos factores que afectan, de formas diversas, a la transmisión de los priones entre distintas especies e incluso entre individuos de la misma especie.

El marco teórico actual incide en la relación existente entre estos dos fenómenos tan característicos de las EET, interpretándolos como dos caras de la misma moneda.

4.1 El fenómeno de cepas

4.1.1 El desarrollo del concepto de cepa priónica

La primera evidencia de la existencia de cepas de scrapie fue publicada a principios de los años 60 por el grupo de Pattison, Gordon y Millson. Ya en 1959 habían conseguido transmitir el scrapie a cabras mediante inoculación intracerebral, constatando la alta susceptibilidad de esta especie en comparación con la oveja (Pattison *et al.*, 1959). En 1961, estos investigadores describieron la existencia de distintas “variantes” del scrapie, al observar dos síndromes clínicos perfectamente diferenciables en cabras infectadas experimentalmente (que denominaron “scratching” y “nervous”) cuyas características se mantenían en pases seriados en el mismo hospedador. Al desconocerse por aquel entonces la naturaleza del agente responsable del scrapie, emplearon el término “cepas” para referirse a cada una de estas variantes, por analogía con el concepto clásico de cepa (Pattison & Millson, 1961).

Poco después, Chandler consiguió transmitir un caso de scrapie “drowsy” (una denominación alternativa para los casos de tipo “nervous” del scrapie caprino) a ratones, que desarrollaron síntomas y lesiones histopatológicas similares a las del scrapie en ovejas y cabras (Chandler, 1961). Estos estudios, además de demostrar la capacidad del scrapie de saltar a especies taxonómicamente más alejadas que las vistas hasta ese momento, proveyeron de un modelo experimental más adecuado para la realización de experimentos ya a gran escala. Sin embargo, estas primeras transmisiones del scrapie a modelos murinos experimentales tuvieron que lidiar con un fenómeno que inicialmente se denominó “barrera de especie”, que suponía un alargamiento del tiempo necesario para que los ratones desarrollasen signos clínicos y una disminución de la tasa de ataque en primer pase (Priola, 1999). Como se explica más adelante, este fenómeno está íntimamente relacionado con la existencia de cepas.

Las investigaciones de Zlotnik y Rennie en los años siguientes asentaron el concepto de “scrapie murino”, demostrando que se trataba de una entidad patológica real, ya que podía transmitirse de un ratón a otro (Zlotnik & Rennie, 1962; Zlotnik & Rennie, 1963), así como retrógradamente (del ratón a los hospedadores naturales, oveja y cabra) e incluso a otros modelos experimentales (rata y hámster) (Zlotnik & Rennie, 1965).

4.1.2 Metodologías de caracterización de cepas de scrapie

La estandarización del uso de los modelos murinos y el desarrollo de una compleja metodología de caracterización permitió identificar numerosas cepas de “scrapie adaptado al ratón”, como por ejemplo la ME7 (Zlotnik & Rennie, 1965) y la 22A (Dickinson & Meikle, 1969), entre otras muchas (para una revisión, ver (Beringue, Vilotte *et al.*, 2008)). Además, se describieron fenómenos de competición entre cepas (Dickinson *et al.*, 1972) y de selección y mutación de cepas en función del genotipo del gen *Sinc* y la especie (Bruce, M. E., 1993). Así, se empezó a considerar al scrapie natural como una enfermedad de naturaleza heterogénea, un “cajón de sastre” que incluía un número desconocido de cepas del agente, cuya caracterización requería el empleo de bioensayos. Esta gran heterogeneidad del scrapie propició las críticas a la hipótesis “sólo proteína”, pues en el paradigma de la época, un agente causal formado exclusivamente por una proteína no podía explicar tal variabilidad.

4.1.2.1 El gen *Sinc* y los periodos de incubación

Dada la naturaleza proteica del agente responsable de las EET, la caracterización de las cepas se basó inicialmente, casi exclusivamente, en el fenotipo de la enfermedad que exhibían los ratones inoculados (Dearmond & Prusiner, 1993; Fraser & Dickinson, 1968). Sin embargo, se observó que el fenotipo de la enfermedad en ratones dependía también de la línea murina con la que se trabajaba (Dickinson *et al.*, 1968), lo que sugería un control genético complejo por parte del hospedador en adición a las propiedades intrínsecas de la cepa infectante. Esto suponía que la caracterización de cepas debía tener en cuenta las características propias de la línea murina.

Así, se identificó un *locus* en ratones *wild type* que afectaba a los periodos de incubación (tiempo entre la inoculación y el desarrollo de signos clínicos o la muerte) tras la infección experimental con distintas cepas (Dickinson *et al.*, 1968; Dickinson & Meikle, 1971). Inicialmente, este gen fue denominado *Sinc* (de “scrapie incubation”) y poseía dos alelos, *s7* y *p7*. Los animales homocigotos para cada uno de los alelos respondía de forma diferente a la inoculación con distintas cepas de scrapie murino, de modo que la cepa ME7 (y cepas similares) daba periodos de incubación cortos en animales *Sinc*^{*s7/s7*} y largos en *Sinc*^{*p7/p7*}, mientras que esta tendencia se invertía para las cepas de tipo 22A. Además, se vio que el periodo de incubación en animales heterocigotos *Sinc*^{*s7/p7*} podía ser intermedio entre los dos genotipos homocigotos, más largo o más corto según si existían fenómenos de inhibición dominante negativa, lo que también dependía de la cepa.

Años más tarde, con el descubrimiento de la proteína prión celular y el gen que la codificaba (Chesebro *et al.*, 1985; Oesch *et al.*, 1985), tanto el gen *Sinc* como el gen *Sip* (que controlaba el periodo de incubación en la especie ovina) se asimilaron a *Prnp* (Bruce, M. E. *et al.*, 1991; Hunter *et al.*, 1989; Hunter *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 1998;

Westaway *et al.*, 1987). Así, las dos variantes del gen *Sinc* se identificaron con dos alelos del gen *Prnp* murino (*Prnp^a* y *Prnp^b*) (Westaway *et al.*, 1987).

4.1.2.2 El perfil lesional

La neuropatología, especialmente la distribución y la intensidad del cambio esponjiforme, era otra de las características estudiadas para perfilar el fenotipo de la enfermedad en ratones. Por ello, en 1968, Fraser y Dickinson introdujeron el concepto de “perfil lesional”, una metodología estandarizada de valoración semicuantitativa del cambio esponjiforme en el cerebro de los ratones (Fraser & Dickinson, 1968). Más tarde, demostraron que el perfil lesional era una propiedad intrínseca de la cepa empleada, altamente repetible en inoculaciones en la misma línea murina, y que por lo tanto podía emplearse como un parámetro para la caracterización y diferenciación de cepas. Además, mientras que el periodo de incubación de la enfermedad varía en función de la dosis de agente infeccioso, el perfil lesional de una determinada cepa se mantiene constante (Fraser & Dickinson, 1973).

Los signos clínicos, los periodos de incubación y el perfil lesional en animales con distintos genotipos para la PrP^C constituyeron durante décadas la tríada de parámetros sobre los que se asentaba la caracterización de cepas.

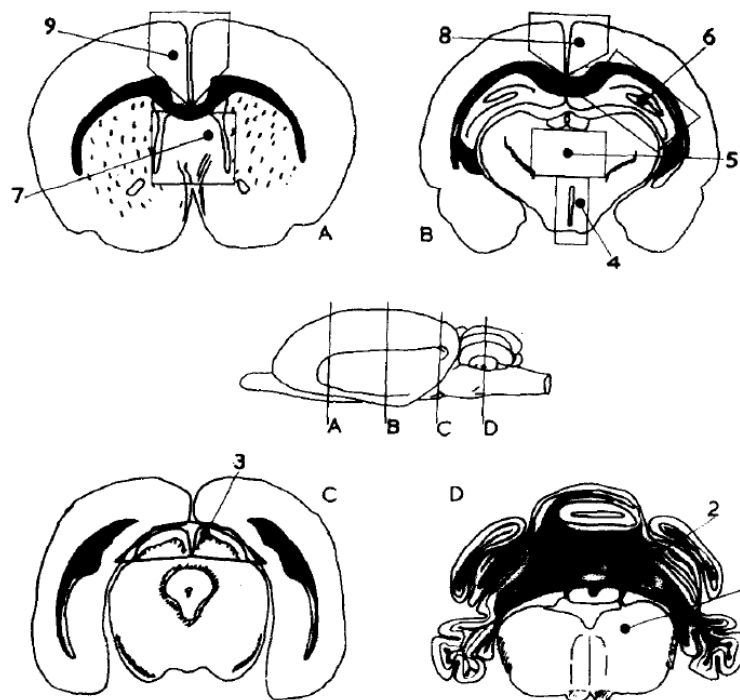


Figura 4. Metodología de perfil lesional propuesta por Fraser y Dickinson. Las áreas cerebrales que se analizan son: 1) núcleos dorsales de la médula oblongada, 2) corteza del cerebelo, 3) corteza del colículo superior del mesencéfalo, 4) hipotálamo (zona anexa al tercer ventrículo), 5) tálamo, 6) hipocampo (giro dentado y asta de Amon), 7) área septal, 8) corteza cerebral a nivel del tálamo y 9) corteza cerebral a nivel del área septal (o corteza frontal). Adaptado de: (Fraser & Dickinson, 1968).

4.1.2.3 Metodologías más modernas de caracterización de cepas

Con el descubrimiento de la proteína prión y su asociación con la enfermedad, se desarrollaron técnicas de diagnóstico orientadas a la detección de PrP^{Sc}, tanto directamente en los tejidos de los animales infectados mediante inmunohistoquímica como mediante inmunoblot. Ambas aproximaciones diagnósticas, que se detallan en profundidad en la sección 6.2.2, pueden emplearse también para la caracterización de cepas, ya que tanto la distribución y los tipos de depósito de PrP^{Sc} en el encéfalo (Gonzalez *et al.*, 2002; Gonzalez *et al.*, 2003) como las características bioquímicas de la PrP^{res} (peso molecular de las tres glicofomas y proporción relativa entre ellas) (Gretzschel *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2003; Somerville, Chong *et al.*, 1997) son propiedades de cepa.

4.1.3 Bases moleculares del fenómeno de cepa

La mayor parte de los trabajos realizados durante esta época con la enfermedad del scrapie estuvieron orientados a identificar la mayor cantidad posible de cepas del agente. Sin embargo, paralelamente a estos estudios, en los años 90 Bessen y Marsh trabajaban con otra enfermedad priónica natural, la encefalopatía transmisible del visón (TME), que ya había sido transmitida experimentalmente a diversos modelos experimentales (Kimberlin *et al.*, 1986; Marsh *et al.*, 1969). Tratando de comprender el fenómeno de cepa, estos investigadores inocularon distintos aislados de TME en hámsteres e identificaron dos cepas con propiedades biológicas claramente diferenciables a nivel de periodos de incubación, signos clínicos, neuropatología y acumulación de infectividad en los cerebros de los hámsteres, y que además poseían distintas patogenicidades cuando eran inoculadas de nuevo en visones. Estas dos cepas se denominaron “hyper” (HY) y “drowsy” (DY), en referencia al síndrome clínico producido en hámsteres (Bessen & Marsh, 1992b).

En estudios posteriores, demostraron que estas dos cepas se asociaban con dos tipos de PrP^{Sc} que presentaban propiedades bioquímicas diferentes, incluyendo solubilidad en detergentes, peso molecular en Western Blot, resistencia a la digestión con proteinasa K (Bessen & Marsh, 1992a), y localización del extremo N-terminal de la PrP^{res} por secuenciación proteica (Bessen & Marsh, 1994). Por lo tanto, se sugirió que las conformaciones alternativas de la PrP^{Sc} exponían distintos residuos del polipéptido a la acción de la proteinasa. Estos estudios, en conjunción con los experimentos con ratones transgénicos y cepas de origen humano, realizados por el grupo de Prusiner en 1996 (Telling *et al.*, 1996), sentaron las bases de la hipótesis según la cual las diferencias entre cepas están codificadas a nivel de la estructura tridimensional de la PrP^{Sc}. Ésta puede adoptar varias conformaciones que le atribuyen distintas características biopatológicas.

Según algunos autores, la variabilidad de conformaciones de PrP^{Sc} posibles estaría limitada por la secuencia de la PrP^C del hospedador donde se propagan. Por ejemplo, cuando se hizo un bioensayo con la cepa ME7 en ratones que expresan una PrP^C quimérica hámster/ratón, se obtuvo una cepa indistinguible de la cepa Sc237 (o 263K), a pesar de que el origen de la misma es otro completamente diferente (Scott, M. R. *et al.*, 1997).

Algunos modelos más modernos postulan que las propiedades de cepa son características puramente conformacionales que emanan de la naturaleza amiloide de los priones. Surewicz y colaboradores modelaron la diversidad de cepas priónicas mediante un sistema simplificado basado en la nucleación-polimerización de monómeros de PrP truncada de origen recombinante. En estos estudios, observaron que, mientras que las fibras preformadas de amiloide de PrP murina (“semillas” murinas) eran incapaces de convertir los monómeros de PrP de hámster, el amiloide de PrP de hámster sí era capaz de convertir los monómeros de PrP murina, que adoptaban la estructura característica del amiloide de hámster y adquirían a su vez la capacidad de convertir monómeros de PrP de ratón (Jones & Surewicz, 2005). Estos resultados sugerían que las propiedades de cepa están codificadas por la fibra de amiloide (independientemente de su origen y, por tanto, de la secuencia primaria de su PrP), y que ciertos tipos de amiloides son capaces de interactuar con moléculas de PrP heterotípicas e inducir su conversión, mientras que otros no lo son. En este marco, la secuencia primaria de la PrP únicamente determina si un determinado monómero es adaptable a la conformación impuesta por la “semilla”, por lo que afecta a la barrera de transmisión al determinar el rango de conformaciones posibles aceptadas por una PrP^C concreta.

En conjunto, estos estudios abrieron la puerta al desarrollo del concepto de la selección conformacional, del que hablaremos más adelante.

4.2 La barrera de transmisión

4.2.1 La noción primitiva de “barrera de especie”

La transmisibilidad de las enfermedades priónicas se conoce desde los años 30 del siglo pasado, cuando Cuillé y Chelle consiguieron inducir el scrapie en ovejas mediante inoculación de extractos de tejido nervioso de ovinos enfermos (Liberski, 2012). Posteriormente se confirmó que los priones responsables de esta enfermedad eran capaces de infectar a especies taxonómicamente alejadas, incluyendo ratones (Chandler, 1961; Zlotnik & Rennie, 1962), ratas y hámsteres (Chandler & Fisher, 1963; Zlotnik & Rennie, 1965). Típicamente, estas transmisiones inter-específicas se caracterizaban por largos periodos de incubación, que posteriormente se acortaban y estabilizaban en pases sucesivos, así como por tasas de ataque (proporción de animales inoculados que finalmente enferman) incompletas en el primer pase (Bruce,

M. E., 1993). Este fenómeno, inicialmente conocido como “barrera de especie” (Priola, 1999), constituyó una dificultad para los primeros investigadores que intentaron transmitir el scrapie a modelos murinos.

4.2.2 La “barrera genotípica”

Los primeros estudios sobre el fenómeno de la barrera de especie la atribuyeron a una falta de homología entre las secuencias de la PrP^C de la especie donante y la receptora. Esta hipótesis se basó fundamentalmente en estudios sobre la barrera de especie entre el ratón y el hámster, una de las más fuertes y fáciles de explorar mediante modelos de fácil manejo (roedores). Entre estos estudios destacan los del grupo de Prusiner, que trabajó con ratones transgénicos que expresaban la PrP^C del hámster junto con la PrP^C endógena de ratón. La inoculación de priones de hámster en estos animales producía mayoritariamente la aparición de agregados de PrP^{Sc} de hámster, mientras que el uso de priones murinos provocaba el acúmulo de PrP^{Sc} de ratón (Prusiner *et al.*, 1990; Scott, M. *et al.*, 1989).

En otro estudio sobre la transmisión de TME entre visones y hurones, se constató que la fuerte barrera existente entre estas dos especies se sustentaba únicamente en dos cambios aminoacídicos en la secuencia de la PrP^C, lo que sugería que variaciones mínimas en dicha secuencia podían alterar drásticamente la capacidad de transmisión interespecífica de los priones (Bartz *et al.*, 1994). Trabajos posteriores con ratones transgénicos que expresaban una PrP^C quimérica (con mezcla de secuencias de varias especies) llegaron a identificar los cambios aminoacídicos esenciales que contribuían a esta barrera de especie (Scott, M. *et al.*, 1993).

Así, se sugirió que es la secuencia de la PrP^{Sc} entrante la que determina el fenotipo de la enfermedad transmitida tanto a nivel de periodos de incubación como de características neuropatológicas (Prusiner *et al.*, 1990).

4.2.2.1 Ejemplos concretos de la influencia del genotipo en la barrera de transmisión

El ejemplo más estudiado de la influencia del genotipo en el conjunto de la barrera de transmisión es probablemente el del gen que codifica la proteína prión celular en ratones (Westaway *et al.*, 1987). Este gen, que como ya se ha dicho se llamó primitivamente *Sinc* (Dickinson *et al.*, 1968; Dickinson & Meikle, 1971), posee polimorfismos a nivel de los codones 108 (codifica leucina o fenilalanina) y 189 (codifica treonina o valina). Estas dos secuencias de PrP^C son capaces de propagar las cepas de scrapie murino en distinto grado, de forma que se pueden diferenciar por su periodo de incubación en cada uno de los genotipos.

Con respecto a la especie ovina, se han reportado más de 65 polimorfismos en la secuencia de la PrP^C (Meydan *et al.*, 2012), de los cuales la mayoría parece no tener

efecto sobre la susceptibilidad al scrapie. Sin embargo, los polimorfismos a nivel de los codones 136, 154 y 171 sí son determinantes para el desarrollo de esta patología y su diseminación en las poblaciones ovinas (Goldmann *et al.*, 1994). Así, el codón 136 puede codificar alanina (A), valina (V) o treonina (T); el codón 154, arginina (R), histidina (H) o leucina (L); y el codón 171 glutamina (Q), arginina (R), histidina (H) o lisina (K). De las posibles combinaciones de estas variantes alélicas, sólo cinco haplotipos han sido frecuentemente descritos en los rebaños: ARR, ARQ, AHQ, ARH y VRQ (Belt *et al.*, 1995). Los 15 genotipos que resultan de la combinación de estos haplotipos se asocian con susceptibilidades muy diferentes al scrapie clásico, lo que ha propiciado su clasificación en 5 grupos de riesgo que se ha empleado para el control genético de las poblaciones de rumiantes ovinos con vistas al control y la erradicación del scrapie (Dawson *et al.*, 1998). En esta categorización, el haplotipo ARR aporta una alta resistencia a la infección por scrapie clásico y además tiene un efecto dominante, por lo que los animales heterocigotos que poseen una copia de este alelo presentan mayor resistencia a pesar de la presencia de alelos de mayor susceptibilidad. Por el contrario, la mayor susceptibilidad al scrapie clásico se asocia con el alelo VRQ, mientras que el alelo ARQ, además de ser el más frecuente en las poblaciones ovinas de la zona mediterránea (Acin, Martin-Burriel, Goldmann *et al.*, 2004; Acin, Martin-Burriel, Monleon *et al.*, 2004; Acutis *et al.*, 2004; Serrano *et al.*, 2007), se asocia con un riesgo moderado-alto.

La importancia de la secuencia genética para las barreras de transmisión llevó al desarrollo de líneas murinas transgénicas que expresan la PrP^C del hospedador original (en este caso, la oveja), con el objetivo de estudiar más fielmente la variedad real de cepas, en ausencia de fenómenos de selección y/o mutación. Así, los modelos transgénicos ovinos son más susceptibles a la infección con aislados directos de scrapie (Vilotte *et al.*, 2001) y se han empleado en multitud de estudios de caracterización de cepas (Bencsik *et al.*, 2007; Bruce, M. E. *et al.*, 2002; Griffiths *et al.*, 2010; Groschup *et al.*, 2007; Thackray *et al.*, 2008; Thackray *et al.*, 2011; Thackray *et al.*, 2012).

En la especie caprina se han descrito igualmente numerosos polimorfismos en el gen *Prnp*, de los cuales algunos se han asociado con resistencia a la infección por scrapie y BSE (Acin *et al.*, 2013; Goldmann *et al.*, 2011; Serrano *et al.*, 2009; Vaccari *et al.*, 2006).

Por su parte, el genotipo a nivel del codón 129 de la PrP^C humana ejerce una importante influencia en la susceptibilidad a las enfermedades priónicas humanas adquiridas, y también a las de tipo espontáneo, como se menciona en la sección 5.2. Este codón es polimórfico y puede codificar metionina (129M) o valina (129V) (Collinge *et al.*, 1991; Palmer *et al.*, 1991). La mayoría de los casos de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica (iCJD), asociada al uso de hormona de crecimiento humana contaminada (Deslys *et al.*, 1994), y la totalidad de los casos de variante de la

enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) descritos hasta la fecha (con una sola excepción (Mok *et al.*, 2017)) han sido homocigotos 129M/M (Will *et al.*, 1999).

4.2.3 La “barrera de cepa”

Sin obviar el papel crucial del genotipo, investigaciones posteriores demostraron que la naturaleza de las barreras de transmisión era más compleja al evidenciar que distintas cepas priónicas originadas en individuos de la misma especie (y por lo tanto, con la misma secuencia primaria) se transmitían con eficiencias muy distintas. Tal es el caso de las dos cepas de TME aisladas en hámsteres, “hyper” y “drowsy”, que no sólo poseen propiedades bioquímicas diferentes (como se ha comentado anteriormente), sino que también presentan patogenicidades distintas cuando se transmiten de nuevo a su hospedador natural, el visón. Al no existir diferencias genotípicas ni entre los hospedadores en las que fueron aisladas ni entre los hospedadores a las que se transmiten, la divergencia en el comportamiento de los dos aislados sólo puede interpretarse como cepas diferentes (Bessen & Marsh, 1992a; Bessen & Marsh, 1992b; Bessen & Marsh, 1994).

El caso más llamativo de este fenómeno fue el de las diferencias en la transmisión de casos de sCJD y vCJD a ratones *wild type* (que expresan la PrP^C del ratón) y ratones transgénicos para la PrP^C humana. Los ratones *wild type* son relativamente susceptibles a la infección con vCJD (Fraser *et al.*, 1988; Fraser *et al.*, 1992), mientras que los ratones transgénicos humanos son bastante resistentes a la infección con esta cepa. Por el contrario, los aislados de sCJD son eficientemente transmitidos a ratones transgénicos humanos, mientras que la transmisión de esta cepa a ratones *wild type* está prácticamente imposibilitada por una barrera de transmisión muy fuerte (Collinge *et al.*, 1995; Hill *et al.*, 1997). Estos dos tipos de prión poseían la misma secuencia primaria, y sin embargo presentaban comportamientos opuestos en lo referente a su transmisibilidad, lo que incide de nuevo en la importancia de la cepa en la capacidad de transmisión interespecífica (Collinge, 1999; Collinge, 2001).

Este fenómeno también se observa en otros tipos de EET. Existen cepas de scrapie que se transmiten a ratones *wild type* con barreras de transmisión de fuerza variable, mientras que otras, como el aislado experimental CH1641 (Foster & Dickinson, 1988) o el scrapie atípico (cepa Nor98) (Benestad *et al.*, 2003; Benestad *et al.*, 2008), no son capaces de malplegar la PrP^C murina. Igualmente, ciertos aislados de scrapie ovino son capaces de infectar ratones que expresan la PrP^C bovina (Scott, M. R. *et al.*, 1999), incluso con tiempos de incubación más cortos que con la cepa BSE (Scott, M. R. *et al.*, 2005), mientras que otros sufren una barrera de transmisión cuando se enfrentan a la PrP^C bovina. En esta línea, el scrapie ha podido ser también transmitido a vacas, que manifestaron un fenotípico claramente diferente del de la BSE (Bolea *et al.*, 2017).

Así, quedó patente que no sólo la secuencia de la PrP^C influencia la transmisión inter-específica, sino también la cepa priónica que se quiere transmitir, un concepto conocido como “barrera de cepa” (Scott, M. R. *et al.*, 2005). En adelante, se comenzó a hablar de “barrera de transmisión” para referirse de forma genérica al conjunto de estos dos fenómenos (Collinge, 1999; Supattapone *et al.*, 1999), asumiéndose que era una interacción entre la secuencia y la conformación de la PrP lo que determinaba su estructura tridimensional, afectando a la eficiencia de la interacción PrP^C-PrP^{Sc} y a la propagación de los priones.

Algunos autores, sin embargo, coinciden en señalar que la importancia de la secuencia es mínima y que la cepa priónica es la verdadera determinante de la fuerza de la barrera de transmisión (Jones & Surewicz, 2005; Torres *et al.*, 2014). Para estos autores, la secuencia aminoacídica de la PrP^C únicamente determina el espectro de posibles conformaciones patológicas que puede adoptar, y por tanto la similitud entre las secuencias de donante y receptor únicamente modula la barrera entre esas dos especies al definir al grado de solapamiento de conformaciones permitidas por ambas (Jones & Surewicz, 2005).

4.2.4 Otros factores que afectan a la barrera de transmisión: la glicosilación de la PrP^C

Como ya se ha mencionado, la proteína prión celular posee dos residuos de asparagina susceptibles de glicosilarse durante el procesamiento post-traducciona del péptido, lo que da lugar a tres glicofomas diferentes de la proteína: diglicosilada, monoglicosilada y no glicosilada.

Los primeros estudios realizados sobre el papel de los glicanos en la barrera de transmisión sugerían que el grado de glicosilación de la PrP^C estaba relacionado con la facilidad de conversión en la isoforma patógena, ya que se observaron diferencias en la estructura de los glicanos entre la PrP^C y la PrP^{Sc} (Rudd *et al.*, 1999), y que células que expresaban una PrP^C mutada no glicosilada se infectaban más fácilmente que células con PrP^C normal con varias cepas de scrapie murino (Korth *et al.*, 2000).

Más adelante, los primeros estudios *in vivo* sobre el tema (DeArmond *et al.*, 1997) demostraron que la expresión en ratones de una PrP^C mutada no glicosilada causaba importantes alteraciones en el tráfico intracelular y la localización de la proteína a nivel de la membrana celular y, por tanto, en la susceptibilidad de los animales a la infección con varias cepas de scrapie murino. Además, los animales que desarrollaban la patología lo hacían con profundas alteraciones en los patrones de depósito de PrP^{Sc} y la acumulación de infectividad no era suficiente para sostener el ciclo de infección.

Por su parte, Neuendorf y colaboradores desarrollaron otros modelos murinos que expresaban una PrP^C carentes de sitios de glicosilación pero capaz de migrar a la membrana celular, y los inocularon con varias cepas de scrapie y BSE adaptadas al

ratón. Las dos líneas transgénicas portadoras de PrP^C monoglicosilada manifestaron síntomas de enfermedad priónica, mientras que los mutados en ambos sitios de glicosilación no desarrollaron la enfermedad. Se observó además que los ratones que tenían bloqueado el primer sitio de glicosilación mostraban signos clínicos más evidentes que aquellos que tenían bloqueado el segundo sitio, y morían más deprisa una vez la enfermedad se había iniciado. Estos resultados empezaban a sugerir que la glicosilación de la PrP^C no era esencial para la infección priónica *in vivo*, pero sí jugaba un papel en la susceptibilidad de los hospedadores (Neuendorf *et al.*, 2004).

Por otro lado, se demostró que cuando la PrP^C y la PrP^{Sc} provenían de diferentes especies, el grado de glicosilación de la PrP^C podía afectar significativamente a la formación de la forma patógena *in vitro*, lo que podría estar relacionado con el fenómeno de la barrera de transmisión *in vivo* (Priola & Lawson, 2001).

Los primeros estudios *in vivo* que abordaron este tema fueron realizados por Wiseman, Manson y colaboradores. Estos investigadores desarrollaron varios modelos murinos transgénicos con mutaciones en los residuos de asparagina. Al igual que investigadores anteriores, observaron que estas mutaciones alteraban el tráfico intracelular de la proteína y disminuían su exportación a la membrana plasmática (Cancellotti *et al.*, 2005). Por otra parte, al inocular estos animales con varias cepas priónicas de origen no murino (vCJD, sCJD y 263K), observaron que el bloqueo del primer o de ambos sitios de glicosilación conducía a una resistencia a la infección, mientras que la supresión del segundo sitio facilitaba la transmisión del sCJD al ratón, un huésped que normalmente es resistente a este agente (Bruce, M. E. *et al.*, 1997). Esto sugería que la glicosilación en esta segunda posición determinaba la barrera de transmisión entre el humano y el ratón para la sCJD. De forma general, se concluyó que el grado de glicosilación de la PrP^C es uno de los factores que determina la eficiencia de transmisión de las enfermedades priónicas entre diferentes especies (Wiseman *et al.*, 2015).

4.3 La interacción entre la cepa y la barrera de transmisión

Actualmente, el concepto de “barrera de transmisión” engloba varios tipos de fenómenos que imponen trabas a la propagación de una determinada cepa en un nuevo hospedador, incluyendo la falta de homología entre las secuencias de las moléculas de PrP (“barrera genotípica” o “barrera de secuencia”), la incompatibilidad entre la conformación de la PrP^{Sc} entrante y las conformaciones permitidas de la PrP^C del hospedador (“barrera de estructura”), y otras barreras menos estudiadas, como la debida a la ausencia de ciertos cofactores en los tejidos del nuevo hospedador que dificulta la propagación de la isoforma presente en el inóculo (“barrera de cofactor”) (Baskakov, 2014).

En el contexto del cruce de una barrera de transmisión, una determinada cepa priónica puede sufrir cambios o modificaciones merced a distintos mecanismos que se van a exponer brevemente a continuación.

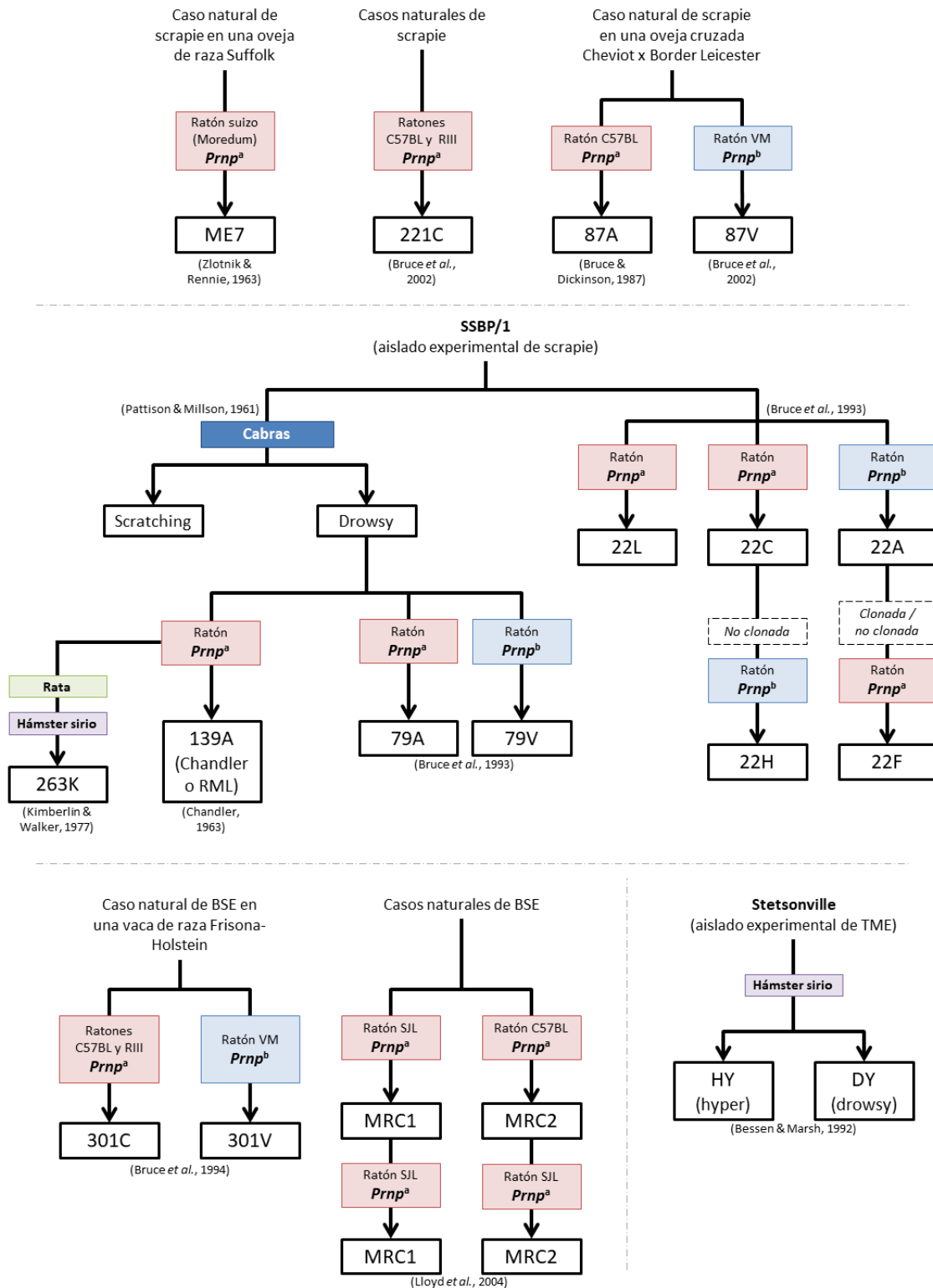


Figura 5. Esquema que representa el aislamiento de las cepas priónicas más empleadas, así como los fenómenos de divergencia que se han observado.

4.3.1 Adaptabilidad de los aislados priónicos: fenómenos de selección y mutación en el scrapie

En los años 90, conjuntamente con la gran diversidad de cepas de scrapie identificadas mediante bioensayos en roedores, se describieron distintos fenómenos de “mutación” de las mismas (Bruce, M. E., 1993). En estos estudios, el término “mutación” hace referencia al cambio de las propiedades de cepa, y evidentemente carece de las connotaciones que tiene para otro tipo de enfermedades infecciosas, en las que el agente causal posee un ácido nucleico que puede sufrir mutaciones génicas. Esta capacidad de cambio de los priones propició las críticas a la hipótesis “sólo proteína”, pues en el paradigma de la época, un agente causal formado exclusivamente por una proteína no podía explicar tal variabilidad.

En los experimentos preliminares con scrapie murino, la “mutación” de cepa ocurría frecuentemente en transmisiones con presencia de barrera genotípica. Así, se observaban varias posibles evoluciones de las propiedades de cepa en función del genotipo del gen *Sinc* que poseyeran los ratones y de la cepa priónica infectante: algunas cepas retenían sus propiedades al propagarse en ambos fondos genéticos (p.ej. las cepas ME7 y 139A, también llamada Chandler o RML), mientras que otras se modificaban (“mutaban”) cuando se pasaban a un genotipo distinto a aquel en el que se habían aislado. Estas modificaciones casi siempre eran compatibles con la selección de componentes minoritarios más favorecidos en el nuevo ambiente (p.ej. cuando la cepa 22C, procedente del genotipo $s7/s7$, se transmitía al genotipo $p7/p7$, se seleccionaba un componente minoritario que acababa dando lugar a la cepa 22H) (Bruce, M. E., 1993).

Otro ejemplo de selección de componentes específicos es el caso de las cepas 79A y 79V a partir del aislado SSBP/1. La cepa 79A, aislada en ratones con el genotipo $Sinc^{s7/s7}$, es más rápida en este genotipo que en $Sinc^{p7/p7}$, y viceversa. Está claro que, en este caso, cada genotipo selecciona el componente de la mezcla SSBP/1 cuya replicación resulta más favorecida (Bruce, M. E., 1993). Este mismo fenómeno se ha observado con otros aislados de scrapie natural, como es el caso de las cepas 87A y 87V (Bruce, M. E. *et al.*, 2002).

Sin embargo, en algunos casos también se evidenciaron fenómenos de mutación “real”, es decir, la aparición *de novo* de una nueva cepa con propiedades distintas (p.ej. la cepa 22A, aislada en el genotipo $p7/p7$, al pasarse al genotipo $s7/s7$ muta y cambia gradualmente a la cepa 22F; esta evolución se observa igualmente cuando la cepa es “clonada” previamente al bioensayo) (Bruce, M. E., 1993).

De una manera similar, la transmisión de ciertas cepas de scrapie murino a otras especies no alteraba su fenotipo (p.ej. las cepas 22A y ME7 al transmitir las a hámsteres), mientras que otras sufrían modificaciones de carácter permanente que se

mantenían incluso tras la transmisión a su hospedador inicial (p.ej las cepas 22c y 139A al transmitir las a hámsteres) (Bruce, M. E., 1993).

La metodología empleada en el bioensayo también puede provocar modificaciones de cepa. Uno de los factores a tener en cuenta es la dosis infectiva. Por ejemplo, cuando se transmitió la cepa 87A a ratones *wild type* a altas dosis, se propagó una cepa distinta, llamada 7D, cuyas propiedades fenotípicas eran indistinguibles de las de otra cepa comúnmente usada, ME7 (Bruce, M. E. & Dickinson, 1987; Bruce, M. E., 1993).

Se ha descrito incluso que el nivel de sobreexpresión de la PrP^C del modelo transgénico empleado es capaz de modular los fenómenos de selección/mutación de los priones. En un estudio reciente, ratones que expresaban la PrP^C ovina a niveles muy encima de lo fisiológico eran capaces tanto de propagar selectivamente componentes minoritarios del aislado priónico, dando lugar a “mutaciones” aparentes de la cepa, como de generar *de novo* componentes no preexistentes en el inóculo original que posteriormente recibían también ventaja selectiva y se propagaban preferentemente en el nuevo hospedador (Le Dur *et al.*, 2017).

4.3.2 Fenómeno de cepas, selección y mutación en otras EET

4.3.2.1 La TME

Los priones responsables de otras EET también sufren fenómenos de selección, mutación y estabilización de fenotipos.

Es el caso de la encefalopatía transmisible del visón (TME), cuyas dos cepas fueron descritas por Bessen y Marsh a partir de pasajes seriados en hámsteres (Bessen & Marsh, 1992b). Estos investigadores estudiaron los fenómenos de divergencia de fenotipos de estas cepas y vieron que eran compatibles siempre con la selección de componentes minoritarios preexistentes. Describieron asimismo fenómenos de selección de distintos componentes en función de la dilución del inóculo con la que se realizase la inoculación, y fenómenos de interferencia o competición de componentes (Bartz *et al.*, 2000). Este fenómeno de interferencia también se había visto con las cepas de scrapie murino 22A y 22C (Dickinson *et al.*, 1972).

4.3.2.2 La BSE clásica

La BSE se consideró desde los inicios de la epidemia como una cepa única con un fenotipo único y característico y con una gran promiscuidad, esto es, capacidad de infectar a muchas especies manteniendo su fenotipo (Bruce, M. *et al.*, 1994; Bruce, M. E. *et al.*, 1997). No obstante, a día de hoy numerosos estudios han acabado poco a poco con esta visión. En primer lugar, durante la crisis de la BSE, Bruce y colaboradores describieron la transmisión de esta cepa a ratones *wild type* y aislaron dos cepas, que denominaron 301C y 301V, en ratones con cada uno de los genotipos de *Sinc* (Bruce,

M. *et al.*, 1994). Años más tarde, sin embargo, Bencsik y colaboradores evidenciaron que 301C y 301V no eran cepas distintas, si no distintos reflejos de la misma cepa BSE en los distintos genotipos de ratón, ya que las propiedades de 301C, al igual que las de la BSE de distintos orígenes, converge hacia las de 301V en pases seriados en ratones (Bencsik *et al.*, 2013). Según algunos autores, esta divergencia aparente puede verse como una adaptación fenotípica sin cambio permanente, un concepto análogo al de la normal de reacción o plasticidad fenotípica (Makarava & Baskakov, 2013).

Más adelante, Lloyd y colaboradores aislaron dos cepas diferentes, MRC1 y MRC2, empleando dos líneas murinas, SJL y C57BL/6, ambas con el mismo genotipo de gen *Prnp* (*s7/s7*, o *Prnp^{a/a}*). Estas dos cepas mantenían sus propiedades al hacer un tercer pase igualador en una de las líneas murinas (SJL). En este tercer pase, ambas cepas se diferencian claramente en el periodo de incubación, el patrón de glicosilación y las características neuropatológicas. Estos autores creyeron firmemente haber aislado dos cepas distintas y propusieron que eran diferencias genéticas en *loci* distintos de *Prnp* las responsables de esta divergencia, lo que suponía un nuevo mecanismo de selección de componentes hasta entonces no considerado. Sin embargo estos autores no pudieron concretar si ocurre una selección por cada línea o la aparición de una nueva cepa en una de las líneas por mutación (Lloyd *et al.*, 2004).

Estos resultados tienen reminiscencias de otros estudios con aislados de BSE y vCJD en los que se vieron también fenómenos de divergencia fenotípica. Por ejemplo, Asante y colaboradores describieron como ratones transgénicos humanos inoculados con BSE desarrollaron fenotipos tanto de vCJD como de sCJD tipo 2, mientras que los inoculados con vCJD sólo mostraron genotipos de vCJD (Asante *et al.*, 2002). Esta divergencia también fue observada con algunos aislados de vCJD (Beringue, Le Dur *et al.*, 2008). Tras la inoculación de vCJD, algunos ratones desarrollaron enfermedad clínica con tiempos compatibles con vCJD mientras que otros presentaron periodos de incubación más cortos que se redujeron todavía más en pases subsiguientes. Los ratones muertos con periodos de incubación largos presentaban alteraciones neuropatológicas y patrones bioquímicos propios del vCJD, mientras que los ratones con periodos de incubación cortos mostraron características compatibles con sCJD. Estos autores también observaron que los animales que replicaron sCJD en su sistema nervioso, acumularon sin embargo priones de vCJD en su sistema linfóide, incluso en un segundo pase a partir de cerebro de ratones con PrP^{res} de tipo sCJD. Esto sugería que la cepa de vCJD se propagó en el cerebro de estos animales como un componente minoritario que luego fue amplificado preferentemente por el sistema linfóide de los ratones de pases subsiguientes. Dado que este fenómeno de divergencia no ocurrió con todos los aislados de vCJD, estos resultados indican que la divergencia de fenotipos en los casos de vCJD y, posiblemente, de BSE se deben a fenómenos de selección de subcomponentes más aptos para la amplificación en distintas condiciones

o tejidos. Por lo tanto, se requiere cautela a la hora de elegir aislados de BSE/vCJD para bioensayo ya que pueden no ser cepas puras si no mezclas de componentes BSE/sCJD.

Estos resultados, a su vez, se correlacionan con otro artículo que prueba la presencia de una mezcla de las formas de PrP^{Sc} asociadas al sCJD (tipo 1) y al vCJD (tipo 2) en muestras de pacientes con vCJD (Yull *et al.*, 2006). Los autores se aseguraron de que la PrP^{res} de tipo 1 hallada no era un intermediario en la digestión de la PrP^{Sc} de tipo 2 propia del vCJD.

4.3.2.3 Las BSE atípicas

En otras ocasiones, los fenómenos de selección/mutación han llevado al aislamiento de una sola cepa a partir de aislados con cepas diferentes. Este fenómeno se ha denominado convergencia fenotípica y el caso más llamativo es el de las BSE atípicas identificadas en la especie bovina, que mediante pases en ciertos modelos murinos dan patrones indistinguibles de los de la BSE clásica.

Tal es el caso de la BSE de tipo L (también llamada BASE) cuando se transmite a ratones *wild type* (Capobianco *et al.*, 2007) y transgénicos ovinos VRQ (Beringue *et al.*, 2007), en los que adquiere un fenotipo indistinguible de la BSE. Por su parte, la BSE de tipo H converge hacia el fenotipo de la BSE clásica al transmitirse a ratones *wild type* en un porcentaje reducido de casos (Baron *et al.*, 2011). Estas observaciones alertaban sobre la posibilidad de que la BSE pudiera haber derivado de un prión bovino de origen espontáneo, “mutado” mediante un pase por otra especie distinta que le hubiera aportado una gran capacidad de adaptación.

Al igual que se especuló con la BSE-L transmitida a ratones *wild type*, se sugirió que una pequeña cantidad de un componente BSE presente en los inóculos fue “seleccionado” y preferentemente amplificados por la PrP^C del ratón. Sin embargo, Torres y colaboradores observaron el mismo fenómeno de convergencia de la cepa BSE-H a BSE clásica en el contexto de una transmisión homotípica, es decir, en un modelo que expresaba PrP^C bovina (la línea BoTg110) (Torres *et al.*, 2011). En este estudio, de nuevo una fracción de los animales inoculados desarrolló enfermedad con acúmulo de una PrP^{res} con características bioquímicas propias de la BSE clásica. Este resultado incide en el hecho de la convergencia hacia la BSE se produjo en ausencia de barrera de secuencia (de bovino a BoTg110), por lo que el concepto de la “selección” de componentes no se puede aplicar aquí, y se proponen otros posibles factores responsables de estas observaciones. Entre otras cosas, alerta sobre la posibilidad de que la BSE se originase en la especie bovina como una cepa atípica y que fueran factores físico-químicos en el tratamiento de las canales empleadas para la producción de harinas de carne y hueso los responsables de su “mutación” a una cepa con un mayor potencial patógeno. Esta visión es compartida por otros autores (Prusiner, 1991; Scott, M. R. *et al.*, 1999).

4.3.3 Fenómenos replicativos alternativos: NAPA

Como se ha visto, la evolución habitual de los priones cuando se transmiten con la presencia de barrera de transmisión es la de una “adaptación” al nuevo ambiente de replicación, generalmente a través de la selección de isoformas más aptas. Sin embargo, algunos autores han descrito un fenómeno replicativo alternativo denominado “amplificación no adaptativa de priones” (NAPA) (Bian *et al.*, 2017). Originalmente se vio en ratones transgénicos para la PrP^C equina (TgEq) inoculados con el aislado de scrapie experimental SSBP/1. En estos experimentos, un número reducido de animales desarrollaron enfermedad priónica, lo que demostró que la PrP^C equina era capaz de malplegarse, en contra de lo establecido en trabajos previos sobre la resistencia de esta PrP^C a la conversión y de los caballos a la infección por priones (Perez *et al.*, 2010). Sin embargo, la sorpresa se produjo cuando se observó que en un segundo pase estos priones no eran transmisibles a animales de la misma línea transgénica (TgEq), pero sí, y con alta eficiencia, a ratones transgénicos ovinos (la especie de origen del aislado empleado). Es decir, estos priones eran capaces de propagarse pero no se adaptaban a la nueva PrP^C, si no que retenían su rango de infectividad/transmisibilidad. Las propiedades bioquímicas y de cepa se mantuvieron igualmente intactas tras el NAPA.

Adicionalmente, estos autores comprobaron que la PMCA es capaz de replicar el fenómeno NAPA *in vitro*. Mediante PMCA seriada (Castilla *et al.*, 2005), consiguieron propagar SSBP/1, BSE y RML en un sustrato de PrP^C equina. Estos priones originados *in vitro* tampoco lograron infectar efectivamente a ratones TgEq, que se mantuvieron asintomáticos durante más de 500 dpi, aunque acumularon pequeñas cantidades de PrP^{res}. Los priones de RML amplificados por PMCA en sustrato equino, sin embargo, retenían su patogenicidad para la especie de origen, es decir, ratones *wild type*.

Los mismos autores del estudio anterior exploraron el fenómeno NAPA en otros modelos, concretamente en un modelo de TME en ciervo, mediante el uso de un ratón transgénico que expresaba la PrP^C del ciervo (TgDeer). En este caso, la inoculación de priones de TME en TgDeer provocó enfermedad clínica con tiempos de incubación largos. En un segundo pase, aunque se evidenció el depósito de PrP^{res} en el encéfalo de los ratones, no se observaron signos clínicos. Sin embargo; estos priones mantenían su patogenicidad en visones. Estos resultados sugieren que NAPA puede ocurrir en casos de enfermedad subclínica con acumulación asintomática de priones, la cual se observa en ciertos casos de transmisiones a hospedadores no permisivos (Hill *et al.*, 2000).

4.4 El modelo de selección conformacional

El conjunto de evidencias sobre la naturaleza de las cepas y su correlación con los fenómenos de barrera de transmisión llevaron a formular el modelo que está

actualmente en vigor: el modelo de selección conformacional (claramente presentado en (Collinge & Clarke, 2007)).

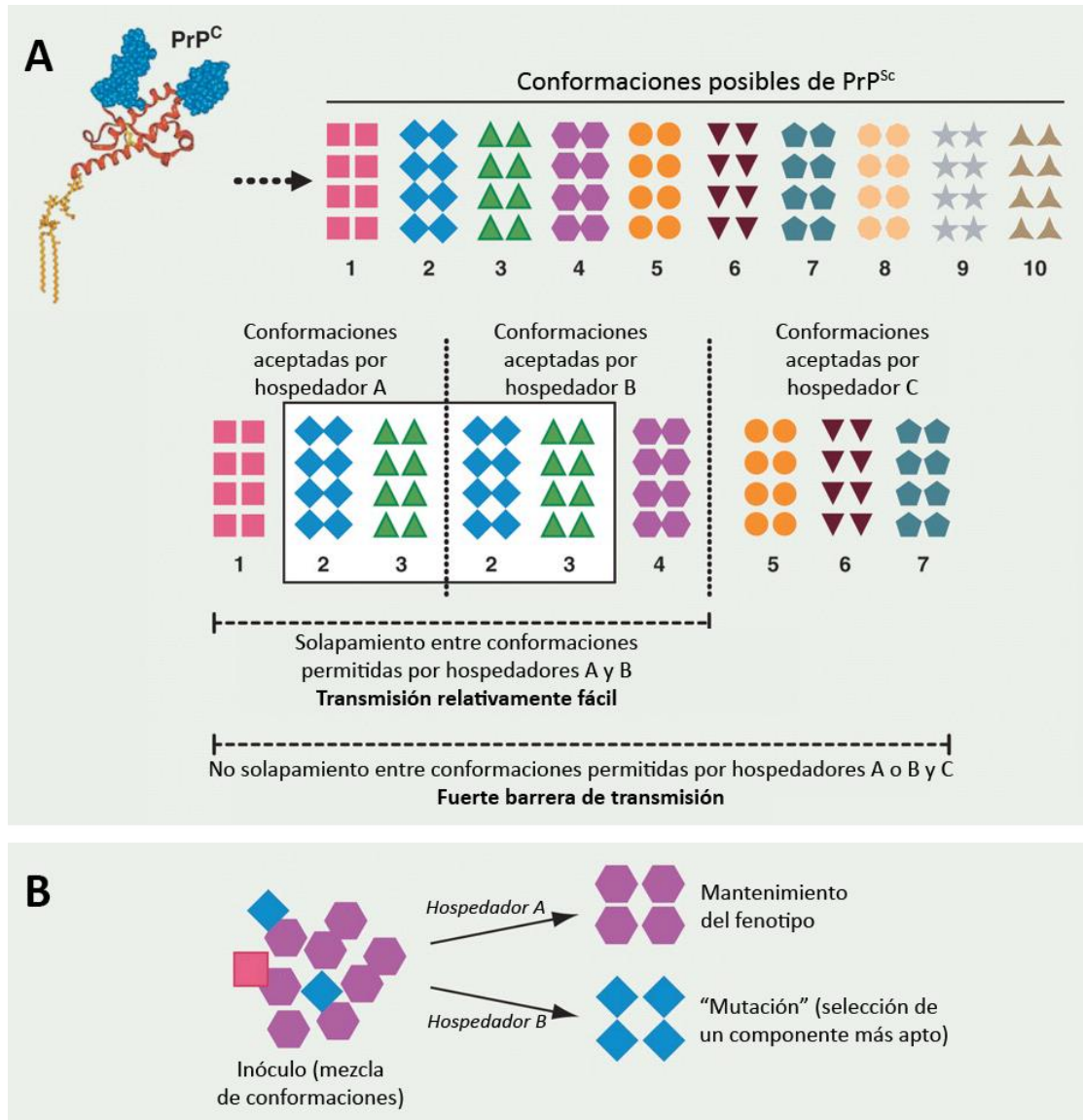


Figura 6. Modelo de selección conformacional que interpreta las barreras de transmisión (A) y la divergencia de cepas (B) como manifestaciones del mismo fenómeno. Adaptado de (Collinge & Clarke, 2007).

Este modelo asume que la hipótesis "sólo proteína" y el modelo de propagación mediante nucleación-polimerización son correctos, de forma que los priones son agregados de proteína malplegada (PrP^{Sc}) que se propagan de forma autocatalítica, primero creciendo mediante incorporación de nuevos monómeros y subsecuentemente fragmentándose para formar nuevos núcleos de polimerización. El fenómeno de cepa se acomoda dentro de este modelo proponiendo que el malplegamiento de la PrP^{Sc} no es único, sino que, para cada secuencia primaria, existen varias posibles conformaciones. Las cepas son mezclas generalmente heterogéneas de diferentes confórmeros, "subcepas" o "cuasi-especies", entre las

cuales hay generalmente una que predomina y determina el fenotipo de la enfermedad, aunque algunas cepas particularmente estables pueden estar próximas a la clonalidad.

Por otra parte, el grado de solapamiento entre las conformaciones contenidas en el inóculo y las conformaciones permitidas o preferidas por el hospedador es lo que determina la eficiencia de transmisión. Un solapamiento completo o muy amplio facilitaría la transmisión, mientras que un número más reducido de conformaciones compartidas dificultaría la transmisión en mayor o menor medida, produciéndose normalmente una “mutación” aparente debido a la selección de un componente minoritario más apto para replicarse en el nuevo ambiente. Por último, la ausencia total de conformaciones en común conllevaría una barrera de transmisión muy fuerte, de forma que la transmisión no sería posible o precisaría de un cambio de la cepa transmitida mediante una “mutación” real, esto es, la generación *de novo* de un confórmero capaz de propagarse.

El modelo de selección conformacional interpreta el fenómeno de cepa y la barrera de transmisión como dos caras de la misma moneda, es decir, como dos manifestaciones de una misma realidad: la naturaleza conformacional de los procesos de selección y amplificación de los priones. En este modelo, las cepas con mayor capacidad patogénica y de cruce de barreras de transmisión, como por ejemplo la BSE, representarían conformaciones “termodinámicamente favorables” capaces de inducir el malplegamiento de una variedad muy amplia de tipos de PrP^C (Collinge & Clarke, 2007).

4.5 La hipótesis del “modelado deformado”

Como se ha dicho, el modelo de selección conformacional tiene entre sus fundamentos la aseveración de que las cepas son, generalmente, mezclas de confórmeros de los cuales hay uno dominante que dicta el fenotipo de la enfermedad (Collinge & Clarke, 2007; Collinge, 2010). Este concepto, que ha sido llamado “hipótesis de la nube” por otros autores (Makarava & Baskakov, 2013), no ofrece una explicación satisfactoria sobre el origen de esta variabilidad estructural de los priones, asumiendo que las distintas isoformas que componen la “nube” se están formando continuamente de forma espontánea. La “hipótesis de la nube” es complementaria a la noción de que, en transmisiones en las que existe una barrera que impide la propagación del confórmero dominante, se selecciona una nueva variante que es más apta para propagarse en el nuevo ambiente.

En contraposición, Baskakov y colaboradores defienden la hipótesis del “modelado deformado” (Baskakov, 2014; Makarava & Baskakov, 2013), que si bien no es incompatible que la “hipótesis de la nube”, ofrece una explicación para el origen de la heterogeneidad de los aislados priónicos. Según este modelo, cuando el confórmero o

los confórmeros de la cepa infectante no son compatibles con la secuencia aminoacídica de la PrP^C del hospedador o con el nuevo ambiente de replicación, emergen nuevas variantes *de novo* como consecuencia de una distorsión de la fibra de amiloide debida a la incorporación de moléculas no compatibles. Aunque es posible que la mayoría de los nuevos confórmeros tampoco sean aptos para propagarse, eventos sucesivos de prueba y error acaban produciendo la emergencia de al menos una variante con capacidad replicativa.

Ambas hipótesis no son mutuamente excluyentes y permiten, entre ambas, explicar prácticamente la totalidad de los fenómenos de divergencia de cepas observados en casos de EET naturales, e incluso la evolución de cepas de priones sintéticas (Baskakov, 2014).

5. PATOGENIA DE LAS EET

Según el origen y la patogenia, las EET pueden clasificarse en tres tipos: adquiridas (o infecciosas, aunque en algún caso la infección es de naturaleza iatrogénica), genéticas o familiares, y espontáneas.

Las primeras comienzan con la entrada en el organismo de un prión de origen exógeno que estimula la conversión de la PrP^C endógena en una isoforma patógena. Las segundas se deben a mutaciones en el gen que codifica la proteína prión celular, lo que la hace más propensa a adquirir plegamientos aberrantes que conducen a la enfermedad. Las terceras tienen un origen idiopático, habiéndose propuesto diversas hipótesis para explicar el mecanismo que causa el malplegamiento espontáneo de la proteína.

5.1 Patogenia y transmisión de las EET de tipo adquirido

La mayor parte de las enfermedades priónicas de tipo adquirido que han sido descritas afectan a diversas especies animales, tanto domésticas como de vida libre. Es el caso del scrapie, que constituye el prototipo de EET infecciosa, pero también el de la encefalopatía espongiforme transmisible (BSE), la enfermedad caquetizante crónica (CWD), la encefalopatía transmisible del visón (TME) y la enfermedad priónica de los dromedarios (CPD). Por otra parte, en la especie humana existen dos tipos de EET adquiridas: el kuru, que se adquiere por vía oral y por lo tanto posee una patogenia similar a las EET infecciosas del resto de especies animales, y la forma iatrogénica de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (iCJD).

5.1.1 El scrapie como prototipo de las EET de tipo adquirido

5.1.1.1 Vías de transmisión y contagio

En el caso del scrapie clásico, la infección natural se produce casi siempre por la vía oral, a través de la ingestión de materiales contaminados con priones procedentes de otros individuos previamente infectados. En ocasiones, como ocurrió durante la epidemia de BSE en el ganado vacuno, la infección ocurre por consumo de piensos contaminados (Wells & Wilesmith, 1995). En otras se debe a una contaminación del entorno con el agente causal; se piensa que las principales fuentes de contaminación son las placentas, las heces (Safar *et al.*, 2008; Terry *et al.*, 2011) y los cadáveres de animales infectados muertos en la explotación. La contaminación a partir de las placentas es la más significativa, ya que este órgano, que se expulsa tras el parto, contiene unos niveles de infectividad muy elevados (Andreoletti *et al.*, 2002; Race *et al.*, 1998; Tuo *et al.*, 2002), aunque son altamente dependientes del genotipo del gen *Prnp* tanto de la madre como del feto. Se ha demostrado que tanto ovejas que portan el haplotipo ARR incluso en presencia del haplotipo VRQ en el otro alelo (Lacroux *et al.*, 2007), como ovejas que gestan fetos con fenotipos resistentes (Andreoletti *et al.*, 2002; Tuo *et al.*, 2002) son incapaces de acumular PrP^{Sc} en la placenta.

Otras vías de excreción, como la orina (Rubenstein *et al.*, 2011), o de secreción, como la saliva (Gough *et al.*, 2012; Maddison *et al.*, 2010) o la leche, se consideran menos importantes, aunque contribuyen indirectamente a la contaminación del ambiente.

En consecuencia, el contagio por vía oral se produce mayoritariamente de forma horizontal entre los individuos del rebaño (Hoinville, 1996). Se reconoce igualmente la posibilidad de que puedan ocurrir casos de transmisión vertical, es decir, de la madre a las crías, aunque la importancia de esta vía es difícil de evaluar debido a la posibilidad de contagio lateral entre animales de cualquier edad. A pesar de que la transmisión vertical “pura” (*in utero*) ha sido demostrada por algunos autores (Foster *et al.*, 2013; Garza *et al.*, 2011), se piensa que la infección de los corderos se produce mayoritariamente a partir de la placenta en el momento del parto o en los momentos inmediatamente posteriores. En cualquier caso, como se ha dicho más arriba la presencia de PrP^{Sc} en la placenta y, por tanto, el riesgo de transmisión peripartal del scrapie dependen en gran parte de los genotipos de la madre y del feto.

La presencia de infectividad en la leche y el calostro ha sido también demostrada (Konold *et al.*, 2013; Lacroux *et al.*, 2008; Maddison *et al.*, 2010). La secreción de priones en la leche aumenta en presencia de mamitis, como por ejemplo en casos de infección simultáneas con scrapie y el virus del Maedi-Visna, que provoca una mamitis de tipo crónico. Esto se debe a la presencia en el tejido mamario inflamado de folículos linfoides capaces de acumular PrP^{Sc} e infectividad, que luego son secretadas en la leche (Ligios *et al.*, 2005a; Ligios *et al.*, 2011; Salazar *et al.*, 2010).

Además de la vía oral, existen otras vías naturales de entrada del prión en el organismo, como por ejemplo a través de pequeñas heridas en la piel, que pueden resultar relevantes cuando existe un contacto estrecho entre los individuos del rebaño

o cuando la contaminación del entorno es elevada (van Keulen *et al.*, 2002). Esta vía de entrada ha sido demostrada también experimentalmente (Mohan *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 1996).

Finalmente, diversos autores han descrito la efectividad a nivel experimental de otras vías de infección como la intracerebral, la intraperitoneal, la intravenosa, la intraocular, la conjuntival y la percutánea (Detwiler & Baylis, 2003).

5.1.1.2 Infección y puertas de entrada del agente

En la infección natural por vía oral, la PrP^{Sc} atraviesa el tracto digestivo sin ser digerida hasta llegar a nivel del yeyuno y el íleon, donde es capaz de cruzar la barrera intestinal a través de las placas de Peyer (Andreoletti *et al.*, 2000; Heggebo *et al.*, 2000). Las placas de Peyer son unas estructuras que contienen tejido linfoide asociado al intestino ("gut-associated lymphoid tissue" o GALT) y por lo tanto forman parte del sistema linforreticular, cumpliendo un papel en la defensa del organismo frente a agentes patógenos externos a través del establecimiento de una respuesta inmunológica adaptativa. La observación de que los priones se acumulan en las placas de Peyer y el GALT (y posteriormente en los ganglios nerviosos del SNE, como se menciona más adelante) se ha replicado en modelos experimentalmente infectados por las vías oral e intragástrica (Aguzzi & Calella, 2009).

En el proceso de captación de la PrP^{Sc} a nivel de estas estructuras participan un tipo especial de enterocitos modificados llamados células M. Las células M se ubican intercaladas en el epitelio de la mucosa intestinal y han sido reconocidas como una de las principales puertas de entrada al organismo, mediante transporte transepitelial, para diversos agentes patógenos del intestino (Neutra *et al.*, 1996). Estas células son capaces de captar proteínas, entre ellas la PrP^{Sc}, y transportarlas sin degradar al interior de la placa de Peyer, donde las presentan como antígenos a las células del sistema linforreticular: macrófagos de cuerpo tingible y células dendríticas foliculares (CDF) (Heggebo *et al.*, 2000; Jeffrey *et al.*, 2001; Mabbott & Bruce, 2001; Mabbott & MacPherson, 2006; van Keulen *et al.*, 1999). La primera replicación del prión se produce, pues, en el sistema linforreticular (SLR), y desde allí comienza la propagación del agente hacia el sistema nervioso a través de distintas vías. Algunos autores sugieren que los niveles de infectividad en el SLR aumentan hasta alcanzar una meseta antes de propagarse a otros órganos (Madec, Groschup *et al.*, 2000). Esta etapa de invasión del sistema linfoide coincide con la fase preclínica de la enfermedad.

Por otra parte, algunos autores han descrito la captación de priones por parte del sistema linforreticular directamente a nivel de la amígdala o tonsila palatina (Andreoletti *et al.*, 2000). La amígdala es un pequeño órgano localizado en la entrada de la orofaringe en el que el tejido linfoide se halla intercalado con el epitelio

escamoso del paladar, y cuya función es la detección rápida de antígenos que penetran en el organismo por la vía oral.

5.1.1.3 Papel del linfotropismo en la patogenia

La implicación del sistema linforreticular en las primeras etapas de la patogenia de las enfermedades priónicas adquiridas es altamente dependiente de varios factores, incluyendo la especie, el genotipo y la cepa infectante. Así, como se ha expuesto anteriormente, los priones responsables del scrapie clásico tiene una elevada capacidad linfotrópica y, en la mayoría de los casos, se replican ampliamente en el SLR tras la captación de los mismos a nivel de las placas de Peyer y las amígdalas, fundamentalmente, y previamente a la fase neuroinvasiva. De hecho, la acumulación temprana de PrP^{Sc} en partes del SLR accesibles mediante procedimientos poco invasivos ha dado pie al desarrollo de herramientas para el diagnóstico de la enfermedad en estadio preclínico, que incluyen la realización de biopsias de mucosa rectal (Dennis *et al.*, 2009; Gonzalez *et al.*, 2005), amígdala (Langeveld *et al.*, 2006; Monleon *et al.*, 2005) o tercer párpado (Vargas *et al.*, 2006).

No obstante, el genotipo a nivel del gen *Prnp* es un factor que influye en la acumulación de los priones por el tejido linfoide. Se ha descrito que la implicación del SLR en la patogenia de la infección por scrapie en animales con genotipos resistentes (fundamentalmente en individuos portadores del alelo ARR) es muy limitada, restringiéndose la replicación del agente al sistema nervioso (Andreoletti *et al.*, 2000; Jeffrey *et al.*, 2002; van Keulen *et al.*, 1996; van Keulen *et al.*, 2002).

Adicionalmente, la implicación del SLR también es dependiente de la cepa infectante, o dicho de otro modo, el linfotropismo (en una especie concreta) es una propiedad de cepa. Por ejemplo, a pesar de que en el scrapie clásico la PrP^{Sc} se acumula en el tejido linfoide, la acumulación de PrP^{Sc} e infectividad en casos de BSE experimentalmente transmitida a ovinos (y también en casos naturales en bóvidos) se limita al sistema nervioso, con una invasión del tejido linfoide limitada o nula (Somerville, Birkett *et al.*, 1997). Curiosamente, cuando la BSE se transmite a seres humanos (causando vCJD), el agente presenta un linfotropismo mucho más elevado (Bruce, M. E. *et al.*, 2001; Hilton *et al.*, 1998), en comparación con las formas esporádicas de la enfermedad (sCJD) en las que la replicación del prion está confinada al tejido nervioso (Hill *et al.*, 1999).

5.1.1.4 Neuroinvasión

En los casos en los que el prion se propaga de forma eficiente en el sistema linforreticular gastrointestinal, se considera que la puerta de entrada del agente al sistema nervioso es el sistema nervioso entérico (SNE). Esta hipótesis se basa en la observación de acúmulos de PrP^{Sc} en los ganglios y plexos mientérico y submucoso del SNE, que siguen una distribución paralela a la del sistema linforreticular intestinal (Beekes *et al.*, 1998; Beekes & McBride, 2000). Se piensa que la transferencia del prion

desde el SLR al SNE se produce a través de las fibras nerviosas que inervan los folículos linfoides del SLR (Heggebo *et al.*, 2003; Prinz *et al.*, 2003; van Keulen *et al.*, 1999). Posteriormente, la propagación de los priones hasta el sistema nervioso central (SNC) ocurriría fundamentalmente por dos vías (Beekes *et al.*, 1998; Mabbott & MacPherson, 2006; Race *et al.*, 2000; van Keulen *et al.*, 2002). La primera es una vía directa, que asciende desde el SNE directamente hasta el tronco del encéfalo (concretamente la médula oblongada) a través de las fibras nerviosas parasimpáticas eferentes del sistema nervioso periférico (fundamentalmente el nervio vago), lo que conlleva la acumulación de PrP^{Sc} primeramente en el núcleo motor dorsal de este mismo nervio. La segunda es una vía indirecta, a través de los nervios espláncnicos, que llevan la inervación simpática del bazo y otros órganos abdominales, y a través de los cuales el prión alcanza los ganglios nerviosos celiaco y mesentérico craneal y, finalmente, la columna intermedia lateral de la médula espinal torácica.

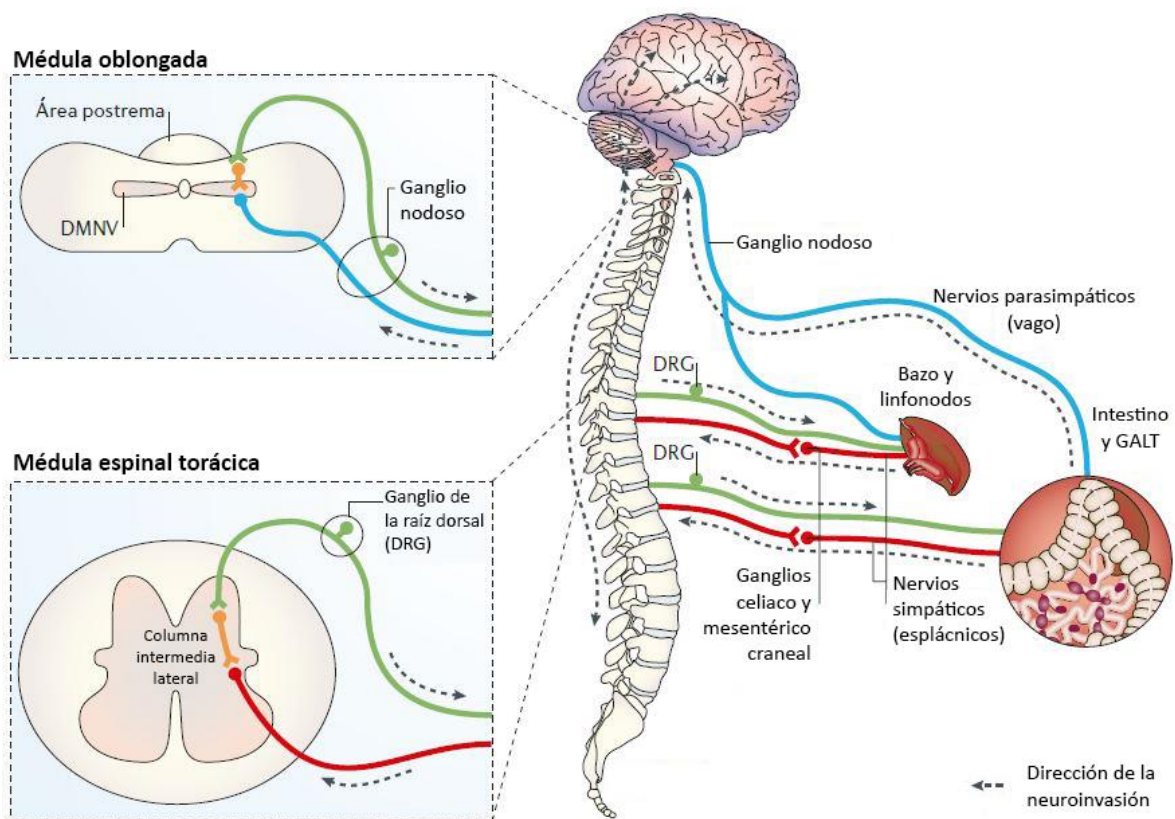


Figura 7. Vías de neuroinvasión. Adaptado de: (Mabbott & MacPherson, 2006)

En ambos casos, la llegada del prion al SNC se produce mediante su migración en dirección retrógrada (en contra de la dirección de los impulsos nerviosos) a través de vías nerviosas eferentes de ambas divisiones (simpática y parasimpática) del sistema nervioso autónomo. Diversos autores han sugerido la implicación de mecanismos de transporte axonal, posiblemente asociado a microtúbulos (Fraser, 1982; Maddox *et al.*, 2008).

Tras su llegada y establecimiento en el SNC, la diseminación del agente por el tejido nervioso (Kimberlin & Walker, 1980) lo lleva a acumularse en mayor o menor medida en determinadas regiones neuroanatómicas, dando patrones que son dependientes de la cepa priónica y de la especie, entre otros factores (Fraser & Dickinson, 1968). No obstante, los priones son también capaces de llevar a cabo una diseminación centrífuga desde el SNC, viajando a través de los nervios del sistema nervioso periférico hasta alcanzar diversos tejidos y órganos anatómicamente distantes. Por ejemplo, en ovejas se han descritos acúmulos de PrP^{Sc} en los siguientes órganos: glándula adrenal (Garza *et al.*, 2014; Jeffrey *et al.*, 2001), músculo esquelético (Andreoletti *et al.*, 2004) y fibras nerviosas intramusculares (Garza *et al.*, 2014), lengua (Casalone *et al.*, 2005; Garza *et al.*, 2014), mama (Lacroux *et al.*, 2008; Ligios *et al.*, 2005b), glándula salivar (Vascellari *et al.*, 2007), riñón (Garza *et al.*, 2014; Ligios *et al.*, 2007; Siso *et al.*, 2008), vejiga (Garza *et al.*, 2014), piel (Garza *et al.*, 2014), pulmón (Garza *et al.*, 2014; Jeffrey & Gonzalez, 2007; Ryder *et al.*, 2009; Salazar *et al.*, 2010), hígado (Everest *et al.*, 2011) y páncreas (Garza *et al.*, 2014).

La localización preferente de las lesiones asociadas al scrapie clásico en la médula oblongada ha llevado a que sea ésta la región neuroanatómica de elección para el diagnóstico histopatológico de la enfermedad en ovinos, caprinos y bovinos, ya que el examen histológico de una sola sección a nivel del óbex es suficiente para diagnosticar el 99,6% de los casos positivos (Wells *et al.*, 1989). Además, el acúmulo temprano de PrP^{Sc} en esta zona, especialmente en el núcleo dorsal motor del nervio vago, que ha sido probado experimentalmente en ratones y hámsteres (McBride & Beekes, 1999), convierte a este tejido en la zona de elección también para el diagnóstico mediante tests rápidos basados en la detección de la proteína patológica PrP^{Sc}.

Por su parte, dado que en ocasiones la neuroinvasión no depende de una etapa linfoinvasiva previa, la propagación del agente ha de implicar a otros mecanismos de diseminación, que también pueden actuar paralelamente a la ruta linforreticular. Algunas de estas vías se han ido desvelando con el tiempo, como la posible implicación de la vía hematológica (Siso *et al.*, 2010). Diversos estudios han demostrado la presencia de PrP^{Sc} en sangre de ovejas infectadas con scrapie y con BSE (Terry *et al.*, 2009; Thorne & Terry, 2008), y también en pacientes humanos con vCJD (Llewelyn *et al.*, 2004; Peden *et al.*, 2004; Wroe *et al.*, 2006), lo que algunos autores denominan “prionemia” (Lacroux *et al.*, 2012). Asimismo, es posible transmitir la infección de individuos afectados por scrapie, tanto en fase clínica como preclínica, a animales sanos mediante transfusiones sanguíneas (Houston *et al.*, 2008; Hunter *et al.*, 2002). Una de las hipótesis barajadas para dar explicación a este hecho es que esta vía de diseminación del agente está asociada con la acumulación de PrP^{Sc} en los órganos circunventriculares del encéfalo, regiones neuroanatómicas anexas al tercer y cuarto ventrículos que carecen de barrera hematoencefálica, por lo que podrían actuar como puertas de entrada al SNC desde la sangre (Siso *et al.*, 2009).

5.2 Patogenia de las EET de tipo genético

Todas las EET de tipo genético que se conocen se han descrito en seres humanos, asociadas a mutaciones del gen *PRNP* que causan la sustitución de un aminoácido por otro en la secuencia de la proteína príon celular. Se piensa que este cambio provoca que la proteína se vuelva más propensa al malplegamiento espontáneo (Elezgarai *et al.*, 2017; Gambetti *et al.*, 2003; Prusiner, 1989). Adicionalmente, estas mutaciones tienen un carácter dominante (desencadenan la enfermedad con un solo alelo mutado) y una penetrancia (porcentaje de individuos portadores de la mutación que acaban desarrollando la enfermedad) generalmente muy elevada, cercana al 100% (Minikel *et al.*, 2016). Por esta razón, se cree que la mayor parte de los individuos portadores sufren, en algún momento de su vida (que depende de la mutación causal), un evento de malplegamiento espontáneo de la PrP^C que desencadena la cascada de conversiones, lo que termina causando la neurodegeneración y la instauración del síndrome clínico.

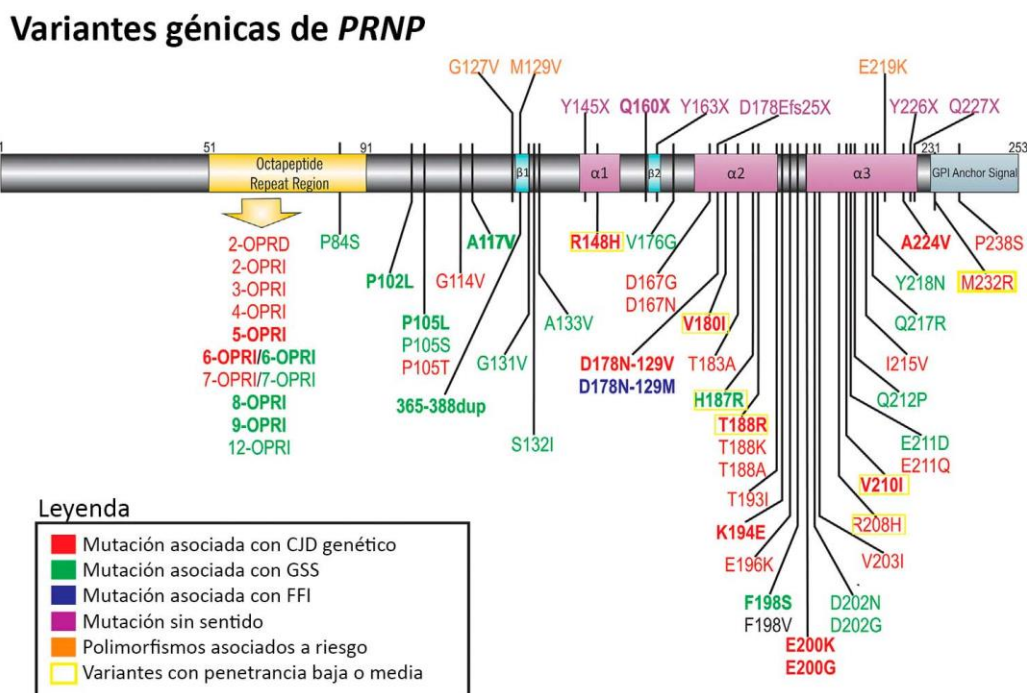


Figura 8. Polimorfismos y mutaciones del gen *PRNP* asociadas a EET en humanos. Adaptado de: (Takada *et al.*, 2017).

Las distintas mutaciones provocan cambios aminoacídicos en diversas regiones de la PrP^C, lo que se traduce en distintas conformaciones de la isoforma patológica. Las características patológicas y el curso clínico de la enfermedad dependen, por lo tanto, de la mutación causal, en combinación con el polimorfismo del codón 129 (Gambetti *et al.*, 2003). Existen un gran número de mutaciones descritas, tanto puntuales como inserciones y deleciones. Sin embargo, el 85% de los casos diagnosticados se asocian

con sólo cinco variantes: E200K, V210I, V180IV P102L y D178N (Minikel *et al.*, 2016; Takada *et al.*, 2017). La clasificación actual, basada en criterios clínico-patológicos, establece únicamente tres variantes fenotípicas: enfermedad de Creutzfeldt-Jakob genética (gCJD), síndrome de Gerstmann-Sträussker-Scheinker (GSS) e Insomnio Familiar Fatal (FFI).

Hay que señalar que el hecho de la PrP^C mutada sea propensa al malplegamiento no implica que pueda transmitir su conformación aberrante a otras moléculas de PrP^C, mutadas o no, en el curso de una infección experimental. La transmisibilidad de cada tipo de EET genética debe ser evaluada, pues, en base a transmisiones experimentales. Así, se ha evidenciado que algunos tipos de EET genéticas son transmisibles a ratones *wild type* (Tateishi *et al.*, 1996) y a modelos transgénicos (Asante *et al.*, 2013; Manson *et al.*, 1999; Telling, Haga *et al.*, 1996) mientras que otras no son capaces de generar enfermedad en los individuos inoculados (Baker *et al.*, 1990; Piccardo *et al.*, 2007).

En esta línea, el topillo rojo (“bank vole”), así como los modelos murinos transgénicos que expresan la PrP^C de esta especie, han demostrado ser una herramienta muy útil al ser capaces de propagar una gran cantidad de cepas priónicas (Di Bari *et al.*, 2008), incluyendo aislados con una baja capacidad de transmisión a otros modelos (Pirisinu *et al.*, 2016) e incluso priones de origen recombinante (Elezgarai *et al.*, 2017). En la mayor parte de los casos, la patología que desarrollan estos animales reproduce las características neuropatológicas y bioquímicas de la cepa original. Por esta razón, esta especie es considerada por algunos autores como el “aceptor universal” de priones (Watts *et al.*, 2014).

5.2.1 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob genética

El CJD familiar o genético fue identificado por primera vez en una familia alemana portadora de la mutación D178N (Kretschmar *et al.*, 1995). Años más tarde se demostró su transmisibilidad, así como la del sCJD (Gibbs *et al.*, 1968), lo que supuso un hito en la comprensión de las EET al asumirse que estas patologías podían ser a un tiempo hereditarias e infecciosas. A pesar de ello, a día de hoy todavía no se comprende completamente la relación exacta que se establece entre la conformación, la transmisibilidad, la infectividad y la neurotoxicidad de estos enigmáticos agentes.

Los casos de origen genético suponen el 10-15% de los casos totales de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, mientras que la mayor parte (~85%) son de tipo espontáneo o idiopático (Collinge *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 2003; Parchi *et al.*, 1999). Se deben a distintas mutaciones puntuales en la secuencia de la PrP^C, de las cuales la más frecuente es la E200K, que supone aproximadamente el 50% de los casos (Gambetti *et al.*, 2003). Al contrario que el síndrome de Gerstmann-Sträussker-Scheinker (GSS), el gCJD se clasifica dentro del fenotipo del CJD debido a sus características clínicas y

neuropatológicas, que se asemejan a las del CJD de tipo espontáneo, del que hablaremos más adelante.

5.2.2 Insomnio familiar fatal

La mutación D178N, la primera en ser descrita en una familia de origen alemán (Kretzschmar *et al.*, 1995), provoca el desarrollo de un cuadro clínico-patológico identificado como CJD cuando el codón 129 de la PrP^C codifica el aminoácido valina. No obstante, cuando esta mutación se combina con metionina en dicho codón 129, produce una evolución clínica diferente, con afectación principalmente talámica y alteraciones del sueño. A este cuadro se le denomina insomnio familiar fatal (FFI), y tiene su contraparte esporádica en el insomnio fatal esporádico (sFI) (Gambetti *et al.*, 2003; Takada *et al.*, 2017).

5.2.3 Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker

Por su parte, el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) en realidad es un conjunto heterogéneo de patologías causadas por distintas mutaciones localizadas a lo largo de la proteína. Como ya se ha mencionado en la sección 1.2, el GSS se diferencia del CJD por sus parámetros clínicos, neuropatológicos y bioquímicos. Se han descrito 16 mutaciones puntuales asociadas al GSS; la hallada más frecuentemente es la P102L (Minikel 2016, Takada 2017).

5.2.4 EET genéticas con mutaciones en la zona de repetición de octapéptido

Por último, existe un grupo de EET genéticas humanas asociadas a inserciones y deleciones en la zona de repetición de octapeptidos (OPR). Aunque la inserción (OPRI) o la deleción (OPRD) de un solo octapéptido no provocan enfermedad (Beck *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2004), un número más alto de inserciones (se han descrito casos de desde 2OPRI hasta 12OPRI, salvo 3OPRI) se asocia comúnmente al desarrollo de una patología priónica (Capellari *et al.*, 1997; King *et al.*, 2003; Owen *et al.*, 1992; Vital *et al.*, 1998). Ésta en ocasiones presenta las características clínicas y neuropatológicas del CJD (curso clínico de corta duración y afectación fundamentalmente cortical), mientras que en otras se asemeja al GSS (curso clínico mucho más largo y gran afectación cerebelar con presencia de extensas placas de amiloide). El desarrollo de un cuadro clínico-patológico u otro parece depender en gran medida del número de repeticiones del octapéptido (Takada *et al.*, 2017).

5.3 Patogenia de las EET de tipo espontáneo

5.3.1 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica e insomnio fatal esporádico

Por último, existen enfermedades priónicas denominadas “espontáneas” cuyo origen es desconocido. La más importante es la forma espontánea de la enfermedad Creutzfeldt-Jakob (sCJD), ya que, aunque se considera una enfermedad rara (afecta

aproximadamente a un individuo de cada millón), supone aproximadamente el 85% de las EET diagnosticadas en seres humanos (Collinge *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 2003; Parchi *et al.*, 1999). Existen distintas variantes del sCJD; la clasificación completa más actualizada se basa en criterios clínico-patológicos, en el genotipo a nivel del codón 129 de la proteína prión celular y en las propiedades bioquímicas de la PrP^{Sc} que se acumula en el tejido nervioso de los pacientes (Hill *et al.*, 2003). El codón 129 ejerce una gran influencia sobre la susceptibilidad al sCJD, al mismo tiempo que determina el fenotipo de la enfermedad. La prevalencia de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (sCJD) en individuos homocigotos metionina (129M/M) es mucho mayor que en individuos 129V/V, lo que sugiere que la homocigosidad M/M en este codón es un factor de riesgo para este tipo de enfermedad priónica (Deslys *et al.*, 1994; Owen *et al.*, 1990; Palmer *et al.*, 1991; Windl *et al.*, 1996). Como se ha mencionado en la sección 4.2.2.1, este codón también determina la susceptibilidad a las EET adquiridas.

Se han propuesto numerosas hipótesis para explicar el origen del malplegamiento espontáneo de la PrP^C que da comienzo al desarrollo de la patología. Algunos autores defienden que es debido a una mutación somática en el gen *Prnp*, lo que la hace propensa a adquirir una conformación aberrante que luego es capaz de transmitir a otras proteínas no mutadas (Cohen & Prusiner, 1998; Prusiner, 1989). Otra explicación posible es un cambio conformacional estocástico que ocurre raramente (Cohen & Prusiner, 1998). En el modelo de replicación de los priones por nucleación sembrada, un evento raro de desestabilización del equilibrio termodinámico hacia la PrP^{Sc} podría llevar a la formación de los primeros núcleos de polimerización (Jarrett & Lansbury, 1993). Por último, algunos autores sugieren que al menos algunos casos de sCJD podrían estar causados por una exposición a bajo nivel a priones de origen externo (Linsell *et al.*, 2004; Safar, 2012).

Además de los subtipos clásicos de sCJD, existe una enfermedad clínicamente indistinguible del Insomnio Familiar Fatal (FFI), pero que no ha sido asociada con ninguna mutación del gen *PRNP*. Por esta razón se la ha denominado Insomnio Fatal Esporádico (sFI) (Gambetti *et al.*, 2003).

5.3.2 Prionopatía de sensibilidad variable a las proteasas

De forma relativamente reciente se ha descrito un nuevo tipo de enfermedad priónica espontánea denominada prionopatía de sensibilidad variable a las proteasas (VPSPr) (Gambetti *et al.*, 2008). A pesar de desconocerse los detalles sobre su origen tanto como se desconocen los del sCJD, las características neuropatológicas y bioquímicas de esta enfermedad ha llevado a algunos autores a considerarla como la forma espontánea del GSS (Notari *et al.*, 2014; Zou *et al.*, 2010). Curiosamente, se ha visto que las susceptibilidades asociadas a cada haplotipo del codón 129 se invertían con respecto a las de las EET humanas clásicas, siendo más frecuentes los pacientes con genotipo 129V/V (Peden *et al.*, 2014; Zou *et al.*, 2010). Además, la severidad de las

lesiones en el encéfalo de estos pacientes también era dependiente del genotipo, siendo más alta en individuos 129V/V y M/V que en individuos 129M/M (Zou *et al.*, 2010).

5.3.3 Scrapie atípico y BSE atípicas

Por último, existen dos formas atípicas de la BSE (BSE-L y BSE-H) (Biacabe *et al.*, 2004; Casalone *et al.*, 2004) y una forma atípica del scrapie (scrapie atípico o Nor98) (Benestad *et al.*, 2003) que se consideran enfermedades de origen espontáneo, pues epidemiológicamente no se han asociado a la exposición a agentes externos. En los tres casos, la patología cursa con lesiones a nivel histopatológico (como la presencia de acúmulos de amiloide en el caso de la BSE-L o la afectación predominante cerebelar en el scrapie atípico) y con la presencia de PrP^{res} con propiedades bioquímicas que permite distinguirlos claramente de las formas clásicas, demostrando que se trata de una cepa priónica diferente.

5.4 Neurodegeneración

5.4.1 La molécula responsable de la neurotoxicidad

Una vez el prión está presente en el sistema nervioso central (ya sea por generación espontánea de PrP^{Sc} por causas genéticas o idiopáticas o por infección y entrada a través de cualquiera de las vías de dispersión), se instaura una degeneración progresiva del tejido nervioso. Este proceso neurodegenerativo implica una combinación compleja de varios mecanismos que ocurren de forma secuencial o simultánea. La conclusión es un conjunto de alteraciones en la morfología y funcionalidad del sistema nervioso, que incluyen acumulación de agregados proteicos, cambio esponjiforme, alteraciones sinápticas, neuroinflamación y muerte neuronal (Budka *et al.*, 1995; Budka, 2003).

Sin embargo, a día de hoy no se conoce con seguridad cuál es la molécula que media la neurotoxicidad en las enfermedades priónicas. Existe multitud de evidencias de una relación causal entre la conversión de la PrP^C en PrP^{Sc} y el proceso neurodegenerativo, lo que conduce a dos posibles explicaciones: o bien la PrP^C adquiere propiedades neurotóxicas al convertirse en PrP^{Sc}, o bien pierde sus funciones protectoras normales (Budka, 2003; Castilla *et al.*, 2004).

A pesar de que se ha atribuido a la PrP^C una serie de funciones neuroprotectoras (Sección 3.1.4), la idea de que la neurodegeneración se debe a la pérdida de su función normal no es actualmente muy aceptada. El rechazo de esta hipótesis se fundamenta sobre todo en el hecho de que los ratones transgénicos *knock-out* para la PrP^C no desarrollan signos de neurodegeneración (Bueler *et al.*, 1992), ni siquiera cuando se permite la expresión de la proteína durante el desarrollo embrionario pero se bloquea en la edad adulta (Mallucci, G. R. *et al.*, 2002).

En consecuencia, la hipótesis de que la PrP^{Sc} es la molécula responsable de la neurodegeneración es la más aceptada actualmente. Existen varias observaciones que respaldan esta noción. En primer lugar, existe una buena correlación topográfica y temporal entre los depósitos de PrP^{Sc} y las alteraciones neuropatológicas (DeArmond *et al.*, 1987; Dearmond & Prusiner, 1993); de hecho, la PrP^{Sc} sigue siendo el único biomarcador patognomónico de enfermedad priónica. En segundo lugar, las mutaciones causales de EET genéticas se localizan siempre en el gen *PRNP* y suelen inducir el malplegamiento de la proteína (Prusiner & Scott, 1997). Adicionalmente, se ha observado que la sobreexpresión de una de estas PrP^C mutadas provoca la aparición de un trastorno neurológico espontáneo (Hsiao & Prusiner, 1990; Manson *et al.*, 1999; Sigurdson *et al.*, 2009), que además es transmisible a ratones normales (Sigurdson *et al.*, 2009). Finalmente, se ha visto que concentraciones muy pequeñas de PrP^{Sc} purificada son altamente neurotóxicas para células en cultivo, en las que induce apoptosis (Hetz *et al.*, 2003).

A pesar de esta evidente relación entre la PrP^{Sc} y la neuropatología, se debe señalar también que la PrP^{Sc} no parece ser intrínsecamente neurotóxica, si no que la neurotoxicidad depende de la expresión de la isoforma fisiológica de la proteína, o PrP^C. La falta de expresión de PrP^C conlleva la resistencia a la infección experimental (Bueler *et al.*, 1993; Sailer *et al.*, 1994; Weissmann *et al.*, 1994), e incluso el bloqueo de la expresión en ratones con una infección priónica instaurada es capaz de revertir la degeneración espongiiforme y la muerte neuronal en estadios tempranos (Mallucci, G. *et al.*, 2003; Mallucci, G. R. *et al.*, 2007). Además, en un estudio realizado con ratones *knock-out* para la PrP^C en los que se había injertado tejido nervioso de animales infectados, se observó que las alteraciones histopatológicas se restringían a los neuroinjertos, mientras que el resto del encéfalo se mantuvo sano, y los animales no desarrollaron una enfermedad clínica (Brandner *et al.*, 1996). Todos estos datos sugieren que la presencia de PrP^C es necesaria para la neurotoxicidad.

En esta línea, se ha demostrado también que no sólo la presencia de la PrP^C, sino también su localización en la membrana plasmática, es necesaria para el proceso neurodegenerativo. Los ratones transgénicos cuya PrP^C carece de la secuencia C-terminal de unión al GPI, que sirve de anclaje a la membrana (*GPI-less*), han demostrado ser refractarios a la enfermedad clínica tras la infección experimental, a pesar de que la forma soluble de la PrP^C que expresan posee la capacidad de convertirse en PrP^{Sc} y acumularse en forma de placas de amiloide extracelulares (Chesebro *et al.*, 2005). Estos hechos sugieren que cuando la PrP^C presente en la membrana es transformada en PrP^{Sc} actúa activando vías de señalización intracelular que llevan a la neurotoxicidad.

Por el contrario, algunos autores proponen que la toxicidad está mediada por una molécula de PrP distinta de la PrP^C y la PrP^{Sc}, a la que se refieren como PrP^L (de "letal").

Este tipo de PrP sería un oligómero, u otra molécula de bajo peso molecular, sintetizada como un producto intermedio o secundario durante el ciclo de propagación del prión (Collinge & Clarke, 2007). En este modelo, por lo tanto, la infectividad/capacidad propagativa de los priones estaría desligada de su potencial neurotóxico, lo que permitiría explicar alguna de las observaciones realizadas *in vivo*, como la ocurrencia de infecciones subclínicas con presencia de abundante acumulación de PrP^{Sc} e infectividad (Hill *et al.*, 2000; Hill & Collinge, 2003). Este modelo está en línea con el enfoque actual de las enfermedades de naturaleza amiloide, según el cual el agente neurotóxico es un intermediario de la formación de agregados amiloideos (Haass & Selkoe, 2007).

5.4.2 Mecanismos implicados en la neurodegeneración

5.4.2.1 Muerte neuronal

La muerte neuronal es un fenómeno destacado en las enfermedades priónicas (Castilla *et al.*, 2004). Se piensa que la mayor parte de las neuronas en las EET mueren a través de una vía altamente regulada denominada muerte celular programada (MCP). En la MCR existen varios mecanismos, de los cuales el único relativamente bien caracterizado es la apoptosis o MCP de tipo I (Liberski *et al.*, 2004). Se han descrito fenómenos de apoptosis en una gran variedad de casos de enfermedad priónica (Dorandeu *et al.*, 1998; Ferrer, 1999; Giese *et al.*, 1995; Jesionek-Kupnicka *et al.*, 1999; Jesionek-Kupnicka *et al.*, 2001; Lucassen *et al.*, 1995). A pesar de ello, su papel exacto en la patogenia de la neurodegeneración en las EET sigue abierto a debate. Mientras que algunos autores han detectado la apoptosis en modelos murinos de scrapie (Giese *et al.*, 1995; Jamieson *et al.*, 2001; Lucassen *et al.*, 1995), otros no han encontrado evidencias claras de este fenómeno ni en modelos experimentales (Migheli *et al.*, 1994) ni en el hospedador natural, incluso en presencia de un aumento de la expresión de factores pro-apoptóticos (Hedman *et al.*, 2012; Lyahyai *et al.*, 2006; Lyahyai *et al.*, 2007). Por otra parte, el grado de implicación de la apoptosis en la enfermedad es desconocido, ya que no se sabe si ésta ocurre en las fases tempranas de la misma, o si es un proceso tardío que no participa realmente en la neurodegeneración (Mays & Soto, 2016).

La apoptosis depende generalmente de la activación de cascadas complejas de señalización intracelular que implican a una red altamente conservada de proteínas, incluyendo la familia Bcl-2 y las caspasas (Yuan *et al.*, 2003). El desencadenante de estas cascadas puede ser variado y se han propuesto varias posibilidades:

- Estrés oxidativo

Al igual que ocurre con la apoptosis en general, se desconoce si es un factor primario en la patogenia de la neurodegeneración o un evento tardío consecuencia de la desestabilización de la homeostasis celular. En cualquier caso, se piensa que el

aumento del estrés oxidativo podría estar causado por la pérdida de función antioxidante de la PrP^C (Brown, D. R., 2005).

- Respuesta a la acumulación de proteínas malplegadas

Esta vía comienza con la retención de formas malplegadas de PrP a nivel del retículo endoplasmático (ER), lo que genera el estrés de este orgánulo. De forma similar a lo que ocurre con otro tipo de proteínas con plegamientos aberrantes, éstas son trasladadas al citosol como parte del mecanismo de degradación asociada al ER (ERAD), para ser así eliminadas por el sistema ubiquitino-proteasómico (UPS), los lisosomas o mediante autofagia. Cuando estos mecanismos se ven sobrepasados, el equilibrio entre la síntesis y la degradación de proteínas se rompe y se produce la acumulación de agregados proteicos intracelulares, lo que puede desencadenar también vías colaterales de activación de la autofagia. Al mismo tiempo, se desencadena una liberación de calcio desde el ER, que incrementa la actividad de chaperonas y foldasas, en un intento de corregir la abundancia de proteínas malplegadas en el ER y recuperar el equilibrio. Finalmente, la pérdida de control de la proteostasis lleva a la activación de un sistema denominado UPR (“unfolded protein response” o respuesta a proteínas desplegadas). El UPR comienza como una vía de supervivencia celular que busca la restauración del equilibrio proteostático a través de la reducción de la síntesis proteica. Sin embargo, el estrés prolongado del ER y el fracaso del resto de los mecanismos activados hacen que las mismas vías que indujeron el UPR viren hacia la activación de la cascada de las caspasas, lo que conduce a la célula hacia la apoptosis (Mays & Soto, 2016).

- Neurotrofinas: en la encrucijada entre supervivencia y muerte neuronal

Las neurotrofinas son un grupo de factores de crecimiento que ejercen funciones importantes en el sistema nervioso central de los vertebrados. Se trata de moléculas que son secretadas por las neuronas y otros tipos celulares y son capaces de difundir por el tejido y regular distintos fenómenos, desde la formación de sinapsis y la maduración de las neuronas durante el desarrollo embrionario hasta funciones de mantenimiento del sistema nervioso durante la edad adulta (Bibel & Barde, 2000; Meeker & Williams, 2015). Su expresión y actividad también están ligadas a ciertas patologías neurodegenerativas y a la respuesta al daño tisular (Dawbarn & Allen, 2003; Shu *et al.*, 2015).

Esta familia de moléculas está compuesta por varios péptidos estructural y funcionalmente relacionados. Incluye el factor de crecimiento nervioso (“nerve growth factor”, NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (“brain-derived neurotrophic factor”, BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4/5 (NT-4/5) (Meeker & Williams, 2015). Todos estos péptidos son sintetizados en forma de pro-neurotrofinas,

que posteriormente o bien son procesadas por diversas enzimas de retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, o bien son secretadas en forma inmadura y procesadas por enzimas del espacio extracelular como la plasmina. El procesamiento supone la eliminación de la secuencia N-terminal de la proteína, lo que las convierte en sus formas maduras, tradicionalmente vinculadas con su actividad biológica (Lu *et al.*, 2005; Teng *et al.*, 2010).

Las neurotrofinas actúan a través de dos tipos de receptores de membrana: los receptores de tipo tirosina-kinasa TrkA, TrkB y TrkC, y el receptor p75^{NTR} (Segal, 2003).

Los receptores Trk tienen una alta afinidad de unión por las formas maduras de las neurotrofinas, además de unirse de forma específica a cada una de ellas; así, NGF activa específicamente el receptor TrkA, BDNF y NT-4/5 activan TrkB, y NT-3 activa TrkC, aunque también se une con menor afinidad a los otros dos (Barbacid, 1994). Tras la unión de su ligando específico, los receptores Trk se dimerizan y fosforilan, activando rutas de señalización intracelular que conducen hacia la supervivencia, el crecimiento y la diferenciación de la célula (Segal, 2003).

Por su parte, el receptor p75^{NTR} fue inicialmente identificado como un receptor de baja afinidad para el NGF, aunque posteriormente se demostró que era capaz de unirse con todas las formas maduras de las neurotrofinas, aunque con baja afinidad (Dawbarn & Allen, 2003). Este receptor pertenece a la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) y su región citoplásmica posee un “dominio de muerte” (Liepinsh *et al.*, 1997), por lo que, al contrario que los receptores Trk, no posee función catalítica propia y su actividad depende de la interacción con distintos mensajeros intracelulares (Bibel & Barde, 2000).

La activación del receptor p75^{NTR} parece desencadenar mecanismos de apoptosis, aunque la vía exacta por la que esto ocurre no está del todo clara (Bibel & Barde, 2000). No obstante, parece que la apoptosis mediada por p75^{NTR} sólo puede ocurrir en células que no expresan específicamente receptores Trk, ya que la activación de éstos induce una respuesta contraria en presencia del ligando (Bamji *et al.*, 1998; Yoon *et al.*, 1998). Esta observación se correlaciona con otros estudios que demuestran que la interacción entre los receptores p75^{NTR} y Trk aumenta la afinidad de éstos últimos por sus ligandos específicos, y por lo tanto induce una respuesta de supervivencia (Bibel *et al.*, 1999; Hempstead *et al.*, 1991).

Por otra parte, se ha evidenciado que, sorprendentemente, las formas no maduras de las neurotrofinas (pro-neurotrofinas) poseen una actividad biológica propia y que interactúan preferentemente con el receptor p75^{NTR}, activando vías de señalización pro-apoptóticas (Meeker & Williams, 2015; Teng *et al.*, 2010). Adicionalmente, p75^{NTR} es capaz de interactuar con otros receptores que se coexpresan en la membrana celular. Ya se ha mencionado que la interacción entre p75^{NTR} y los receptores Trk

conduce a la supervivencia celular (Bibel *et al.*, 1999; Hempstead *et al.*, 1991). Por el contrario, p75^{NTR} puede asociarse con una proteína de membrana denominada sortilina, formando un complejo que se une con alta afinidad a las pro-neurotrofinas y que desencadena una respuesta intracitoplásmica que conduce a la apoptosis (Meeker & Williams, 2015; Nykjaer & Willnow, 2012). Por último, la coexpresión de p75^{NTR} con otros receptores, como NogoR o Lingo, y la unión de ciertos ligandos específicos puede conducir incluso a otros desenlaces, como la inhibición del crecimiento axonal o fenómenos de plasticidad sináptica (Fry *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2005; Meeker & Williams, 2015).

Todas estas observaciones han llevado a proponer el modelo “yin-yang” del funcionamiento de las neurotrofinas, según el cual el efecto desencadenado por la acción de una de estas moléculas depende, en primer lugar, de su estado de maduración (pro-neurotrofina vs. neurotrofina madura) y, en segundo lugar, del receptor con el que interactione (Trk vs. p75^{NTR}) (Lu *et al.*, 2005).

Además, el mismo receptor p75^{NTR} puede activar distintas vías de señalización intracelular, dependiendo del ligando y de la coexpresión de otros receptores de membrana. Este hecho posiciona a p75^{NTR} en un punto clave en la patogenia de las enfermedades que cursan con fenómenos neurodegenerativos. La modulación de la expresión y la actividad de este receptor podría ser capaz de inclinar a las poblaciones neuronales hacia la muerte o la supervivencia, lo que deja entrever su potencial como agente terapéutico (Longo & Massa, 2013).

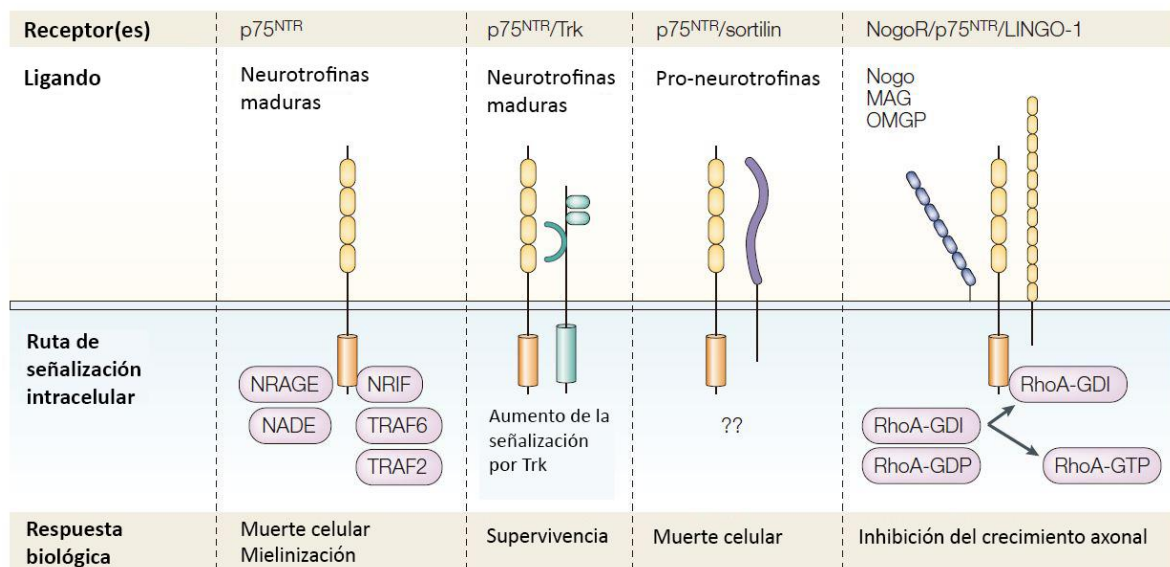


Figura 9. Rutas de señalización y respuestas celulares inducidas por la activación de p75^{NTR} solo o en presencia de sus correceptores. Adaptado de: (Lu *et al.*, 2005).

5.4.2.2 Neuroinflamación: la implicación de la glía

A pesar de que las EET son patologías que carecen de una respuesta inmunológica o inflamatoria típica (Porter *et al.*, 1973), se han evidenciado fenómenos de neuroinflamación, aunque no se ha clarificado si son eventos laterales de la patogenia o si contribuyen al proceso neurodegenerativo (Kercher *et al.*, 2007). La neuroinflamación se define como la activación de las células de la glía, principalmente astrocitos y células microgliales. La presencia de astrocitos activados y microglía reactiva se ha probado en números casos naturales y modelos experimentales de enfermedad priónica (Liberski & Brown, 2004; v Eitzen *et al.*, 1998). Esto ha llevado a algunos autores a proponer la hipótesis de que la activación de la glía como respuesta a la acumulación de agregados proteicos es el verdadero desencadenante de la neurodegeneración durante la patogenia de las enfermedades priónicas e incluso de otras patologías neurodegenerativas humanas. Algunos estudios han demostrado que la enfermedad priónica puede ocurrir en modelos en los que la PrP^C solo se expresa en astrocitos (Moser *et al.*, 1995; Raeber *et al.*, 1997). Por su parte, la microglía reactiva es un hallazgo histopatológico común en los casos de EET (Sasaki *et al.*, 1993), y se ha evidenciado que su aparición es posterior a la acumulación de PrP^{Sc} pero anterior a la muerte neuronal, lo que sugiere el papel neurotóxico de este tipo celular (Betmouni *et al.*, 1996; Williams, Van Dam *et al.*, 1997; Williams, Lucassen *et al.*, 1997). En oposición a este enfoque, otros autores proponen la función neuroprotectora de la microglía, al observarse que la supresión de este tipo celular en modelos murinos reduce drásticamente la esperanza de vida de los animales (Carroll *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2016).

6. DIAGNÓSTICO DE LAS EET

6.1 Diagnóstico *in vivo*

6.1.1 Diagnóstico clínico

Tanto en animales como en humanos, el diagnóstico de las EET comienza, generalmente, con la aparición de los primeros signos clínicos que indican una alteración a nivel del sistema nervioso. Esta sintomatología lleva posteriormente a la realización de pruebas clínicas y de laboratorio para confirmar la enfermedad *in vivo*.

En el ganado ovino, la infección con scrapie clásico suele manifestarse clínicamente entre los 2 y los 5 años de vida. Los primeros signos clínicos suelen ser poco evidentes y a menudo pasan desapercibidos. La instauración del cuadro clínico suele ser insidiosa y ocurrir a lo largo de varias semanas o meses.

Los primeros síntomas que se detectan son cambios en el estado mental y en el comportamiento del animal. Los animales pueden presentar hiperreactividad a estímulos externos (hiperestesia) y resistencia a ser manipulados. Por el contrario,

cuando se los deja tranquilos suelen presentar apatía y posturas anormales, como cabeza baja y apoyada contra la pared, y mirada extraviada. Es frecuente también detectar bruxismo y lamidos repetitivos de los labios. El prurito es uno de los signos más típicos del scrapie clásico en ovinos (de ahí que también se llame a esta enfermedad “prurigo lumbar”). Los animales tienden a rascarse y frotarse con objetos del entorno, generándose zonas de alopecia con ocasionales lesiones cutáneas e hiperpigmentación. Este signo clínico puede evidenciarse fácilmente mediante la “prueba del rascado”, consistente en rascar intensamente ciertas partes de la región dorsal del animal; la prueba se considera positiva si desencadena una respuesta estereotipada de lamido repetitivo de los labios y exteriorización de la lengua (Clark & Moar, 1992; Healy *et al.*, 2003).

Más adelante se instauran los cambios posturales y de locomoción. Los animales en reposo suelen presentar separación de las extremidades para lograr un mayor equilibrio, y cuando se les hace caminar manifiestan ataxia y marcha hiperométrica. En estos casos, pueden realizarse pruebas para evaluar los reflejos posturales (sensibilidad propioceptiva) y la sensibilidad al dolor superficial y profundo. En estadios avanzados es frecuente encontrar animales que no son capaces de ponerse de pie por ellos mismos. Los temblores de la cabeza y en ocasiones del resto del cuerpo son otro de los signos frecuentes (Clark & Moar, 1992; Healy *et al.*, 2003).

En el caso del scrapie atípico, el síntoma predominante es la ataxia, y los animales no suelen manifestar signos de prurito (Benestad *et al.*, 2003).

En los seres humanos, las EET cursan con una gran variedad de cuadros clínicos. Las pruebas clínicas que se pueden realizar para complementar la observación directa de los síntomas incluyen la electroencefalografía y las técnicas de neuroimagen, como la resonancia magnética nuclear (Krasnianski *et al.*, 2004).

6.1.2 Biomarcadores diagnósticos y posibilidades de diagnóstico preclínico

Como ya se ha mencionado en la sección 5 (Patogenia), en ovinos es posible realizar el diagnóstico del scrapie en estadios preclínicos mediante la detección inmunohistoquímica de PrP^{Sc} en tejido linfóide obtenido por medio de biopsias (Dennis *et al.*, 2009; Gonzalez *et al.*, 2005; Langeveld *et al.*, 2006; Monleon *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2006).

En seres humanos, la biopsia de tejido cerebral permite el diagnóstico *in vivo* mediante la observación de los cambios neuropatológicos característicos de la enfermedad (espongiosis, pérdida neuronal, acumulación de PrP^{Sc} y gliosis) (Budka *et al.*, 1995) y el estudio del perfil molecular del prión responsable por Western blot (Hill *et al.*, 2003). Sin embargo, la creciente sensibilidad y exactitud de técnicas de diagnóstico menos invasivas, como el análisis de biomarcadores en líquido cefalorraquídeo (LCR), ha hecho que la biopsia de cerebro entre en desuso. Actualmente sólo se emplea en casos

en los que el diagnóstico diferencial incluye otros trastornos nerviosos tratables que no pueden ser diferenciados de una EET por otras vías (Thompson & Mead, 2019).

Como se ha dicho, el diagnóstico clínico de las EET humanas se afianza en el análisis de una serie de biomarcadores en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes. Al mismo tiempo, estos análisis permiten descartar otros trastornos de naturaleza nerviosa para los que, al contrario que en las EET, exista tratamiento.

Los biomarcadores del LCR se pueden clasificar en dos grupos: por un lado, marcadores “subrogados”, que son proteínas que se liberan al sistema ventricular a causa de la muerte neuronal y la neurodegeneración, y por otro, la proteína prión y sus derivados, que participan directamente en la patogenia.

En el primer grupo se incluyen la proteína 14-3-3, la tau total y la proteína de neurofilamento de cadena ligera (NfL), que se consideran marcadores de daño neuronal y se analizan de forma rutinaria (Otto *et al.*, 2002; Schmitz *et al.*, 2016; Thompson & Mead, 2019; Zerr *et al.*, 1998). Existen otros marcadores de muerte neuronal que pueden complementar el diagnóstico de las EET, como la α -sinucleína (Kasai *et al.*, 2014; Llorens *et al.*, 2018), la proteína S100b (Chohan *et al.*, 2010), la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), la enolasa específica de neuronas (NSE) (Thompson & Mead, 2019) y la neurogranina (Blennow *et al.*, 2019), pero su eficacia a nivel diagnóstico no está completamente probada.

Por su parte, en el segundo grupo se engloban el análisis de la PrP total en LCR, cuyos niveles se ha demostrado que están disminuidos en pacientes de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Meyne *et al.*, 2009), y la detección directa del agente causal (el prión). Esto último es complicado debido a los bajos niveles de PrP^{Sc} presentes en el LCR, y requiere el uso de técnicas de amplificación (PMCA y RT-QuIC), las cuales se describirán en secciones posteriores.

6.2 Diagnóstico *post-mortem*

6.2.1 Diagnóstico histopatológico

Como ya se ha dicho, la degeneración espongiiforme es la lesión más característica de este grupo de enfermedades y consiste en la formación de vacuolas en el interior del pericarion neuronal (vacuolización intraneuronal) o en el neuropilo de la sustancia gris (espongiosis). Las lesiones generalmente son bilaterales y simétricas (Ligios *et al.*, 2002; Wells & McGill, 1992; Wood *et al.*, 1997). Sin embargo, la distribución y la severidad de la vacuolización sigue un patrón determinado por el tipo de EET, la especie y, en el caso de EET con fenómeno de cepas, la cepa responsable (Fraser & Dickinson, 1968).

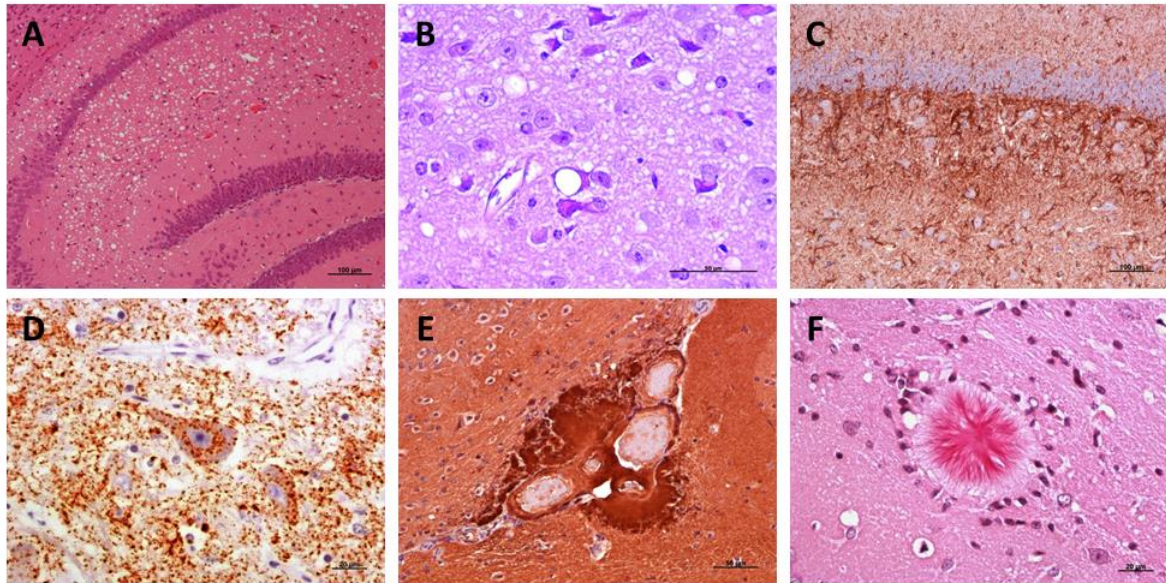


Figura 10. Hallazgos neuropatológicos característicos de las EET. A) Espongiosis o vacuolización del neuropilo; B) vacuolización intraneuronal; C) gliosis; D) acumulación de PrP^{Sc}, E-F) presencia de placas de amiloide multicéntricas (E) o unicéntricas (F), compuestas de PrP (E) y positivas a la tinción rojo Congo (F).

La degeneración esponjiforme está acompañada de otras alteraciones características de los fenómenos neurodegenerativos, como la muerte neuronal y la gliosis (astrocitosis y presencia de microglía reactiva) (Budka *et al.*, 1995). En algunos tipos de EET pueden aparecer placas de amiloide en distintos puntos del encéfalo (Jeffrey *et al.*, 1998; McBride *et al.*, 1988; Wood *et al.*, 1997). La presencia de placas floridas, que se definen como placas de amiloide unicéntricas rodeadas de un halo de vacuolas, se considera patognomónica de los casos de variante de CJD (vCJD) en humanos (Parchi *et al.*, 2012).

En seres humanos, el estudio meticuloso de las alteraciones neuropatológicas, junto con el genotipo de paciente y el perfil bioquímico de la PrP^{Sc} responsable, permite clasificar los casos esporádicos de CJD (sCJD) en varias categorías (Parchi *et al.*, 2012).

6.2.2 Técnicas basadas en la detección directa de PrP^{Sc}

Dado que tanto la forma celular (PrP^C) como la forma patológica de la proteína prión (PrP^{Sc}) comparten la misma secuencia primaria, no es posible distinguirlas mediante el uso de anticuerpos. Por lo tanto, su diferenciación debe basarse en sus distintas propiedades físico-químicas, fundamentalmente sus distintas resistencias a la digestión con proteinasa K (PK), que degrada completamente la PrP^C pero deja un núcleo C-terminal resistente (PrP^{res}) cuando actúa sobre la PrP^{Sc}.

De las técnicas de detección que se basan en esta propiedad de la PrP^{Sc}, el Western blot es la más ampliamente empleada (Katz *et al.*, 1992; Madec *et al.*, 1998; Madec, Belli *et al.*, 2000; Mohri *et al.*, 1992). Además del resultado cualitativo

(positivo/negativo), esta técnica ofrece información de las características bioquímicas de la PrP^{res} y, con ello, permite la diferenciación de cepas. Esto es debido a que las distintas cepas del agente están codificadas en la estructura de la proteína; cada conformación deja accesible distintas partes de la proteína a la acción de la PK, liberándose fragmentos C-terminales de la PrP^{Sc} de mayor o menor peso molecular. Estas diferencias en el tamaño de la PrP^{res} se reflejan en distintas movilidades en SDS-PAGE. Además, el patrón de glicosilación, definido como la proporción relativa de las tres glicofomas de la proteína, es único de cada cepa priónica. Por último, el empleo de anticuerpos que se unen a distintas partes o epítomos de la PrP^{res} aporta datos sobre su secuencia y estructura y permite evidenciar fragmentos de PrP distintos de la PrP^{res}, como bandas C- o N-terminales, que son característicos de determinadas cepas, como la CH1641 o ciertos subtipos de GSS (Pirisinu *et al.*, 2013).

La detección *in situ* de la PrP^{Sc} es posible mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas. Esto permite no solo evidenciar su presencia en el tejido (Foster *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1993; Ryder *et al.*, 2001), sino también su distribución y abundancia, su localización de nivel celular y las características morfológicas de los depósitos (Gonzalez *et al.*, 2002). En la mayor parte de los casos, la acumulación de PrP^{Sc} precede a la aparición de las lesiones. Además, se ha visto que en EET con fenómeno de cepas, como el scrapie, existe una correlación entre la cepa infectante y los patrones de depósito de PrP^{Sc} (Gonzalez *et al.*, 2003).

Por último, la Comisión Europea elaboró, a raíz de la crisis de la BSE, un plan para desarrollar, evaluar y autorizar distintas pruebas de diagnóstico que permitiera el análisis rápido (*screening*) de los animales destinados al consumo humano, a fin de cumplir con el plan de vigilancia activa de las EET. Estas pruebas rápidas se pusieron a punto para la detección de la PrP^{Sc} en el tejido nervioso mediante procedimientos inmunológicos, y fueron evaluadas en base a su sensibilidad y especificidad diagnósticas.

6.3 Técnicas de amplificación de los priones

6.3.1 La PMCA

6.3.1.1 Concepto y desarrollo de la PMCA y sus aplicaciones diagnósticas

En ocasiones, como por ejemplo cuando se trabaja con muestras de LCR de pacientes humanos o con muestras de otros tejidos o fluidos (Brown, P. *et al.*, 2001), la proteína prión patológica no está presente en cantidades lo suficientemente elevadas como para detectarla con las técnicas convencionales, lo que reduce sustancialmente la sensibilidad en el diagnóstico. Esta problemática llevó a los investigadores a cuestionarse si era posible amplificar artificialmente los priones, mediante el uso de sistemas *in vitro*, con el objetivo de detectar concentraciones bajas del agente.

Los primeros avances en esta dirección los realizó el grupo de Byron Caughey en un sistema libre de células. Para ello, emplearon PrP^{Sc} purificada extraída del cerebro de hámsteres infectados con la cepa 263K y la sometieron a una desnaturalización parcial, tras lo cual permitieron su renaturalización. Observaron que esta PrP^{Sc} renaturalizada era capaz de inducir la conversión de PrP^C recombinante de hámster marcada radiactivamente (Kocisko *et al.*, 1994). Aunque la eficiencia del proceso fue muy baja, este sistema permitió demostrar por primera vez que la PrP^{Sc} era capaz de inducir el malplegamiento de la PrP^C en ausencia de cualquier otro factor tisular, lo que fue un importante apoyo a la hipótesis “solo proteína”.

Poco después, el grupo de Claudio Soto, animado por los resultados positivos del “ensayo libre de células”, intentó mejorar la técnica para aumentar la eficiencia de la amplificación y, con ello, la sensibilidad diagnóstica. Con el objetivo de emular la replicación *in vivo* de los priones, y basándose en el modelo de replicación por nucleación-polimerización (ver sección 3.3), pusieron en contacto una pequeña cantidad de PrP^{Sc} (la “semilla”) con un exceso de PrP^C procedente de cerebros sanos (el “sustrato”) y lo sometieron a ciclos seriadados de incubación y sonicación. Para ello, introdujeron en el sistema un circuito cerrado de agua acoplado a un baño termostático que regulaba la temperatura (manteniéndola a niveles fisiológicos) y una fuente de ultrasonidos. La idea detrás de este sistema era que durante la fase de incubación, la semilla, que es un oligómero de PrP^{Sc}, recluta moléculas de PrP^C presentes en exceso en el sustrato, haciendo crecer la fibra de amiloide. Durante la fase de sonicación, la fibra se fragmenta, dando lugar a multitud de nuevas semillas que replican el proceso de forma cíclica. De esta manera, la cantidad de PrP^{Sc} generada *de novo* aumenta exponencialmente a lo largo de varios ciclos sucesivos de incubación-sonicación. Esta nueva técnica fue bautizada como “amplificación cíclica del malplegamiento de proteínas” (PMCA, por sus siglas en inglés “protein misfolding cyclic amplification”) y, conceptualmente, era análoga a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la cual pequeñas cantidades de DNA se amplifican cíclicamente a expensas de un sustrato (Saborio *et al.*, 2001).

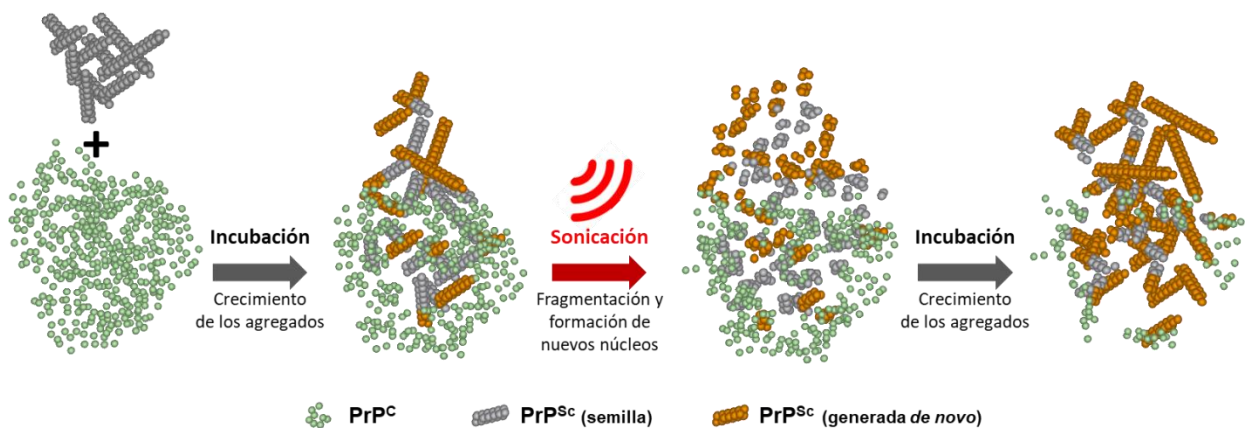


Figura 11: Fases de la PMCA. Créditos: Joaquín Castilla.

Pronto, la nueva técnica fue automatizada (“serial automated PMCA” o saPMCA), lo que mejoró su sensibilidad y su rendimiento y le otorgó un importante potencial diagnóstico (Castilla *et al.*, 2005; Castilla *et al.*, 2006; Saá *et al.*, 2006b).

Aplicada al diagnóstico, la PMCA es capaz de amplificar cantidades de PrP^{Sc} muy pequeñas, como las presentes en tejidos periféricos o fluidos de pacientes de EET, lo que permite su detección y por lo tanto, el diagnóstico de la enfermedad a partir de estas muestras de fácil obtención (Castilla, Saá, & Soto, 2005), incluso en estadios preclínicos (Saá *et al.*, 2006a). Según sus creadores, la PMCA se puede combinar con las otras técnicas de detección de la PrP^{Sc}, generando así una herramienta diagnóstica de gran sensibilidad (Saborio *et al.*, 2001).

Al emular los procesos de replicación que ocurren realmente en los organismos vivos, la PMCA es capaz de replicar fielmente las propiedades de los priones replicados, incluyendo las características estructurales y bioquímicas. También es capaz de mantener la infectividad y las características de cepa de los priones producidos *in vitro*, ya que la inoculación de los mismos en hospedadores susceptibles produce una enfermedad con características clínicas e histopatológicas idénticas a la causada por el agente original (Castilla *et al.*, 2005).

6.3.1.2 Las aplicaciones de la PMCA más allá del diagnóstico

La PMCA nació originalmente para ser utilizada como técnica diagnóstica de gran sensibilidad (Saborio *et al.*, 2001), y tuvo una enorme repercusión en el contexto de la crisis de la BSE y la preocupación por los casos de transmisiones a seres humanos. Sin embargo, actualmente existen numerosas aplicaciones de la PMCA más allá del diagnóstico, que la han convertido en una de las herramientas más versátiles para el estudio de todas las facetas de la biología de los priones.

Así, el uso de la PMCA ha permitido ahondar en la comprensión sobre los fenómenos de cepa y barrera de transmisión. Ha permitido romper algunas barreras de especie que consideraban absolutas, como la del conejo (Chianini *et al.*, 2012; Vidal *et al.*, 2015), la del perro (Vidal *et al.*, 2013) y, en cierta medida, la del caballo (Bian *et al.*, 2017). La introducción de la PrP^C de origen recombinante (rec-PrP^C) como sustrato de la PMCA llegó a demostrar que ésta era capaz de malplegarse al incubarla con semillas de PrP^{Sc} en ausencia de cualquier otro factor tisular (Kim *et al.*, 2010), e incluso en ausencia de semilla si se complementaba con ciertos factores (Wang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011), lo que fue un nuevo e importante apoyo a la hipótesis “solo proteína”.

La generalización del uso de la rec-PrP^C abrió la puerta a multitud de nuevas aplicaciones. Algunos ejemplos son el estudio de los factores implicados en la evolución divergente de los priones, lo cual es una aproximación molecular al fenómeno de cepas (Fernandez-Borges *et al.*, 2018), o del efecto de cientos de mutaciones, descritas o no en la naturaleza, sobre la propensión de la PrP^C a

malplegarse, lo que puede conducir a la identificación de polimorfismos asociados con la resistencia a la infección priónica (Erana *et al.*, 2017; Fernandez-Borges *et al.*, 2017).

6.3.2 La RT-QuIC

La segunda de las técnicas de amplificación *in vitro* de los priones se denomina “conversión inducida por agitación en tiempo real” (RT-QuIC, por sus siglas en inglés “real-time quaking-induced conversión) y fue desarrollado por el grupo de Ryuichiro Atarashi y Noriyuki Nishida (Atarashi *et al.*, 2011). Estos autores combinaron los elementos de dos metodologías previas:

1. El método QuIC (“quaking-induced conversión”), que conseguía amplificar priones poniendo en contacto una semilla de PrP^{Sc} y un sustrato de PrP^C recombinante, de forma similar a la PMCA pero empleando agitación en lugar de ultrasonidos, y que debía combinarse con las técnicas habituales de detección de PrP^{Sc}, como el Western blot (Atarashi *et al.*, 2008).
2. El método ASA (“amyloid seeding assay”) (Colby *et al.*, 2007), que aprovecha las propiedades de un compuesto llamado tioflavina T (ThT), que en presencia de amiloide emite una fluorescencia (Rogers, 1965).

La combinación de estas dos metodologías llevó a una amplificación eficiente de la PrP^{Sc} que podía ser monitorizada mediante el aumento progresivo de la fluorescencia debida a la ThT. Estos y otros autores demostraron que esta nueva técnica, aplicada a muestras de LCR de pacientes humanos, era eficaz para el diagnóstico ya que poseía una especificidad mayor que la del resto de biomarcadores “subrogados” empleados hasta la fecha (Atarashi *et al.*, 2011; McGuire *et al.*, 2012). Actualmente se emplea de forma rutinaria en el diagnóstico de las EET humanas.



SECCIÓN **III**

Estudios

**Mixtures of prion substrains in natural
scrapie cases revealed by mice
bioassay**

Mixtures of prion substrains in natural scrapie cases revealed by mice bioassay

Abstract

Phenotypic variability in prion diseases is associated to the existence of prion strains. The strain phenomenon can be accommodated within the protein-only hypothesis through the notion that different conformational variants of PrP^{Sc} encode distinct pathobiological properties. Within this framework, the conformational selection model proposes that a given PrP amino acid sequence allows a limited number of folding states, and that the degree of overlapping between PrP^{Sc} conformations in the inoculum and permitted conformations of host PrP^C determines the strength of the transmission barrier. In the context of a heterotypic interaction, conformational selection may favor minor components from this “cloud” and thus modify the range of prion variants that propagate. Therefore, transgenic models expressing homologous PrP^C are crucial to faithfully study the actual variety of prion strains. Ovinized mice show enhanced susceptibility to infection with scrapie prions and have been employed to characterize strains in natural sheep isolates.

In the present study, we used two ovine PrP^C-expressing models to bioassay 20 sheep scrapie isolates from distinct outbreaks within the Spain-France-Andorra transboundary territory. Animals were intracerebrally inoculated and survival periods, lesion profiles, PrP^{Sc} distribution and banding patterns were studied.

Inocula showed a remarkable homogeneity on banding patterns, all of them but one showing 19-kDa PrP^{res}. However, a number of isolates caused accumulation of 21-kDa PrP^{res} in nervous tissue of TgShp XI mice while presenting survival periods and neuropathological features similar to the rest. A different subgroup of isolates caused very long survival periods with low attack rates and presence of 21-kDa PrP^{res} in Tg338 mice. These animals also showed milder spongiosis and occasional presence of amyloid plaques.

These results suggest that some scrapie isolates contained mixtures of substrains that were resolved distinctly in each transgenic model. The major 19-kDa component and the two distinct 21-kDa components seemed to coexist in source inocula, as not all challenged mice developed the same phenotype. The reason why each transgenic model favors a specific component of the mixture is unknown, although PrP^C expression level may play a role. Our results also indicate that coinfection of sheep with more than one scrapie strain is more frequent than infection with a single component.

Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), also known as prion diseases, are a group of rare, fatal and progressive neurodegenerative disorders that affect both animals and human beings. TSEs are caused by non-conventional etiologic agents called prions. According to the widely accepted prion hypothesis (Prusiner, 1982), prions consist exclusively of a pathogenic protein conformer, termed PrP^{Sc}, that derives from the physiological, host-encoded cellular prion protein (PrP^C) (Oesch *et al.*, 1985; Prusiner, 1982; Stahl *et al.*, 1987) via a post-translational conformational change that is triggered by PrP^{Sc} itself in a feed-back manner (Prusiner, 1991). PrP^{Sc} accumulates in the organism, mainly in nervous tissue (Prusiner, 1998), and through a yet unclarified mechanism gives rise to neuronal death, neuron loss and vacuolization (Ligios *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 1997), together with astrogliosis, microgliosis (Lazarini *et al.*, 1994; Rezaie & Lantos, 2001; Titeux *et al.*, 2002) and other phenomena linked to neuroinflammatory processes (Budka *et al.*, 1995). This progressive degeneration of the central nervous system manifests as a set of neurological signs appearing after long incubation periods.

Although, according to the protein-only model (Prusiner, 1982), the agent responsible for these disorders lacks nucleic acids, the existence of several phenotypic variants has been proved for different TSEs. This was first described for scrapie when two different clinical syndromes were observed in scrapie-infected goats, which were reproducible by intracerebral inoculation (Pattison & Millson, 1961). Prion variants associated to these different phenotypes were termed “strains”, by analogy with other infectious agents. Further demonstration of the existence of scrapie strains was addressed by studies in wild type mice (Bruce, 1993; Zlotnik & Rennie, 1963), which also established a methodology to discriminate them, based on the study of survival periods and lesion profiles (Dickinson & Meikle, 1971; Fraser & Dickinson, 1968; Fraser & Dickinson, 1973).

Other typing approaches based on the assessment of PrP^{Sc} distribution by PET-blot and immunohistochemistry (Gonzalez *et al.*, 2002) or on the molecular characterization of the prion protein by Western blot, have been successfully employed to discriminate between BSE and scrapie (Gonzalez *et al.*, 2003) and among scrapie strains (Gonzalez *et al.*, 2002; Thackray *et al.*, 2008; Thackray *et al.*, 2011).

The existence of prion strains can be accommodated within the protein-only hypothesis through the notion that the abnormal conformation of PrP^{Sc} is not unique. In this model, prion strains are encoded in the conformation of PrP^{Sc} molecules, which can adopt several folding states that are associated to different pathological features (Bessen & Marsh, 1992; Bessen & Marsh, 1994; Telling *et al.*, 1996). Within this framework, the conformational selection model (Collinge & Clarke, 2007) proposes

that a given amino acid sequence for PrP^C allows a limited portfolio of conformations, and thus only a number of prion strains will induce its misfolding while others will not be able to template its conversion into a disease-associated conformation. As a consequence, the degree of overlapping between the *Prnp* gene sequence of the host species and that of the donor influences the capability of an isolate to transmit the disease, which provides a molecular explanation for the transmission barrier phenomenon.

The use of wild-type mouse lines expressing different alleles of the murine *Prnp* gene allowed the differentiation of at least 20 scrapie strains (Bruce, 1993). However, wild type mice-based typing methodologies may not be reliable since many scrapie isolates cannot transmit to these models, including isolates of classical scrapie (Bruce *et al.*, 2002; Thackray, Hopkins *et al.*, 2012; Thackray *et al.*, 2012), unconventional scrapie isolates such as CH1641 (Foster & Dickinson, 1988) and atypical scrapie (Benestad *et al.*, 2008; Benestad *et al.*, 2008; Le Dur *et al.*, 2005). When transmission to wild-type mice is achieved, survival periods tend to be very prolonged and highly variable (Bruce *et al.*, 2002). This phenomenon is known as transmission barrier (Priola, 1999; Scott *et al.*, 2005) and was also observed in experimental transmissions of other TSEs to rodent models (for a review, see (Beringue, Vilotte *et al.*, 2008)). Differences in PrP^C amino acid sequence between donor and host, both on interspecies and intra-species transmission experiments, are frequently acknowledged as the main molecular determinant of transmission barriers, and are also responsible for subclinical infections (Hill & Collinge, 2003). Moreover, according to the conformational selection model (Collinge & Clarke, 2007), heterotypic interaction between PrP^{Sc} and PrP^C can favor the propagation of PrP^{Sc} conformers present in small quantities (Beringue *et al.*, 2008; Beringue *et al.*, 2008; Collinge & Clarke, 2007). Consequently, studying scrapie strain variability by means of bioassay in a model expressing a PrP^C other than its natural substrate, i.e. ovine PrP^C in the case of scrapie, may alter the original portfolio of prion variants to the point that it keeps little if any resemblance with the original sheep scrapie strain range.

In this line, studying the variability of scrapie strains using a homologous murine model, i.e. mice expressing ovine PrP^C on a murine *Prnp*^{-/-} background, may be crucial to faithfully recapitulate the actual variability of scrapie prion strains present in sheep populations. To this end, several distinct transgenic mouse lines carrying different alleles (A¹³⁶R¹⁵⁴Q¹⁷¹, V¹³⁶R¹⁵⁴Q¹⁷¹) of the ovine *Prnp* gene have been created (for a review, see (Groschup & Buschmann, 2008)). These ovinated models show enhanced susceptibility to direct sheep scrapie infection (Vilotte *et al.*, 2001) and have been used in studies seeking to characterize field sheep scrapie isolates (Bencsik *et al.*, 2007; Bencsik *et al.*, 2007; Bruce *et al.*, 2002; Griffiths *et al.*, 2010; Griffiths *et al.*, 2010; Groschup *et al.*, 2007; Groschup *et al.*, 2007; Thackray *et al.*, 2008; Thackray *et al.*,

2008; Thackray *et al.*, 2011; Thackray *et al.*, 2011; Thackray *et al.*, 2012; Thackray *et al.*, 2012).

Although not fully addressed, the question of whether scrapie may be transmissible to humans still remains. Some evidence of this zoonotic potential came from a study where a number of scrapie isolates were able to infect transgenic mice expressing human PrP^C, which showed a profile matching that of sporadic CJD (Cassard *et al.*, 2014). In addition, some authors hypothesize that sCJD might be in fact provoked by exposure to small ruminant prions, even though epidemiological studies do not seem to support this hypothesis (EFSA Panel on, 2011). According to these circumstances, characterizing and holding control of the variety of enzootic scrapie strains present in the small ruminant population through the Spain-France-Andorra transboundary territories is crucial for scrapie control and eradication purposes and for public health.

Material and methods

Sheep. Ten naturally scrapie-infected sheep were used for this study; six of them were at the terminal stage of the disease while four were in a preclinical phase. With the aim of including as many different scrapie strains as possible, the selection was done according to two criteria: a) animals coming from geographically distant scrapie outbreaks, and b) animals presenting distinct clinical signs.

In the terminal stage group, the *in vivo* diagnosis of scrapie was established using standardized clinical examination. In contrast, preclinical-stage animals were identified through rectal biopsy and immunohistochemical detection of PrP^{Sc} on rectal mucosa-associated lymphoid tissue using monoclonal anti-PrP antibody L42 (1:500, R-Biopharm), as described elsewhere (Monleon *et al.*, 2011).

Animals were sacrificed by intravenous injection of sodium pentobarbital followed by necropsy and systematic sampling. Samples from brain and mesenteric lymph nodes were divided into two halves; one half was fixed in a solution of 10% formalin for further histological studies, while the other was immediately immersed in liquid nitrogen and later conserved at -80°C for biochemical analyses and the preparation of inocula.

After sacrifice, the presence of PrP^{Sc} was confirmed for both the terminal and the preclinical group in both nervous and lymphoid tissues using immunohistochemistry with monoclonal anti-PrP antibody L42 (1:500, SPI-Bio). Additionally, the *Prnp* genotype was determined through sequencing of genomic DNA obtained from whole blood samples.

Clinical stage, clinical signs, genotype, age at sacrifice and geographical origin of sheep are indicated in **Table 1**.

Inocula. First-passage inocula were prepared from nervous (N) and lymphoid tissues (L) of the aforementioned sheep. Inocula 1N to 10N corresponded to inocula prepared from medulla oblongata (obex), while inocula 1L to 10L were those prepared from mesenteric lymph nodes of the animals. Inocula 1N to 6N and 1L to 6L derived from tissues of terminal sheep, while inocula 7N to 10N and 7L to 10L sourced from preclinical sheep. Second-passage inocula were prepared from pools of spinal cords harvested from diseased first-passage mice. All inocula consisted of 10% (w/v) tissue homogenates in physiological saline and were subjected to microbiological analysis to ensure sterility prior to intracerebral inoculation.

Mice. TgShp XI mice express ovine ARQ PrP^C with expression levels of between 4 and 8-fold compared to that of sheep brain (Kupfer *et al.*, 2007). These animals were kindly provided by M. Groschup (Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald - Insel Riems, Germany) and were brought to our facilities to be inoculated after the appropriate adaptation period.

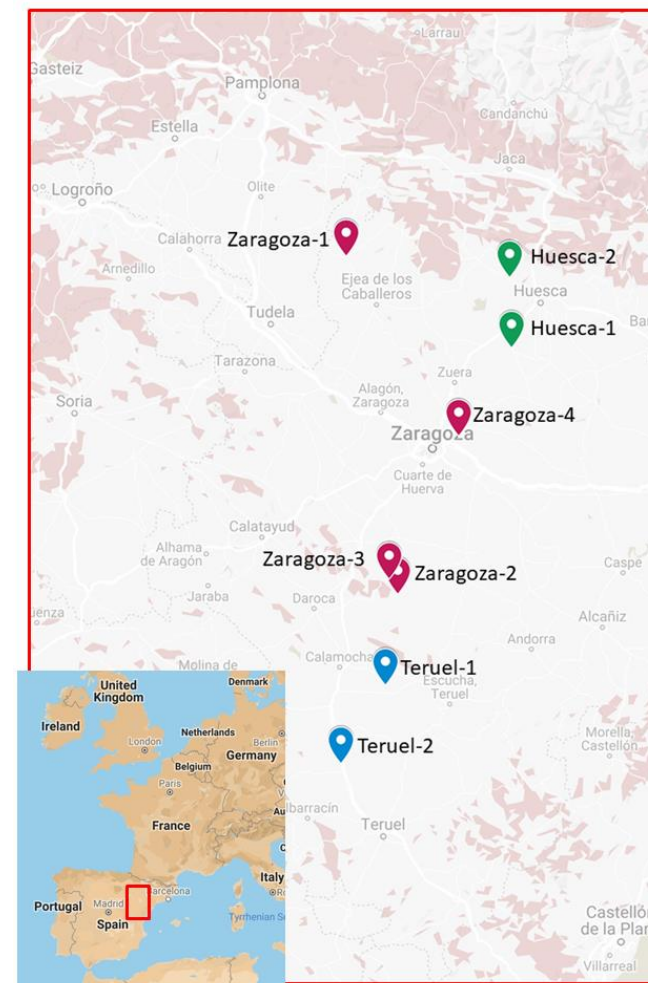
The transgenic murine line Tg338 was developed by H. Laude (Jouy-en-Josas, France) (Laude *et al.*, 2002) and is homozygous for the ovine *Prnp* gene, VRQ allele, expressing ovine VRQ PrP^C under the control of the ovine PrP promoter (Vilotte *et al.*, 2001). The level of expression of this line is between 8 and 10-fold that of sheep brain. This line was provided by O. Andréoletti from ENVT-INRA (Toulouse, France) and was maintained and bred in our facilities.

All experimental procedures in this study were approved by the Ethics Committee for Animal Testing of the University of Zaragoza (permit number PI19/14) and performed in accordance with the recommendations for the care and use of experimental animals and in agreement with national law (RD 1201/05).

Intracerebral inoculation. A dose of 20 µl/animal of each inoculum was administered by the intracerebral route to groups of six mice using a precision syringe and under general anesthesia. Animals were provided adequate analgesia after the procedure and were caged together.

Table 1. Clinical stage, clinical signs, genotype, age at sacrifice and geographical origin of sheep included in the study, and references of the inocula prepared from their tissues.

ID	Clinical stage	Clinical signs	Genotype	Age at sacrifice (years)	Geographical origin	Inocula
Sheep #1	Terminal	Cachexia, muscle wasting	ARQ/ARQ	5.5	Zaragoza-1	1N
						1L
Sheep #2	Terminal	Cachexia, ataxia, alopecia	ARQ/ARQ	6.5	Zaragoza-2	2N
						2L
Sheep #3	Terminal	Cachexia, ataxia, hyperexcitation	ARQ/ARQ	5	Zaragoza-3	3N
						3L
Sheep #4	Terminal	Cachexia, ataxia, alopecia	ARQ/ARQ	4	Huesca-1	4N
						4L
Sheep #5	Terminal	Apathy, ataxia, teeth grinding	ARQ/ARQ	5.6	Teruel-1	5N
						5L
Sheep #6	Terminal	Cachexia, ataxia	ARQ/ARQ	7	Teruel-2	6N
						6L
Sheep #7	Preclinical	Poor general condition	ARQ/ARQ	3.5	Zaragoza-4	7N
						7L
Sheep #8	Preclinical	No signs	ARQ/ARQ	1.5	Zaragoza-4	-
						8L
Sheep #9	Preclinical	Local alopecia	ARQ/ARQ	4.5	Huesca-2	9N
						9L
Sheep #10	Preclinical	No signs	ARQ/ARQ	1	Zaragoza-4	-
						10L



Bioassay. Animals were monitored three times per week for clinical signs of prion disease. When the end point criteria were met, animals were sacrificed by cervical dislocation under heavy anesthesia. Brain and spinal cord were harvested and stored in a 10% formalin solution and at -80°C for histopathological and biochemical analyses, respectively.

Western blotting was performed following a protocol based on TeSeE Western Blot kit (Bio-Rad). Briefly, medulla oblongata and mesenteric lymph node samples from sheep and spinal cord pools from diseased mice were thawed and homogenized in a detergent-containing solution. A volume of 200 µl was submitted to proteinase K digestion for 10 min, which was stopped using a β-mercaptoethanol-containing stop buffer, followed by concentration, clarification and resuspension of the remaining PrP^{res} in 30 µl of Laemli loading buffer. It was then subjected to SDS-PAGE electrophoresis using commercial 12% Bis-Tris gels (Bio-Rad), followed by transference to a PVDF membrane with 0.20-µm pore diameter (Bio-Rad). Immunoblot was performed by sequentially immersing the membrane in a blocking solution (0.2% BSA in PBS + Tween 0.1%), primary anti-PrP antibody Sha31 diluted 1:8,000 in PBS + Tween 0.1%, and HRP-conjugated secondary antibody diluted 1:5,000 in PBS + Tween 0.1%. Finally, membranes were developed by incubation with a luminol-based substrate (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate).

Tissue processing. Brain and lymph node samples from sheep and brains from diseased mice were fixed in a 10% formalin solution for at least 48 hours before being processed. Mouse brains were trimmed in four sections following Fraser and Dickinson's protocol (Fraser & Dickinson, 1968), while sheep tissues were processed as usual (Gonzalez *et al.*, 2002). Tissues were then embedded in paraffin wax and mounted in histological cassettes. Four µm-thick sections were obtained using a microtome and mounted on glass slides for subsequent histological procedures.

Haematoxylin and eosin (H&E) staining of the sections was performed following a standard protocol. Briefly, dewaxing and rehydration was performed by sequentially passing the preparations in xylene and graded alcohols, followed by incubation in a haematoxylin solution. After rinsing with tap water, preparations were subjected to incubation in acid alcohol (1% acetic acid in a 70% ethanol solution), followed by immersion in an eosin solution. Finally, preparations were dehydrated and mounted prior to visualization under light microscope.

Lesion profiling. H&E-stained brain samples from second-passage animals were inspected and spongiosis was measured in nine pre-determined grey matter areas following a standardized protocol (Fraser & Dickinson, 1968). The areas were: 1) dorsal medullar nuclei, 2) cerebellar cortex, 3) superior colliculus of the mesencephalon, 4) hypothalamus, 5) thalamus, 6) hippocampus, 7) lateral septal nuclei, 8) cerebral cortex

at the level of the thalamus and 9) frontal cortex. Semiquantitative scores from 0 (no vacuolization) to 5 (very abundant and confluent vacuoles) were given to each area. Mean values at each area were plotted to trace lesion profiles for each inoculum. In addition, a new parameter termed “average vacuolization score” was computed for each inoculum and murine line as the mean of scores in all brain areas of mice from each infected group, and expressed as a proportion over 5.

Immunohistochemistry was applied to brain and lymph node samples from sheep and brain sections from mice. After dewaxing and rehydration, three different pre-treatments for antigen retrieval were performed sequentially: immersion in 98% formic acid for 15 min, treatment with 4 µg/ml proteinase K for 15 min at 37°C, and hydrated autoclaving in citrate buffer at 96°C for 20 min. Following antigen retrieval, endogen peroxidase activity was blocked using a commercial blocking solution, followed by 1-hour incubation with primary anti-PrP antibody L42 (1:500, SPI-Bio) for sheep tissues or SAF84 (1:1,000, SPI-Bio) for mice brains. The EnVision+ System (Agilent Dako) was used as the secondary antibody, and the DAB+ System (Agilent Dako), based on the use of 3,3'-diaminobenzidine (DAB) as chromogen, was employed for development.

Paraffin-embedded tissue-blot (PET-blot). PET-blot was performed as described elsewhere (Schulz-Schaeffer *et al.*, 2000) on mice brain samples. Briefly, 4-µm paraffin-embedded brain sections were collected onto a nitrocellulose membrane and dried at 37°C for 24 hours. Membranes were then subjected to dewaxing and rehydration and incubated for 2 hours in a solution of proteinase K (250 µg/ml) at 56°C to completely digest PrP^C. Denaturation of the remaining PrP^{res} was achieved by incubating the membranes in a solution of guanidine thiocyanate 3M. After blocking the membrane with 0.2% BSA to avoid cross-reactivity, detection was carried out through sequential incubation with the anti-PrP antibody Sha31 (1:8,000, SPI-Bio) and a secondary alkaline phosphatase (AP)-conjugated antibody (1:500, Agilent Dako), followed by development with NBT/BCIP (Thermo Scientific). Membranes were then washed and dried for 24 hours at room temperature.

Results

Biochemical characterization of nervous and lymphoid tissue sheep scrapie field isolates discloses different biochemical patterns

Medulla oblongata of sheep #1-#7 and #9 were positive on Western blot for PrP^{res} and showed a banding pattern with the non-glycosylated (NG) bands at around 19 kDa and predominance of diglycosylated (DG) species (**Figure 1A**). These features resemble

those of the experimental isolate CH1641 (Hope *et al.*, 1999), natural CH1641-like isolates from field cases (Baron & Biacabe, 2007; Bencsik & Baron, 2011) and other natural sources found in the Spain-France-Andorra transboundary territories (Cassard *et al.*, 2014).

In contrast, medulla oblongata of sheep #8 and #10 were negative on Western blot (**Fig. 1A**). Since this is likely to be associated with reduced infective titers, they were not used in bioassay.

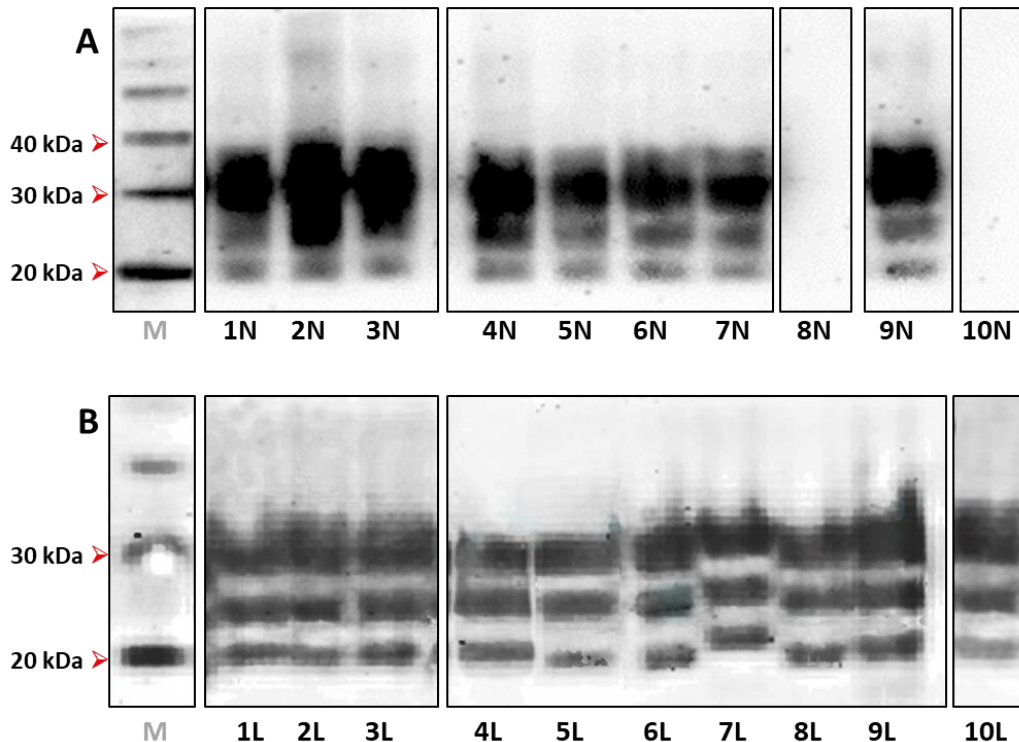


Figure 1. Western blot of inocula sourced from sheep tissues. A) inocula from medulla oblongata; B) inocula from mesenteric lymph node. *M*: molecular weight marker.

The presence of PrP^{res} in the lymphoreticular system was demonstrated by Western blot of mesenteric lymph nodes from all sheep (**Fig. 1B**). All but one showed banding patterns with the NG band at around 19 kDa. In contrast, inocula 7L showed a different biochemical profile characterized by a NG band with higher weight (~21 kDa), suggesting the presence of a different PrP^{Sc} conformer. 21-kDa PrP^{res} banding patterns have been commonly observed in the most widely used types of experimental scrapie, including SSBP/1 and Dawson isolates (Beringue *et al.*, 2008; Beringue *et al.*, 2008; Hill *et al.*, 1998; Hope *et al.*, 1999; Hope *et al.*, 1999; Thorne *et al.*, 2012; Thorne *et al.*, 2012), and in several natural scrapie cases (Cassard *et al.*, 2014).

The presence of different biochemical signatures among our isolates suggests some degree of variability in the prion agent they bear. However, to accurately assess the

actual range of prion variants present in our inocula, the disease phenotype in mice needs to be analyzed.

Bioassay in sheep PrP^C-expressing transgenic mice suggest the presence of more than one prion variant

Survival periods and attack rates of first and second-passage TgShp XI and Tg338 mice and banding patterns of second-passage spinal cord pools are presented in **Table 2**.

A majority of brain-derived inocula (1N, 2N, 6N, 7N and 9N) produced clinical disease with accumulation of 19-kDa PrP^{res} in spinal cord of both TgShp XI and Tg338 mice (**Fig. 2A and 3A**). Survival periods ranged from 196 to 381 dpi on first passage and from 183 to 239 dpi on second passage TgShp XI mice. Tg338 mice succumbed to disease showing survival periods between 150 and 590 dpi in first passage and 175-200 dpi on second passage. The wide variability observed in the survival period on first passage may be explained by differences in infective titer among inocula prepared from brains of sheep in the terminal stage (1N, 2N and 6N) and those sourced from preclinical sheep (7N and 9N). In contrast, the reduction of survival periods observed on second passage reflects accumulation of infectivity in the spinal cord of first-passage mice, although to a variable extent.

The rest of brain-derived inocula (3N, 4N and 5N) behaved similarly to the former in Tg338, which showed 19-kDa banding patterns (**Fig. 3A**) and survival times between 313 and 327 dpi that shortened to 163-199 dpi on second passage, suggesting the propagation of the same prion variant. In TgShp XI, these isolates caused similar or subtly longer survival periods in first (235-305 dpi) and second passage (240-312 dpi). However, the biochemical profile in these mice was characterized by an unglycosylated band at 21-kDa (**Fig. 2A**). This suggests the presence of minor quantities of a 21-kDa prion conformer, undetectable in the original isolates, that is preferentially amplified by the TgShp XI line.

Table 2. Banding patterns of source sheep tissues and survival periods, attack rates and banding patterns of experimentally challenged first and second-passaged TgShp XI and Tg338 mice. Survival period provided as mean \pm standard deviation (SD).

Inoculum	Sheep Banding pattern	TgShp XI					Tg338				
		1 st passage		2 nd passage			1 st passage		2 nd passage		
		Survival period	Attack rate	Survival period	Attack rate	Banding pattern	Survival period	Attack rate	Survival period	Attack rate	Banding pattern
1N	19 kDa	196 \pm 12	5/5	239 \pm 56	5/5	19 kDa	150 \pm 7	6/6	185 \pm 27	6/6	19 kDa
2N	19 kDa	213 \pm 16	6/6	226 \pm 68	6/6	19 kDa	179 \pm 41	5/5	175 \pm 29	6/6	19 kDa
3N	19 kDa	305 \pm 62	5/5	312 \pm 78	5/5	21 kDa	313 \pm 110	4/5	199 \pm 36	5/5	19 kDa
4N	19 kDa	273 \pm 57	6/6	249 \pm 50	3/3	21 kDa	327 \pm 163	6/6	195 \pm 30	6/6	19 kDa
5N	19 kDa	235 \pm 13	6/6	240 \pm 44	5/5	21 kDa	324 \pm 48	5/5	163 \pm 5	6/6	19 kDa
6N	19 kDa	256 \pm 57	6/6	202 \pm 14	5/5	19 kDa	222 \pm 82	6/6	200 \pm 58	5/5	19 kDa
7N	19 kDa	346 \pm 5	5/5	190 \pm 47	4/4	19 kDa	590 \pm 58	6/6	189 \pm 36	6/6	19 kDa
9N	19 kDa	381 \pm 35	4/4	183 \pm 13	6/6	19 kDa	551 \pm 48	6/6	188 \pm 37	6/6	19 kDa
1L	19 kDa	455 \pm 30	6/6	273 \pm 118	12/12	19 kDa	352 \pm 22	6/6	231 \pm 47	6/6	19 kDa
2L	19 kDa	454 \pm 140	4/4	207 \pm 96	5/5	19 kDa	419\pm45	6/6	646\pm35	5/6	21 kDa
3L	19 kDa	425 \pm 83	4/4	330 \pm 0	4/4	19 kDa	491 \pm 69	4/5	249 \pm 26	5/5	19 kDa
4L	19 kDa	443 \pm 22	3/3	203 \pm 65	6/6	19 kDa	503\pm77	6/6	490\pm110	3/6	-
5L	19 kDa	314 \pm 36	5/5	171 \pm 20	6/6	19 kDa	528\pm29	6/6	481\pm159	3/5	-
6L	19 kDa	489 \pm 80	5/5	276 \pm 82	6/6	19 kDa	644\pm141	5/5	637\pm4	7/7	21 kDa
7L	21 kDa	487 \pm 38	4/4	241 \pm 54	5/5	21 kDa	431 \pm 44	4/4	195 \pm 31	6/6	19 kDa
8L	19 kDa	422 \pm 90	6/6	175 \pm 58	4/4	19 kDa	579\pm118	4/4	600\pm40	5/5	21 kDa
9L	19 kDa	510 \pm 63	4/4	163 \pm 64	3/3	19 kDa	436 \pm 103	6/6	201 \pm 46	6/6	19 kDa
10L	19 kDa	451 \pm 78	5/5	321 \pm 23	3/3	19 kDa	487 \pm 81	4/4	163 \pm 7	6/6	19 kDa

Regarding lymph node-derived inocula, all but one had a single pattern of transmission to TgShp XI mice characterized by long survival periods on first passage (314-510 dpi) that shortened to 163-330 dpi on second passage, and accumulation of 19-kDa PrP^{res} in their spinal cord (**Fig. 2B**). In contrast, inoculum 7L transmitted with similar survival periods (241 dpi on second passage) but, alternatively, triggered 21-kDa PrP^{res} deposition in mice (**Fig. 2B**), mirroring that of the original isolate (**Fig. 1B**). Long and variable survival periods on first passage reflect low infectivity titers in lymph node-derived isolates, while again, accumulation of infectivity in the spinal cord of first-passage mice accounts for the reduction seen on second passage.

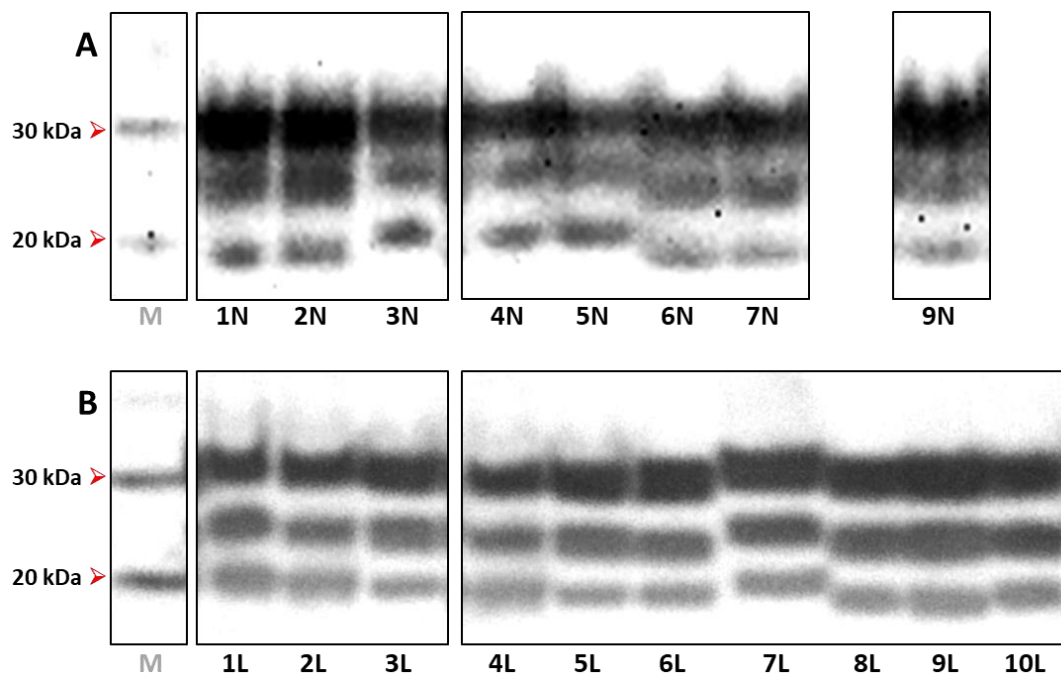


Figure 2. Western blot of spinal cord homogenates from second-passage TgShp XI mice experimentally challenged with A) sheep brain-derived isolates and B) sheep lymph node-derived isolates. Note that most samples had banding patterns with the non-glycosylated (NG) band at 19 kDa, while those of inocula 3N, 4N, 5N and 7L were at 21 kDa.

Five of these inocula (1L, 3L, 7L, 9L and 10L) transmitted to Tg338 with second-passage survival periods ranging from 163 to 249 dpi. Presence of 19-kDa PrP^{res} was noted in spinal cords of both passages (**Fig. 3B**), even in the case of inoculum 7L, which showed a 21-kDa banding pattern and produced 21-kDa PrP^{res} deposition in TgShp XI. The characteristics of these isolates in Tg338 agreed with those of brain-sourced isolates, suggesting that they contain the same type of agent.

In contrast, the other five isolates (2L, 4L, 5L, 6L and 8L) transmitted to Tg338 showing unusual transmission characteristics. Longer survival periods were observed in first passage (419-644 dpi) which experienced no reduction or even considerable lengthening on second passage (481-646 dpi). In a number of occasions, even the attack rate was reduced in the second passage, suggesting incomplete and variable

accumulation of infectivity in the spinal cord of first-passage animals. Supporting this notion, Tg338 mice from both first and second passages accumulated reduced quantities of PrP^{res} in spinal cord as demonstrated by the negative results on Western blot of spinal cord homogenates from animals infected with inocula 4L and 5L (**Fig 3B**). Surprisingly, in the rest of cases (inocula 2L, 6L and 8L), animals accumulated a PrP^{res} with a 21-kDa banding pattern (**Fig 3B**), which provides further evidence for the propagation of a different conformer in this mice.

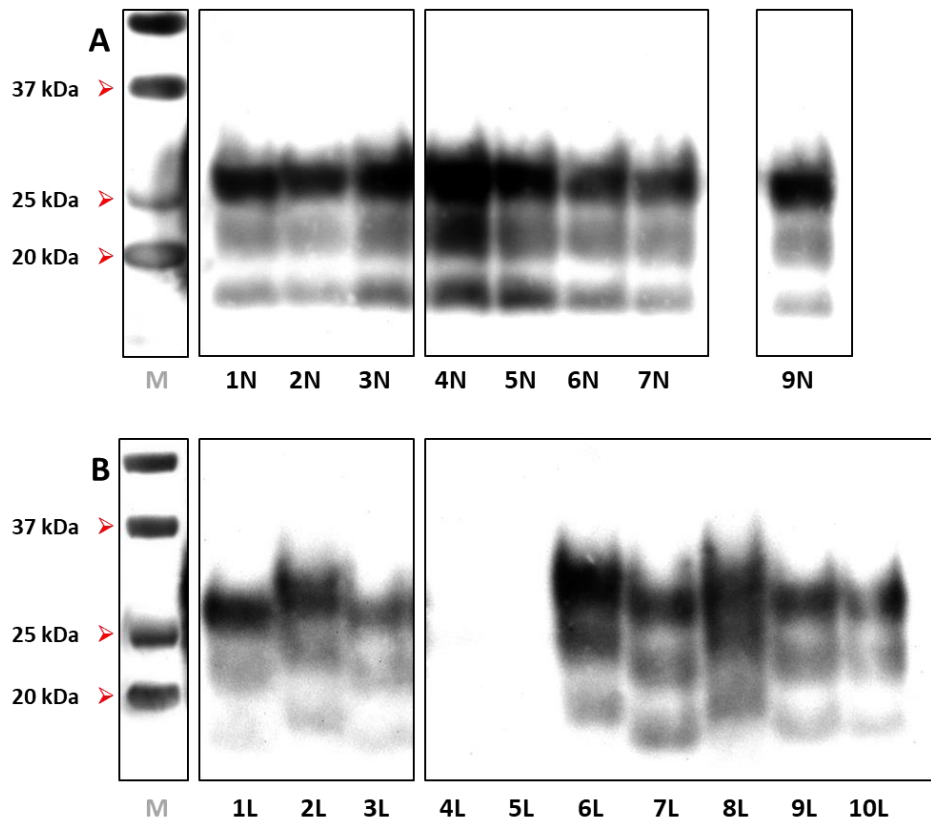
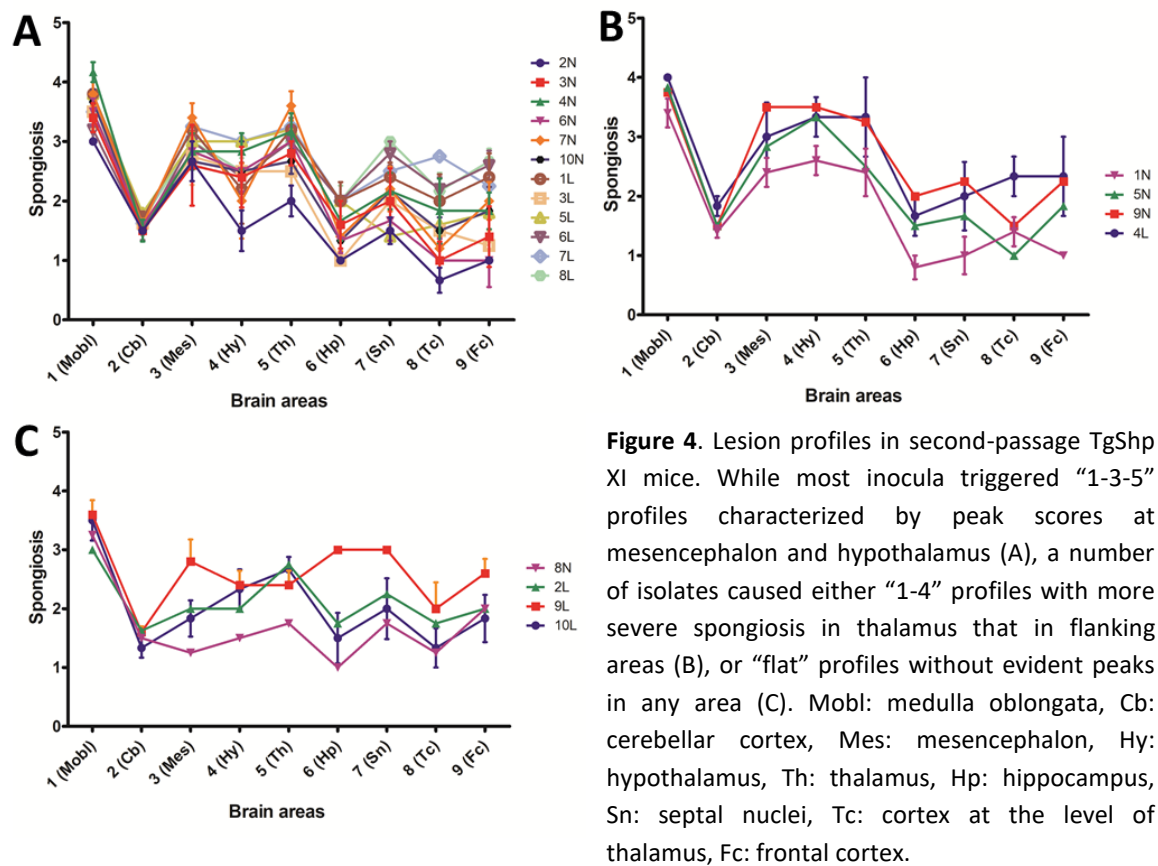


Figure 3. Western blot of spinal cord homogenates from second-passage Tg338 mice experimentally challenged with A) sheep brain-derived isolates and B) sheep lymph node-derived isolates. Note that 13/18 samples were clearly positive with non-glycosylated bands at 19 kDa. 5/18 samples differed from this, either being negative (4L and 5L) or having NG bands at 21 kDa (2L, 6L and 8L).

According to transmission patterns and biochemical signatures of the accumulated PrP^{res}, the presence of three PrP^{Sc} variants can be envisioned: i) a 19-kDa variant, present as the major component of the majority of sheep-sourced inocula, which we termed “19K”; ii) a 21-kDa conformer that appears as the major isoform in inoculum 7L and as a minor component in other three isolates, and that causes disease in TgShp XI with transmission patterns similar to the 19-kDa variant, hereafter termed “21K-TgShp XI”; and iii) a 21-kDa conformer, different from the former, that seems to block the propagation of the 19-kDa major component exclusively in Tg338 mice, triggering reduced PrP^{Sc} accumulation in spinal cord and protracting clinical disease, and termed “21K-Tg338”.

Mice brains show distinct histopathological hallmarks

The characteristics of spongiform change in both transgenic models were fairly similar. Medulla oblongata, ventral mesencephalon and specific zones within diencephalon (*zona incerta* and ventrolateral nuclei) showed invariably the most severe spongiosis. In sharp contrast, vacuoles in cerebellar cortex were usually absent or very scarce. Cortex of superior colliculus and central regions of thalamus (*masa intermedia*) suffered a milder vacuolization. In hypothalamus, striatum and septal nuclei, the degree of spongiosis was highly variable among infected mice groups. Finally, frontal and temporo-parietal cortices and hippocampal formation were poorly affected.



Lesion profiles were drawn for each inoculum and murine line. In most cases, curves fitted to a general profile characterized by high scores at brainstem and subcortical structures (medulla oblongata, mesencephalon, diencephalon and basal telencephalon), moderate scores in cerebral cortices and hippocampus, and low scores in cerebellar cortex. Differences between patterns focused mainly at the level of hypothalamus (area 4), since a number of profiles were characterized by higher scores at this area than in flanking regions (mesencephalon, area 3 and thalamus, area 5), while others showed peaks in the latter areas. These two patterns were termed “1-4”

and “1-3-5”, respectively. In a number of cases, patterns showing similar scores in all areas were observed and termed “flat” profiles.

The predominant lesion profile in TgShp XI mice was the “1-3-5” pattern (**Fig. 4A**), although a number of inocula triggered “1-4” (**Fig. 4B**) or “flat” profiles (**Fig. 4C**). Average vacuolization scores were between 1.65/5 and 2.68/5. There was no correlation between type of profile and average vacuolization scores.

In contrast, most of second-passage Tg338 groups showed a “1-4” pattern with average vacuolization scores between 1.82/5 and 2.41/5 (**Fig. 5A**). Fewer Tg338 mice showed “1-3-5” or “flat” profiles (**Fig. 5B**) with notoriously lower average scores (between 0.70/5 and 1.49/5). Interestingly, the isolates showing this behavior (2L, 4L, 5L, 6L and 8L) agreed with those causing longer survival periods and absence or 21-kDa PrP^{res} deposition in the spinal cord.

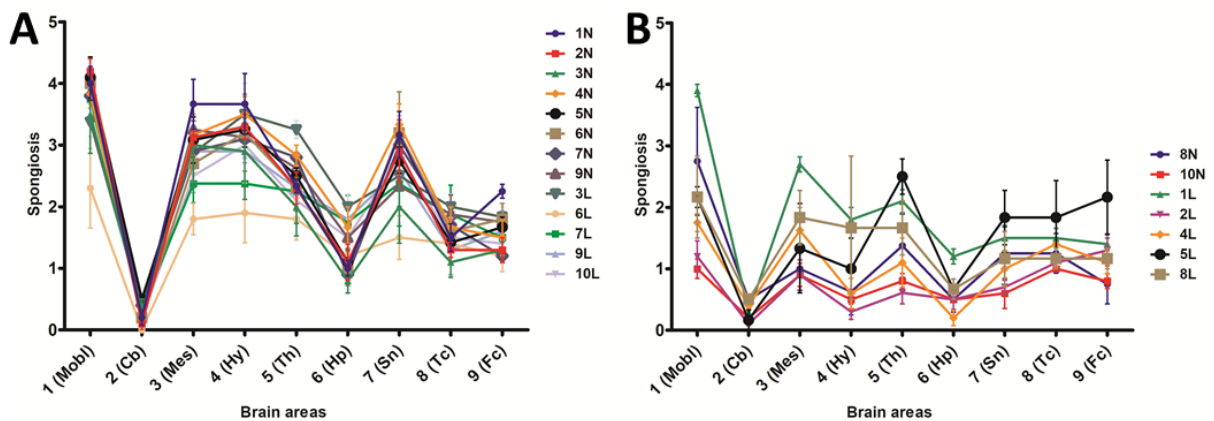


Figure 5. Lesion profiles in second-passage Tg338 mice. Most isolates provoked lesion profiles characterized by peaks at medulla oblongata and thalamus, with scores at mesencephalon and hypothalamus being lower or similar to that of thalamus (“1-4” profiles) (A). However, a number of isolates, which agreed with those causing long survival periods in both first and second-passage Tg338, triggered “1-3-5” and “flat” profiles with significantly lower average vacuolization scores (B). Mobl: medulla oblongata, Cb: cerebellar cortex, Mes: mesencephalon, Hy: hypothalamus, Th: thalamus, Hp: hippocampus, Sn: septal nuclei, Tc: cortex at the level of thalamus, Fc: frontal cortex.

PrP^{Sc} distribution was assessed using PET-blot. TgShp XI mice showed in general lower staining intensity in comparison with Tg338 mice. Although no differences were found in the characteristics of spongiform change or in lesion profiles, obvious differences were observed in PrP^{Sc} distribution among TgShp XI mice. Two trends of PrP^{Sc} deposition could be differentiated.

The first pattern was a generalized, widespread low-intensity immunostaining (**Fig. 6A, B, C**), which correlated with synaptic deposits in IHC and was more intense in medulla oblongata (and occasionally deep cerebellar nuclei), the whole mesencephalon, specific regions of thalamus (medial and lateral nuclei and *zona incerta*), hypothalamus

and septal area. The second pattern consisted of localized high-intensity, plaque-like deposits, which were found frequently associated to the alveus of hippocampus (**Figure 6B, D**) and subependymal areas at the level of 3rd and 4th ventricles (**Figure 6D,**), and correlated with coarse particulate/coalescing deposits in IHC (**Fig. 6E**).

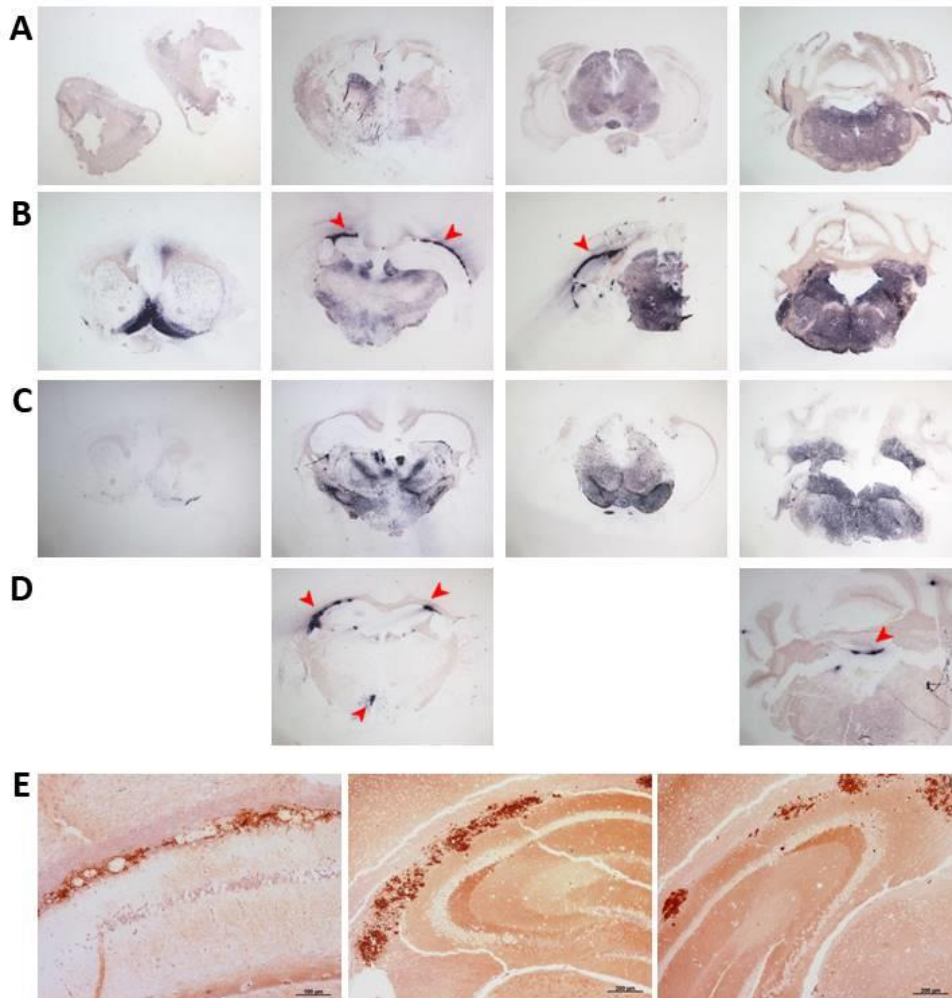


Figure 6. PET-blot and immunohistochemistry of representative brain sections from TgShp XI mice infected with inocula 2N (A), 3N (B), 7L (C) and 8L (D). Two different trends of PrP^{Sc} accumulation were observed on PET-blots: a generalized low-intensity immunostaining (A, B, C), and a localized high-intensity pattern, usually associated with the alveus of hippocampus (B, D, arrowheads), and subependymal areas (D, arrowheads), and which correlated with coarse/coalescing plaque-like deposits on immunostochemistry (E).

PrP^{Sc} deposits in the brains of Tg338 mice were mostly of the generalized or synaptic type. The distribution pattern was characterized by high staining intensities of brainstem and subcortical areas. Medulla oblongata and deep cerebellar nuclei, mesencephalon, medial and dorsal nuclei of thalamus and *zona incerta*, and

hypothalamus were the most affected zones (**Fig. 7**). A clear correlation between the distribution of spongiform lesions and PrP^{Sc} deposits was observed.

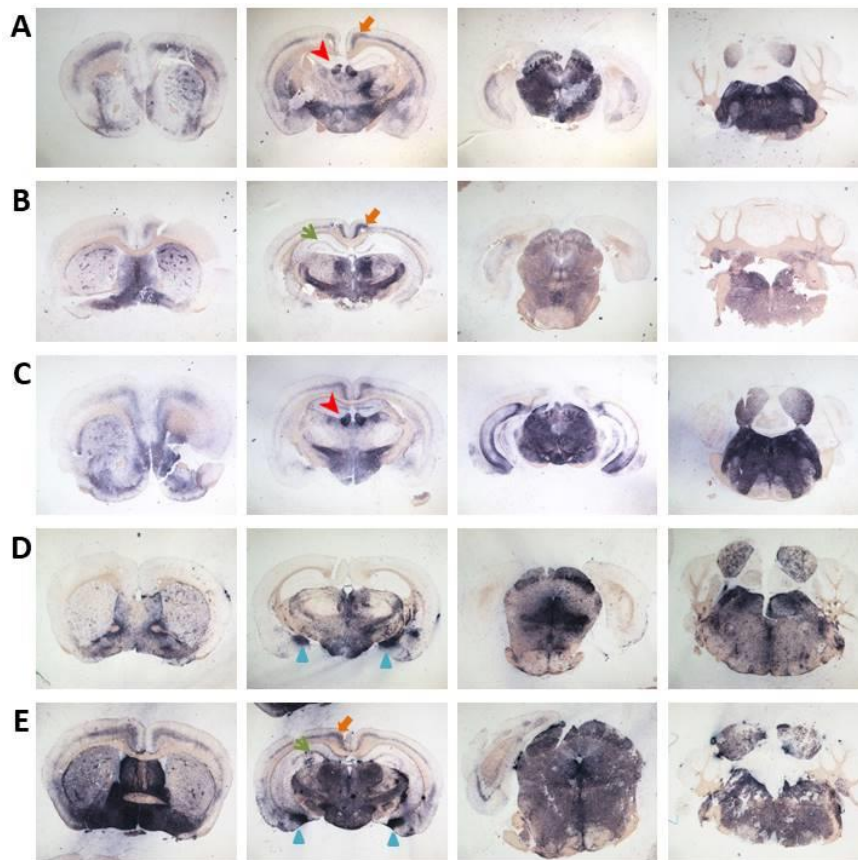


Figure 7. PET-blot images of representative brain sections from Tg338 mice infected with inocula 1L (A), 3L (B), 7L (C) and 8L (D, E). A general pattern arose in all examined brain samples consisting of intense staining of brainstem and subcortical areas. Additionally, conspicuous immunostaining was observed in specific structures, including the cingulate gyrus (A, B, E; thick orange arrows), habenular nuclei (A, C; red arrowheads), and the *stratum lacunosum-moleculare* and the alveus of hippocampus (B, E; thin green arrows). High-intensity staining of the medial amygdaloid nuclei (D, E; blue triangles) was observed in a subset of samples obtained from animals challenged with isolates causing prolonged survival periods and low vacuolization scores.

In addition, mild to intense staining was observed in specific structures within these areas and in other areas not comprised by them, including a) a deep grey matter layer of the neocortex, corresponding to the cingulate gyrus (**Fig. 7A, B, E**), b) habenular nuclei (**Fig. 7A, C**), and c) *stratum lacunosum-moleculare* and alveus in hippocampus (**Fig. 7B, E**).

Additionally, intense immunostaining of medial amygdaloid nuclei (**Fig. 7D, E**), was observed exclusively in Tg338 inoculated with isolates 6L and 8L, which produced long survival periods and “1-3-5” lesion profiles with low average spongiosis.

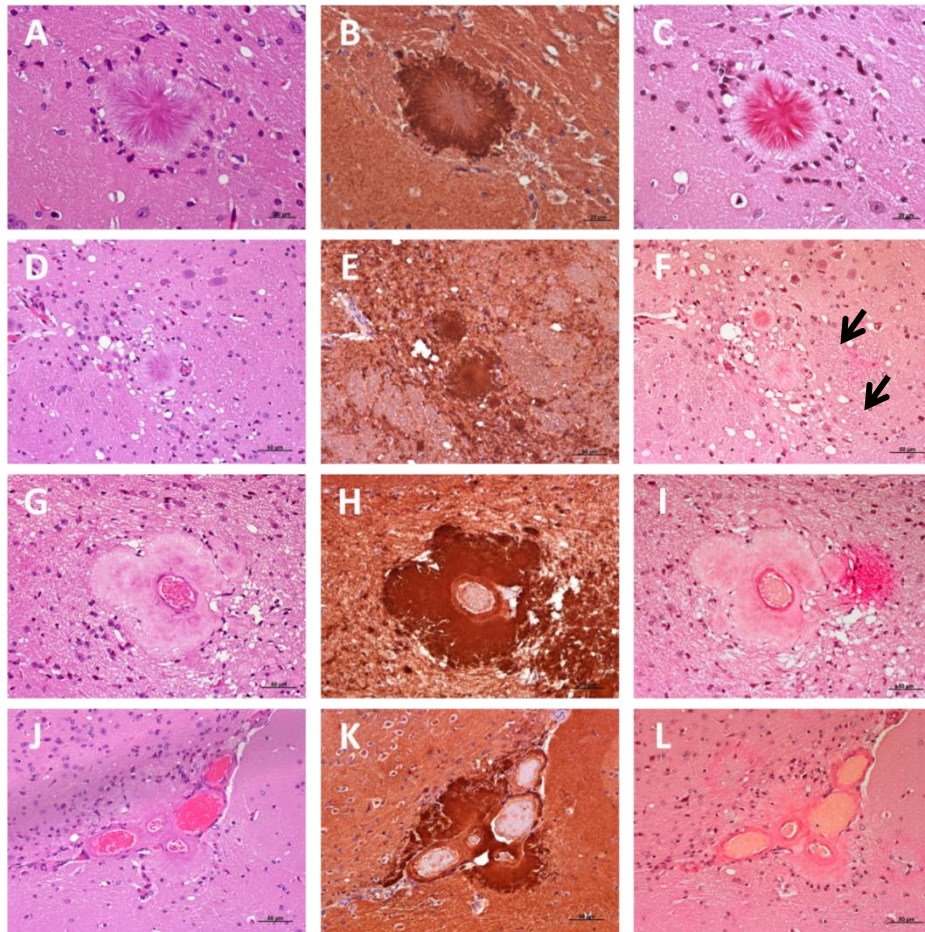


Figure 8. Unicentric (A to C), florid (D to F) and amorphous perivascular plaques (G to L) in brain of second-passage Tg338 mice infected with inocula 6L and 8L. Haematoxylin-eosin staining (A, D, G, J), immunohistochemistry with anti-PrP mAb SAF84 (B, E, H, K) and Congo red staining that proves the amyloid nature of the plaques (C, F, I, L).

These same inocula (6L and 8L) led to the formation of amyloid plaques in the brain of second-passage Tg338 mice. These plaques were already visible on PET-blot as granular plaque-like depositions at the level of thalamus and mesencephalon (**Fig. 7D, E**), but were clearly evidenced in haematoxylin and eosin (H&E)-stained slides (**Fig. 8A, D, G, J**). They were congophilic, which demonstrate their amyloid nature (**Fig. 8C, F, I, L**), and positive to immunohistochemistry with anti-PrP antibody SAF84 (**Fig. 8B, E, H, K**). Plaques were usually multicentric or amorphous and were found mostly in a perivascular location and lying beneath the pia mater of frontal, parietal and piriform cortices and cortex of the superior colliculus. In a number of animals, unicentric and occasionally florid plaques were found in the deep layers of medulla oblongata, mesencephalon, hypothalamus and thalamus. Interestingly, this phenotypic feature was not observed in TgShp XI mice.

Discussion

There is a wide basis of evidence that the characterization of scrapie strains based on data recorded directly from the ovine host is a difficult task (Jeffrey *et al.*, 2003; Jeffrey *et al.*, 2006). Differences in clinical signs of sheep or in lesion profiles and distribution of PrP^{Sc} deposits in their brains may not reflect the presence of different strains, since several uncontrolled factors are known to contribute to this heterogeneity, including age of infection, breed, intercurrent diseases and effects of currently unidentified genes. This problem has been routinely circumvented by bioassaying the isolates in genetically stable rodent models. The advent of transgenic murine lines expressing homologous PrP^C has allowed shedding light on the actual variability of scrapie prion strains, avoiding confounding effects exerted by strain selection/mutation phenomena in wild-type mice (Bencsik *et al.*, 2007; Bencsik *et al.*, 2007; Bruce *et al.*, 2002; Griffiths *et al.*, 2010; Griffiths *et al.*, 2010; Groschup *et al.*, 2007; Groschup *et al.*, 2007; Thackray *et al.*, 2008; Thackray *et al.*, 2008; Thackray *et al.*, 2011; Thackray *et al.*, 2011; Thackray *et al.*, 2012; Thackray *et al.*, 2012)..

In our experiment, sheep brains showed a remarkable homogeneity in banding patterns, all of them possessing non-glycosylated (NG) bands with molecular weights of around 19 kDa and a predominance of the diglycosylated (DG) species. This biochemical signature has been linked to the CH1641 isolates, but also to other unconventional isolates found in the field (Baron & Biacabe, 2007; Bencsik & Baron, 2011; Cassard *et al.*, 2014). On the other hand, PrP^{res} in isolates prepared from mesenteric lymph nodes reproduced the same pattern in almost all cases; the only exception was isolate 7L, whose NG band had a molecular weight of 21 kDa.

Concerning transmission properties, most isolates showed survival periods always shorter than 330 dpi on second passage. In contrast, a number of inocula (2L, 4L, 5L, 6L and 8L) triggered very protracted survival periods (longer than 481 dpi) and absence of evident reductions on second passage in the Tg388 line. Regardless of whether this difference was caused by reduced accumulation of infectivity in spinal cord of first-passage mice or because it as an intrinsically longer survival period, it suggests the existence of a different strain in this group of samples.

Regarding banding patterns, nonequivalent results were found between TgShp XI and Tg338 lines. TgShp XI mice accumulated high (21-kDa) PrP^{res} in spinal cord after the inoculation of isolates 3N, 4N, 5N and 7L, although only one of these (inoculum 7L) displayed this high-molecular weight banding pattern. The prion variant propagated in these cases has been termed “21K-Shp” and did not correlate with other differential phenotypic features such as lesion profiles, vacuolization scores, or PrP^{Sc} distribution patterns.

Another group of isolates (2L, 4L, 5L, 6L and 8L) triggered no accumulation or accumulation of a 21-kDa isoform exclusively in second-passage Tg338 mice. Notably, these same isolates caused long survival periods, milder spongiosis, flatter lesion profiles and, in a number of cases, a characteristic immunostaining of lateral amygdaloid nuclei and presence of PrP amyloid plaques in Tg338 mice. The combination of these differential features allows proposing that a distinct prion conformer, here referred to as “21K-338”, has been propagated in these cases. Upon comparison with other studies, the behavior of this prion variant resembled that of the scrapie source that caused several outbreaks in Italy in the 90s following a iatrogenic infection with a vaccine against *Mycoplasma agalactiae* (Agrimi *et al.*, 1999; Beringue *et al.*, 2006; Caramelli *et al.*, 2001; Zanusso *et al.*, 2003), including the accumulation of PrP plaques with a distribution similar to what we observed (Beringue *et al.*, 2006). In other study, an isolate coded MF17, whose properties resemble those of Italian scrapie (O. Andréoletti, unpublished observations), demonstrated zoonotic potential as it was able to infect transgenic mice expressing human PrP^C (Cassard *et al.*, 2014). Studies are underway to determine if the coincidence of phenotypic traits is enough to endorse our inocula with zoonotic capability.

In the rest of cases, a 19-kDa conformer, likely corresponding to the one predominating in most of the original sheep isolates, was propagated and termed “19K”. Importantly, both murine lines were able to propagate this conformer. The phenotype associated to this form of the agent resembled that of CH1641-like isolates (Baron & Biacabe, 2007; Gonzalez *et al.*, 2015; Hope *et al.*, 1999; Simmons *et al.*, 2015). CH1641 scrapie is associated with a PrP^{res} banding pattern with low (19-20 kDa) NG species and possesses distinctive biological properties. In natural cases, it causes longer incubation periods in sheep with the s7 allele of the *Sip* (*Prnp*) gene and shorter in sheep with the p7 allele, contrary to the more common scrapie sources studied, including SSBP/1 (Foster & Dickinson, 1988). Contrary to other classical scrapie sources, the original, prototypic CH1641 source does not transmit to wild type mice (Foster & Dickinson, 1988). However, it does transmit without apparent difficulties to transgenic mice expressing ovine PrP^C, which replicate the PrP^{res} banding pattern of the source inocula (Baron & Biacabe, 2007), in agreement with our own results. Due to its biochemical features, these isolates were suspected to contain BSE infectivity (Hope *et al.*, 1999), although this was later discarded. To date, this type of scrapie has not been attributed a zoonotic potential (Cassard *et al.*, 2014), O. Andréoletti, unpublished observations).

Considering the classification showed in **Table 3**, all studied isolates seemed to contain the “19K” component, since in all cases at least one of the transgenic lines reproduced the phenotype associated to this isoform. However, TgShp XI propagated the “21K-Shp” component when a number of brain-derived isolates and one lymph node-derived isolate were used. The fact that not all isolates induced the propagation of this

variant indicates that the “21K-Shp” component preexisted in these inocula and was not generated *de novo*. The reason why Tg338 mice were unresponsive to the presence of “21K-Shp” prions and manifested solely the phenotype associated to the major “19K” component remains unresolved.

Table 3. Overview of prion variants propagated from nervous and lymphoid tissues of sheep

Sheep	NERVOUS TISSUE		LYMPHOID TISSUE	
	AGENT PROPAGATED IN TgShp XI	AGENT PROPAGATED IN Tg338	AGENT PROPAGATED IN TgShp XI	AGENT PROPAGATED IN Tg339
Sheep 1	"19K"	"19K"	"19K"	"19K"
Sheep 2	"19K"	"19K"	"19K"	"21K-338"
Sheep 3	"21K-Shp"	"19K"	"19K"	"19K"
Sheep 4	"21K-Shp"	"19K"	"19K"	"21K-338"
Sheep 5	"21K-Shp"	"19K"	"19K"	"21K-338"
Sheep 6	"19K"	"19K"	"19K"	"21K-338"
Sheep 7	"19K"	"19K"	"21K-Shp"	"19K"
Sheep 8	-	-	"19K"	"21K-338"
Sheep 9	"19K"	"19K"	"19K"	"19K"
Sheep 10	-	-	"19K"	"19K"

In contrast, half of the lymph node-derived inocula provoked in Tg338 mice a characteristic phenotype that was associated with the propagation of the “21K-338” isoform, which probably preexisted in these inocula as a minor component. This conformer is somehow able to intercept the propagation of the major “19K” component exclusively in Tg338 mice, strongly protracting survival periods and triggering less severe neuropathology. This interception may be mediated by the formation of PrP amyloid plaques, as observed in previous studies with the Italian isolate (Beringue *et al.*, 2006) and in this study for inocula 6L and 8L. According to some authors, amyloidogenesis may comprise a defensive system by means of which toxic small PrP oligomers (Collinge & Clarke, 2007; Hill *et al.*, 2000; Hill & Collinge, 2003) are sequestered into bigger structures, thus delaying or restraining the neurotoxicity caused by prion progression (Chesebro *et al.*, 2005; Piccardo *et al.*, 2007; Tuzi *et al.*, 2008).

Interestingly, the “21k-Tg338” component was only found in lymphoid tissues from sheep. It is widely accepted that, during oral infection, scrapie prions invade the gut-associated lymphoid tissue and progressively extend to the rest of the LRS (Andreoletti *et al.*, 2000; Heggebo *et al.*, 2000). During this process, the LRS may favor the propagation of specific prion conformers, different from the isoforms that later invade the nervous system. This phenomenon has been observed also in ovinised mice whose brain and spleen accumulated PrP^{Sc} with differential banding patterns and biological

properties (Beringue *et al.*, 2012). This situation is reminiscent of the case of humanized transgenic mice inoculated with variant CJD (vCJD) prions that developed a disease phenotype compatible with sporadic CJD (sCJD), but still accumulated vCJD PrP^{Sc} in their spleens (Beringue, Le Dur *et al.*, 2008).

Nevertheless, the reasons why brain and lymphoid organs propagate distinct prion conformers have not been clarified. It has been proposed that differences in the glycosylation of the PrP^C between these two tissues (Katorcha *et al.*, 2014) may be involved in the selection of PrP^{Sc} isoforms with specific glycoform ratios. A recent study (Le Dur *et al.*, 2017) suggests an alternative mechanism based on differences in PrP^C expression level.

In any case, our results indicate that in natural scrapie cases, sheep can be infected with more than one strain. These distinct variants of the agent can be located in different organs (we assessed nervous and lymphoid tissues), or even coexist in the nervous system as prion mixtures with a dominant conformer and one or more subdominant isoforms, that can be detected only by bioassay in sensitive rodent models or other *in vitro* techniques. In fact, according to our results, the coinfection seems to be more frequent than the infection with a single strain.

The notion that natural scrapie cases may be caused by mixtures of substrains is not new. There are many precedents in the literature: i) when a methodology that separate short and long-incubation period strains was employed, natural scrapie isolates were found to contain a mixture of strains that could be isolated in different lines of wild type mice (Thackray, Lockey *et al.*, 2012). ii) When several wild-type and transgenic lines were used in a bioassay to investigate a number of scrapie isolates suspected to contain BSE infectivity, different results with lines TgShp XI and Tg338 were obtained, which suggest that different strains existed in the isolates that each mouse line propagated selectively (Beck *et al.*, 2012). iii) When CH1641-like scrapie isolates were inoculated in wild-type mice, transmission was achieved in disagreement with previous reports, although glycosylation profiles and histopathological features changed. These results were compatible with a selection of a minor component that was able to replicate in wild-type mice, in contrast with the CH1641 experimental isolate (Vulin *et al.*, 2012). iv) Other authors (Yokoyama *et al.*, 2010) also worked with CH1641-like isolates and found them to be comprised of an ensemble of different conformers than could be differentiated by the use of Western blot and separately propagated in distinct sheep breeds and murine lines.

This situation is somehow similar to some cases of sporadic CJD (sCJD) in humans, which were shown to possess a mixture of high and low-Mw conformers in their brains or in different parts of their brains (Polymenidou *et al.*, 2005). Even in variant CJD (vCJD) cases, 21-kDa PrP^{Sc} conformers have been occasionally found (Yull *et al.*, 2006),

which raises doubts about the current classification of human prion strains and the actual responsible of each type of clinical profile.

Although the conclusion of this study is that there is an intrinsic variability of prion agents in natural scrapie cases that can be resolved by means of bioassay, the mechanisms through which each transgenic murine line selectively propagates distinct conformers are far from clear. In this line, a recent study has described how high-level expression of ovine PrP^C favors the selection of minor components in a mixture of prion quasi-species, and moreover, triggers the *de novo* generation of new, favored conformers (Le Dur *et al.*, 2017). Whether such a mechanism may participate in the divergence observed in our study needs to be evaluated. A possibility is that the ability of each transgenic line to amplify distinct prion conformers is due to their different rates of PrP^C expression (4-8-fold vs. 8-10-fold), rather than, or in combination with, differences in the sequence of the PrP^C they bear.

As little is known about this mechanism, there is also a possibility that the accumulation of different components in brain and lymph nodes of sheep could be a consequence of different expression levels in these two tissues, as already proposed by the authors of the abovementioned study.

Characterization and monitoring of prion strains in small ruminant populations in Europe is crucial for control and eradication purposes. Shedding light on the actual variability of scrapie prions and its implications for inter-species transmission and, particularly, on the zoonotic potential of scrapie field isolates is necessary to update communitarian public health policies and to prevent a putative reemergence of prion diseases as a public hazard.

References

Agrimi, U., Ru, G., Cardone, F., Pocchiari, M., and Caramelli, M. (1999). Epidemic of transmissible spongiform encephalopathy in sheep and goats in Italy. *Lancet (London, England)*, 353(9152), 560-561. doi:S0140-6736(98)04545-0 [pii]

Andreoletti, O., Berthon, P., Marc, D., Sarradin, P., Grosclaude, J., van Keulen, L., Schelcher, F., Elsen, J. M., and Lantier, F. (2000). Early accumulation of PrP(sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a romanov flock with natural scrapie. *The Journal of General Virology*, 81(Pt 12), 3115-3126. doi:10.1099/0022-1317-81-12-3115 [doi]

Baron, T., and Biacabe, A. G. (2007). Molecular behaviors of "CH1641-like" sheep scrapie isolates in ovine transgenic mice (TgOvPrP4). *Journal of Virology*, 81(13), 7230-7237. doi:JVI.02475-06 [pii]

Beck, K. E., Sallis, R. E., Lockey, R., Vickery, C. M., Beringue, V., Laude, H., Holder, T. M., Thorne, L., Terry, L. A., Tout, A. C., Jayasena, D., Griffiths, P. C., Cawthraw, S., Ellis, R., Balkema-Buschmann, A., Groschup, M. H., Simmons, M. M., and Spiropoulos, J. (2012). Use of murine bioassay to resolve ovine transmissible spongiform encephalopathy cases showing a bovine spongiform encephalopathy molecular profile. *Brain Pathology*, 22(3), 265-279. doi:10.1111/j.1750-3639.2011.00526.x [doi]

Bencsik, A., and Baron, T. (2011). Histopathological studies of "CH1641-like" scrapie sources versus classical scrapie and BSE transmitted to ovine transgenic mice (TgOvPrP4). *PLoS One*, 6(7), e22105. doi:10.1371/journal.pone.0022105 [doi]

Bencsik, A., Philippe, S., Debeer, S., Crozet, C., Calavas, D., and Baron, T. (2007). Scrapie strain transmission studies in ovine PrP transgenic mice reveal dissimilar susceptibility. *Histochemistry and Cell Biology*, 127(5), 531-539. doi:10.1007/s00418-007-0276-8 [doi]

Benestad, S. L., Arsac, J. N., Goldmann, W., and Noremark, M. (2008). Atypical/Nor98 scrapie: Properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Veterinary Research*, 39(4), 19. doi:10.1051/vetres:2007056 [doi]

Beringue, V., Bencsik, A., Le Dur, A., Reine, F., Lai, T. L., Chenais, N., Tilly, G., Biacabe, A. G., Baron, T., Vilotte, J. L., and Laude, H. (2006). Isolation from cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy. *PLoS Pathogens*, 2(10), e112. doi:06-PLPA-RA-0212R3 [pii]

Beringue, V., Herzog, L., Jaumain, E., Reine, F., Sibille, P., Le Dur, A., Vilotte, J. L., and Laude, H. (2012). Facilitated cross-species transmission of prions in extraneural tissue. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6067), 472-475. doi:10.1126/science.1215659 [doi]

Beringue, V., Le Dur, A., Tixador, P., Reine, F., Lepourry, L., Perret-Liaudet, A., Haik, S., Vilotte, J. L., Fontes, M., and Laude, H. (2008). Prominent and persistent extraneural infection in human PrP transgenic mice infected with variant CJD. *PLoS One*, 3(1), e1419. doi:10.1371/journal.pone.0001419 [doi]

Beringue, V., Vilotte, J. L., and Laude, H. (2008). Prion agent diversity and species barrier. *Veterinary Research*, 39(4), 47. doi:10.1051/vetres:2008024 [doi]

Bessen, R. A., and Marsh, R. F. (1992). Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *The Journal of General Virology*, 73 (Pt 2)(Pt 2), 329-334. doi:10.1099/0022-1317-73-2-329 [doi]

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

- Bruce, M. E. (1993). Scrapie strain variation and mutation. *British Medical Bulletin*, 49(4), 822-838.
- Bruce, M. E., Boyle, A., Cousens, S., McConnell, I., Foster, J., Goldmann, W., and Fraser, H. (2002). Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *Journal of General Virology*, 83, 695-704.
- Budka, H., Aguzzi, A., Brown, P., Brucher, J. M., Bugiani, O., Gullotta, F., Haltia, M., Hauw, J. J., Ironside, J. W., and Jellinger, K. (1995). Neuropathological diagnostic criteria for creutzfeldt-jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathology*, 5(4), 459-466.
- Caramelli, M., Ru, G., Casalone, C., Bozzetta, E., Acutis, P. L., Calella, A., and Forloni, G. (2001). Evidence for the transmission of scrapie to sheep and goats from a vaccine against mycoplasma agalactiae. *The Veterinary Record*, 148(17), 531-536. doi:10.1136/vr.148.17.531 [doi]
- Cassard, H., Torres, J. M., Lacroux, C., Douet, J. Y., Benestad, S. L., Lantier, F., Lugan, S., Lantier, I., Costes, P., Aron, N., Reine, F., Herzog, L., Espinosa, J. C., Beringue, V., and Andreoletti, O. (2014). Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. *Nature Communications*, 5, 5821. doi:10.1038/ncomms6821 [doi]
- Collinge, J., and Clarke, A. R. (2007). A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science*, 318(5852), 930-936. doi:10.1126/science.1141532 [pii]
- Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., LaCasse, R., Raymond, L., Favara, C., Baron, G., Priola, S., Caughey, B., Masliah, E., and Oldstone, M. (2005). Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science*, 308(5727), 1435-1439. doi:10.1126/science.1114352 [pii]
- Dickinson, A. G., and Meikle, V. M. (1971). Host-genotype and agent effects in scrapie incubation: Change in allelic interaction with different strains of agent. *Molecular & General Genetics : MGG*, 112(1), 73-79.
- EFSA Panel on, B. H. (2011). Joint scientific opinion on any possible epidemiological or molecular association between TSEs in animals and humans. *EFSA Journal*, 9(1), 1945. doi:10.2903/j.efsa.2011.1945
- Foster, J. D., and Dickinson, A. G. (1988). The unusual properties of CH1641, a sheep-passaged isolate of scrapie. *The Veterinary Record*, 123(1), 5-8.
- Fraser, H., and Dickinson, A. G. (1968). The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *Journal of Comparative Pathology*, 78(3), 301-311.

Fraser, H., and Dickinson, A. G. (1973). Scrapie in mice. agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *Journal of Comparative Pathology*, 83(1), 29-40. doi:0021-9975(73)90024-8 [pii]

Gonzalez, L., Chianini, F., Hunter, N., Hamilton, S., Gibbard, L., Martin, S., Dagleish, M. P., Siso, S., Eaton, S. L., Chong, A., Algar, L., and Jeffrey, M. (2015). Stability of murine scrapie strain 87V after passage in sheep and comparison with the CH1641 ovine strain. *The Journal of General Virology*, 96(12), 3703-3714. doi:10.1099/jgv.0.000305 [doi]

Gonzalez, L., Martin, S., Begara-McGorum, I., Hunter, N., Houston, F., Simmons, M., and Jeffrey, M. (2002). Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *Journal of Comparative Pathology*, 126(1), 17-29. doi:10.1053/jcpa.2001.0516 [doi]

Gonzalez, L., Martin, S., and Jeffrey, M. (2003). Distinct profiles of PrP(d) immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE-infected sheep: Implications for differential cell targeting and PrP processing. *The Journal of General Virology*, 84(Pt 5), 1339-1350.

Griffiths, P. C., Spiropoulos, J., Lockey, R., Tout, A. C., Jayasena, D., Plater, J. M., Chave, A., Green, R. B., Simonini, S., Thorne, L., Dexter, I., Balkema-Buschmann, A., Groschup, M. H., Beringue, V., Le Dur, A., Laude, H., and Hope, J. (2010). Characterization of atypical scrapie cases from great britain in transgenic ovine PrP mice. *The Journal of General Virology*, 91(Pt 8), 2132-2138. doi:10.1099/vir.0.018986-0 [doi]

Groschup, M. H., and Buschmann, A. (2008). Rodent models for prion diseases. *Veterinary Research*, 39(4), 32. doi:10.1051/vetres:2008008 [doi]

Groschup, M. H., Lacroux, C., Buschmann, A., Luhken, G., Mathey, J., Eiden, M., Lugan, S., Hoffmann, C., Espinosa, J. C., Baron, T., Torres, J. M., Erhardt, G., and Andreoletti, O. (2007). Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in germany and france. *Emerging Infectious Diseases*, 13(8), 1201-1207. doi:10.3201/eid1308.070077 [doi]

Heggebo, R., Press, C. M., Gunnes, G., Lie, K. I., Tranulis, M. A., Ulvund, M., Groschup, M. H., and Landsverk, T. (2000). Distribution of prion protein in the ileal peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *The Journal of General Virology*, 81(Pt 9), 2327-2337. doi:10.1099/0022-1317-81-9-2327 [doi]

Hill, A. F., and Collinge, J. (2003). Subclinical prion infection. *Trends in Microbiology*, 11(12), 578-584. doi:S0966842X03002877 [pii]

Hill, A. F., Joiner, S., Linehan, J., Desbruslais, M., Lantos, P. L., and Collinge, J. (2000). Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(18), 10248-10253. doi:97/18/10248 [pii]

Hill, A. F., Sidle, K. C., Joiner, S., Keyes, P., Martin, T. C., Dawson, M., and Collinge, J. (1998). Molecular screening of sheep for bovine spongiform encephalopathy. *Neuroscience Letters*, *255*(3), 159-162. doi:S0304394098007368 [pii]

Hope, J., Wood, S. C., Birkett, C. R., Chong, A., Bruce, M. E., Cairns, D., Goldmann, W., Hunter, N., and Bostock, C. J. (1999). Molecular analysis of ovine prion protein identifies similarities between BSE and an experimental isolate of natural scrapie, CH1641. *The Journal of General Virology*, *80* (Pt 1)(Pt 1), 1-4. doi:10.1099/0022-1317-80-1-1 [doi]

Jeffrey, M., Gonzalez, L., Chong, A., Foster, J., Goldmann, W., Hunter, N., and Martin, S. (2006). Ovine infection with the agents of scrapie (CH1641 isolate) and bovine spongiform encephalopathy: Immunochemical similarities can be resolved by immunohistochemistry. *Journal of Comparative Pathology*, *134*(1), 17-29. doi:S0021-9975(05)00073-3 [pii]

Jeffrey, M., Martin, S., and Gonzalez, L. (2003). Cell-associated variants of disease-specific prion protein immunolabelling are found in different sources of sheep transmissible spongiform encephalopathy. *The Journal of General Virology*, *84*(Pt 4), 1033-1045. doi:10.1099/vir.0.18825-0 [doi]

Katorcha, E., Makarava, N., Savtchenko, R., D'Azzo, A., and Baskakov, I. V. (2014). Sialylation of prion protein controls the rate of prion amplification, the cross-species barrier, the ratio of PrPSc glycoform and prion infectivity. *PLoS Pathogens*, *10*(9), e1004366. doi:10.1371/journal.ppat.1004366 [doi]

Kupfer, L., Eiden, M., Buschmann, A., and Groschup, M. H. (2007). Amino acid sequence and prion strain specific effects on the in vitro and in vivo convertibility of ovine/murine and bovine/murine prion protein chimeras. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1772*(6), 704-713. doi:S0925-4439(06)00219-5 [pii]

Laude, H., Vilette, D., Le Dur, A., Archer, F., Soulier, S., Besnard, N., Essalmani, R., and Vilotte, J. L. (2002). New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: Development and perspectives. *Comptes Rendus Biologies*, *325*(1), 49-57. doi:S1631-0691(02)01393-8 [pii]

Lazarini, F., Boussin, F., Deslys, J. P., Tardy, M., and Dormont, D. (1994). Astrocyte gene expression in experimental mouse scrapie. *Journal of Comparative Pathology*, *111*(1), 87-98. doi:S0021-9975(05)80114-8 [pii]

Le Dur, A., Beringue, V., Andreoletti, O., Reine, F., Lai, T. L., Baron, T., Bratberg, B., Vilotte, J. L., Sarradin, P., Benestad, S. L., and Laude, H. (2005). A newly identified type of scrapie agent can naturally infect

sheep with resistant PrP genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(44), 16031-16036. doi:0502296102 [pii]

Le Dur, A., Lai, T. L., Stinnakre, M. G., Laisne, A., Chenais, N., Rakotobe, S., Passet, B., Reine, F., Soulier, S., Herzog, L., Tilly, G., Rezaei, H., Beringue, V., Vilotte, J. L., and Laude, H. (2017). Divergent prion strain evolution driven by PrP(C) expression level in transgenic mice. *Nature Communications*, 8, 14170. doi:10.1038/ncomms14170 [doi]

Ligios, C., Jeffrey, M., Ryder, S. J., Bellworthy, S. J., and Simmons, M. M. (2002). Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *Journal of Comparative Pathology*, 127(1), 45-57. doi:S002199750290589X [pii]

Monleon, E., Garza, M. C., Sarasa, R., Alvarez-Rodriguez, J., Bolea, R., Monzon, M., Vargas, M. A., Badiola, J. J., and Acin, C. (2011). An assessment of the efficiency of PrPsc detection in rectal mucosa and third-eyelid biopsies from animals infected with scrapie. *Veterinary Microbiology*, 147(3-4), 237-243. doi:10.1016/j.vetmic.2010.06.028 [doi]

Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., and Hood, L. E. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 40(4), 735-746. doi:0092-8674(85)90333-2 [pii]

Pattison, I. H., and Millson, G. C. (1961). Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *Journal of Comparative Pathology*, 71, 101-109.

Piccardo, P., Manson, J. C., King, D., Ghetti, B., and Barron, R. M. (2007). Accumulation of prion protein in the brain that is not associated with transmissible disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11), 4712-4717. doi:0609241104 [pii]

Polymenidou, M., Stoeck, K., Glatzel, M., Vey, M., Bellon, A., and Aguzzi, A. (2005). Coexistence of multiple PrPsc types in individuals with creutzfeldt-jakob disease. *The Lancet. Neurology*, 4(12), 805-814. doi:S1474-4422(05)70225-8 [pii]

Priola, S. A. (1999). Prion protein and species barriers in the transmissible spongiform encephalopathies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 53(1), 27-33. doi:S0753332299800572 [pii]

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

Prusiner, S. B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science*, 252(5012), 1515-1522.

Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), 13363-13383.

Rezaie, P., and Lantos, P. L. (2001). Microglia and the pathogenesis of spongiform encephalopathies. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 35(1), 55-72. doi:S016501730100042X [pii]

Scott, M. R., Peretz, D., Nguyen, H. O., Dearmond, S. J., and Prusiner, S. B. (2005). Transmission barriers for bovine, ovine, and human prions in transgenic mice. *Journal of Virology*, 79(9), 5259-5271. doi:79/9/5259 [pii]

Schulz-Schaeffer, W. J., Tschoke, S., Kranefuss, N., Drose, W., Hause-Reitner, D., Giese, A., Groschup, M. H., and Kretzschmar, H. A. (2000). The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(sc) early in the incubation time in prion diseases. *The American Journal of Pathology*, 156(1), 51-56. doi:S0002-9440(10)64705-0 [pii]

Simmons, M. M., Moore, S. J., Lockey, R., Chaplin, M. J., Konold, T., Vickery, C., and Spiropoulos, J. (2015). Phenotype shift from atypical scrapie to CH1641 following experimental transmission in sheep. *PLoS One*, 10(2), e0117063. doi:10.1371/journal.pone.0117063 [doi]

Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K., and Prusiner, S. B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*, 51(2), 229-240. doi:0092-8674(87)90150-4 [pii]

Telling, G. C., Parchi, P., DeArmond, S. J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P., and Prusiner, S. B. (1996). Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science*, 274(5295), 2079-2082.

Thackray, A. M., Hopkins, L., Lockey, R., Spiropoulos, J., and Bujdoso, R. (2011). Emergence of multiple prion strains from single isolates of ovine scrapie. *The Journal of General Virology*, 92(Pt 6), 1482-1491. doi:10.1099/vir.0.028886-0 [doi]

Thackray, A. M., Hopkins, L., Lockey, R., Spiropoulos, J., and Bujdoso, R. (2012). Propagation of ovine prions from "poor" transmitter scrapie isolates in ovine PrP transgenic mice. *Experimental and Molecular Pathology*, 92(1), 167-174. doi:10.1016/j.yexmp.2011.11.004 [doi]

Thackray, A. M., Hopkins, L., Spiropoulos, J., and Bujdoso, R. (2008). Molecular and transmission characteristics of primary-passaged ovine scrapie isolates in conventional and ovine PrP transgenic mice. *Journal of Virology*, 82(22), 11197-11207. doi:10.1128/JVI.01454-08 [doi]

Thackray, A. M., Lockey, R., Beck, K. E., Spiropoulos, J., and Bujdoso, R. (2012). Evidence for co-infection of ovine prion strains in classical scrapie isolates. *Journal of Comparative Pathology*, *147*(2-3), 316-329. doi:10.1016/j.jcpa.2012.01.009 [doi]

Thorne, L., Holder, T., Ramsay, A., Edwards, J., Taema, M. M., Windl, O., Maddison, B. C., Gough, K. C., and Terry, L. A. (2012). In vitro amplification of ovine prions from scrapie-infected sheep from great britain reveals distinct patterns of propagation. *BMC Veterinary Research*, *8*, 223-6148-8-223. doi:10.1186/1746-6148-8-223 [doi]

Titeux, M., Galou, M., Gomes, F. C., Dormont, D., Neto, V. M., and Paulin, D. (2002). Differences in the activation of the GFAP gene promoter by prion and viral infections. *Brain Research.Molecular Brain Research*, *109*(1-2), 119-127. doi:S0169328X02005478 [pii]

Tuzi, N. L., Cancellotti, E., Baybutt, H., Blackford, L., Bradford, B., Plinston, C., Coghill, A., Hart, P., Piccardo, P., Barron, R. M., and Manson, J. C. (2008). Host PrP glycosylation: A major factor determining the outcome of prion infection. *PLoS Biology*, *6*(4), e100. doi:10.1371/journal.pbio.0060100 [doi]

Vilotte, J. L., Soulier, S., Essalmani, R., Stinnakre, M. G., Vaiman, D., Lepourry, L., Da Silva, J. C., Besnard, N., Dawson, M., Buschmann, A., Groschup, M., Petit, S., Madelaine, M. F., Rakatobe, S., Le Dur, A., Vilette, D., and Laude, H. (2001). Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *Journal of Virology*, *75*(13), 5977-5984. doi:10.1128/JVI.75.13.5977-5984.2001 [doi]

Vulin, J., Beck, K. E., Bencsik, A., Lakhdar, L., Spiropoulos, J., and Baron, T. (2012). Selection of distinct strain phenotypes in mice infected by ovine natural scrapie isolates similar to CH1641 experimental scrapie. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *71*(2), 140-147. doi:10.1097/NEN.0b013e3182439519 [doi]

Wood, J. L., McGill, I. S., Done, S. H., and Bradley, R. (1997). Neuropathology of scrapie: A study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *The Veterinary Record*, *140*(7), 167-174.

Yokoyama, T., Masujin, K., Schmerr, M. J., Shu, Y., Okada, H., Iwamaru, Y., Imamura, M., Matsuura, Y., Murayama, Y., and Mohri, S. (2010). Intraspecies prion transmission results in selection of sheep scrapie strains. *PLoS One*, *5*(11), e15450. doi:10.1371/journal.pone.0015450 [doi]

Yull, H. M., Ritchie, D. L., Langeveld, J. P., van Zijderveld, F. G., Bruce, M. E., Ironside, J. W., and Head, M. W. (2006). Detection of type 1 prion protein in variant creutzfeldt-jakob disease. *The American Journal of Pathology*, *168*(1), 151-157. doi:S0002-9440(10)62078-0 [pii]

Zanusso, G., Casalone, C., Acutis, P., Bozzetta, E., Farinazzo, A., Gelati, M., Fiorini, M., Forloni, G., Sy, M. S., Monaco, S., and Caramelli, M. (2003). Molecular analysis of iatrogenic scrapie in Italy. *The Journal of General Virology*, 84(Pt 4), 1047-1052. doi:10.1099/vir.0.18774-0 [doi]

Zlotnik, I., and Rennie, J. C. (1963). Further observations on the experimental transmission of scrapie from sheep and goats to laboratory mice. *Journal of Comparative Pathology*, 73, 150-162.

**Removal of PrP^C-attached glycans
favors the propagation and
transmission of human strains with
atypical characteristics**

Removal of PrP^C-attached glycans favors the propagation and transmission of human strains with atypical characteristics

Abstract

Transmissibility is a requisite for a misfolded protein to be considered a prion. However, prion strains with atypical features, such as those responsible for GSS or VPSPr, have been historically endorsed with limited capacity of transmitting to other hosts. Interspecies transmission of prions is fundamentally modulated by the genotypic resemblance between *PRNP* sequences of donor and host. However, other factors are known to play a key role as well, including post-translational glycosylation of PrP^C. This work explores the relationship between PrP^C glycosylation and atypical features by studying the effect of glycan removal on the propagation and transmission of non-classical strains. Several human prion isolates were subjected to PMCA on a substrate prepared from brains of TgNN6h mice, which express human PrP^C with point mutations blocking glycosylation sites. Both direct and PMCA-adapted prions were later inoculated in TgNN6h and Tg340 mice, and neuropathological hallmarks were analyzed. Non-glycosylated human PrP^C was able to sustain *in vitro* propagation of different atypical human prions. The expression of this unglycosylated PrP^C in mice rendered them susceptible to experimental infection with either direct or *in vitro*-adapted atypical prions, including the poorly transmissible GSS A117V strain. Neuropathological features were preserved, indicating that *bona fide* replication of strain properties was achieved. In contrast, the GSS 6OPRI isolate could be propagated in both unglycosylated and normally glycosylated PrP^C-expressing models, which manifested distinct strain features, indicating a possible mixture of classical and atypical components. Our results suggest that the abolishment of PrP^C glycosylation facilitates the selective propagation of atypical strains, with maintenance of their specific pathobiological properties.

Introduction

Prions constitute a novel type of pathogenic agents responsible for a group of fatal neurodegenerative disorders known as prion diseases or transmissible spongiform encephalopathies. Prions are thought to consist exclusively of a pathologic protein, termed PrP^{Sc}, a conformational isoform of the physiological, host-encoded cellular prion protein (PrP^C) (Oesch *et al.*, 1985; Prusiner, 1982). By means of a nucleation-polymerization mechanism, PrP^{Sc} is able to template PrP^C conversion into the pathogenic conformation. This autocatalytic process leads to the accumulation of large quantities of PrP^{Sc} in the affected tissues and particularly in the nervous system. PrP^{Sc} accumulation shows a topographical and temporal correlation with the appearance of histopathological lesions (spongiosis, neuron loss, gliosis) (Budka *et al.*, 1995) and the

onset of clinical signs, although the exact nature of the neurotoxic agent has yet to be clarified.

Prion diseases affect several species of mammals, including human beings. They can have three different origins: acquired, sporadic or genetic. Acquired forms are caused by exogenous prions that enter the organism through different routes and include scrapie in sheep, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle, and variant Creutzfeldt-Jakob (vCJD) disease in humans, among others. Genetic prion diseases, which have been exclusively described in humans, are caused by mutations in the gene that codes for PrP^C (*PRNP*) (Minikel *et al.*, 2016). Examples of genetic prion diseases are familial Creutzfeldt-Jakob disease (fCJD) (Gambetti *et al.*, 2003), fatal familial insomnia (FFI) (Kretzschmar *et al.*, 1995) and Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (GSS) (Takada *et al.*, 2017). The later disorder can be caused by a variety of point mutations, which include a proline-to-leucine substitution at codon 102 (P102L) and an alanine-to-valine substitution at codon 117, among others. In addition, some genetic prion disease cases have been associated to insertional mutations in the octapeptide repeats region (OPRI) of the prion protein (Capellari *et al.*, 1997; King *et al.*, 2003; Owen *et al.*, 1992; Vital *et al.*, 1998).

Lastly, sporadic cases have an unknown, putatively spontaneous, origin. The most representative one is sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD), which accounts for the 85% of prion disease cases diagnosed in humans (Hill *et al.*, 2003). Other examples include sporadic fatal insomnia (sFI), the sporadic counterpart of FFI (Gambetti *et al.*, 2003), and variably protease-sensitive prionopathy (VPSPr) (Gambetti *et al.*, 2008), whose characteristics resemble those of GSS, suggesting that it may be its sporadic form (Zou *et al.*, 2010).

Regardless of its origin, the genotype at codon 129 of the *PRNP* gene, which codes for either methionine (129M) or valine (129V), strongly affects the susceptibility to prion disease and the clinical and neuropathological phenotype.

PrP^C sequence contains two consensus sites for N-glycosylation, consisting on the sequence Asn-X-Thr (Kornfeld & Kornfeld, 1985) where X stands for either Phe or Ile (Locht *et al.*, 1986). Glycans are almost always attached to the nitrogen atom in the asparagine (Asn) side chain. In human PrP^C, asparagines included in this motif correspond to residues 181 and 197. Post-translational glycosylation of PrP^C in either both, one or none of the asparagines leads to three possible glycoforms of mature PrP^C: diglycosylated, monoglycosylated and non-glycosylated (Caughey *et al.*, 1989). These three forms are clearly envisioned in undigested PrP^C immunoblot, and once misfolded into the partially protease-resistant pathological isoform, their relative proportions after proteinase K treatment constitute a stable signature for a given PrP^{Sc} conformation. A number of human and animal prion diseases, such as the atypical form of scrapie, GSS and VPSPr (Pirisinu *et al.*, 2013), are associated with PrP^{Sc}

conformers showing unique banding patterns characterized by the presence of multiple bands (ladder-like patterns), which indicates that these prions are composed of differently folded PrP^{Sc}.

This biochemical typing methodology allows differentiating prion strains (Hill *et al.*, 2003; Somerville *et al.*, 1997). The term “strains” refers to prion variants with differential pathobiological properties, which are known to be encoded in the structure of PrP^{Sc} molecules (Bessen & Marsh, 1994; Telling *et al.*, 1996). Current models consider most prion isolates to consist of a mixture or “cloud” of PrP^{Sc} conformers, instead of a pure, single strain (Collinge, 2010).

Inoculation of prion isolates to a species different from the original host results in the manifestation of a characteristic phenomenon of prion biology known as transmission barrier (Scott, M. R. *et al.*, 2005). This phenomenon limits the transmission efficiency by protracting incubation periods and reducing attack rates (proportion of inoculated animals that develop the disease) (Priola, 1999). In some occasions, modification of the propagated strain is observed, by either selection of minor components from the “cloud” of conformations or generation of novel conformers (Bruce, 1993).

Transmission barriers are fundamentally modulated by genotypic differences between PrP^C sequences of donor and receptor species (Prusiner *et al.*, 1990; Scott, M. *et al.*, 1989). Current models of the mechanisms behind prion propagation postulate that the amino acid sequence limits the range of possible conformations that a PrP^C can adopt in a misfolding event. Thus, the degree of identity of PrP^C sequences from two different species or individuals determines the strength of the transmission barrier between them (Collinge & Clarke, 2007). Nevertheless, the strain of the agent plays an important role too (Scott, M. R. *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2014).

However, factors other than the genotype and the strain are thought to affect transmission efficiencies. Some studies suggested that glycosylation of PrP^C is one of such factors. Non-glycosylated PrP^C has been shown to be more prone to misfold after interaction with several murine scrapie strains (Korth *et al.*, 2000). In addition, the degree of glycosylation was shown to modulate the interactions between PrP^C and PrP^{Sc} sourced from different species (Priola & Lawson, 2001), which suggested that glycosylation of PrP^C may be a key factor modulating interspecies transmissions. Later studies using transgenic mice lacking glycosylation sites proved that they are not crucial for efficient transmission. However, altered glycosylation of PrP^C can drastically alter the transmission patterns of a number of prion strains, for example, allowing certain hosts to get infected with strains towards which they are naturally resistant (Wiseman *et al.*, 2015). Other works using transgenic mice expressing a GPI-anchorless PrP^C, which due to altered post-translational processing is poorly glycosylated, obtained similar results. The mouse-adapted CWD strain (mCWD) was able to infect Tg(GPI⁻ PrP) mice with drastically shorter incubation periods compared to wild type

mice, although this effect seems to be mediated by selection or *de novo* generation of a more apt conformer (Aguilar-Calvo *et al.*, 2017).

An alternative denomination for prion diseases is transmissible spongiform encephalopathies, indicating that transmission capability is a condition for a misfolded protein to be considered a prion. However, a number of prion variants have limited capacity of transmitting to other hosts, which initially led researchers to classify them as non-transmissible proteinopathies. The prototypical example is Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) syndrome (Brown *et al.*, 1994; Piccardo *et al.*, 2007; Tateishi *et al.*, 1996). GSS cases associated with the P102L mutation show a high heterogeneity, with two different phenotypes reported in humans: one associated to a 21-kDa classical banding pattern and spongiform change, and another linked to the presence of an 8-kDa internal PrP fragment and absence of spongiosis. Although 21-kDa PrP^{Sc}-associated cases transmit with relative efficiency to both wild type (Tateishi *et al.*, 1996) mice and transgenic mice expressing homologous PrP^C (Tg101LL) (Asante *et al.*, 2015; Manson *et al.*, 1999), 8-kDa cases did not cause disease in recipient host but only the formation of amyloid deposits that were not pathogenic (Piccardo *et al.*, 2007).

On the other hand, GSS cases associated to other *PRNP* mutations, such as A117V, only contain 6-7-kDa internal fragments and have never being transmitted to wild type mice (Tateishi *et al.*, 1996). However, the expression of a homologous human PrP^C in mice allowed the experimental infection, although with low clinical attack rates and accumulation of intrinsically unstable PrP^{Sc} aggregates, whose infectivity has not been assessed (Asante *et al.*, 2013).

Finally, the brain of VPSPr patients accumulates similar low-molecular weight, internal PrP^{Sc} fragments (Gambetti *et al.*, 2008) and, accordingly, their transmission capability to traditional humanized models is limited (Notari *et al.*, 2014).

Taken together, these results suggested that, while 21-kDa PrP^{Sc} forms in GSS cases are associated with actual infective capacity, internal PrP fragments may cause either amyloidogenesis or neurotoxicity, but not true infectivity. However, further studies have demonstrated that transmission capability of these atypical prions is highly dependent on the model used. Indeed, bank voles have proved useful to transmit some of these cases, such as GSS with 6-8 kDa bands (Pirisinu *et al.*, 2016) and VPSPr (Nonno *et al.*, 2019).

As already mentioned, some approaches have been followed to assess the role of glycans in the transmission of prion diseases, including the abolishment of GPI anchoring of PrP^C (Chesebro *et al.*, 2005). In our study, however, we used the TgNN6h model, which express physiological levels of a human PrP^C with asparagine-to-glutamine substitutions at positions 181 and 197, so that glycan-attachment consensus sites are eliminated and PrP^C glycosylation is prevented (Haldiman *et al.*, 2013). This

model allowed evaluating the effect of glycan elimination in the propagation and transmission of atypical human strains.

Material and methods

Inocula. Brain homogenates from human patients of a variety of prion diseases were included in the study. Their origin is listed below:

- sCJDMM1 and sCJDMM2 isolates were provided by Dr Qhinzhong Kong (Case Western Reserve University).
- sFI and GSS A117V-129M/V isolates were provided by Dr Carmen Navarro (Complejo Hospitalario Universitario de Vigo).
- GSS A117V-129M/M and GSS 6OPRI-129M/V isolates were provided by Dr Wen-Quan Zou (Case Western Reserve University).
- VPSPr-129V/V and VPSPr-129M/V isolates were provided by Biobanco Vasco / Euskal Biobankoa (BIOEF).

Animals. TgNN6h (or TgPrP(N181Q/N197Q)) mice express physiological levels of a mutated human 129M PrP^C with asparagine to glutamine substitutions at codons 181 and 197, which eliminate glycosylation consensus sequences and thus impedes the glycosylation of the protein. These animals were generated by Dr Qhinzhong Kong (Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio) (Haldiman *et al.*, 2013) and were provided for our purposes by Dr Joaquín Castilla and Dr Olivier Andréoletti.

Tg340 mice were generated and provided by Dr Juan María Torres (CISA-INIA, Madrid, Spain). They express normally glycosylated human 129M PrP^C at levels approximately four-fold higher than those of human brain) (Padilla *et al.*, 2011).

Protein misfolding cyclic amplification. PMCA was performed as previously described (Castilla, Saá, Hetz *et al.*, 2005; Saá *et al.*, 2006b). The substrate of the reaction was prepared from perfused brains obtained from uninfected TgNN6h mice. Briefly, animals were sacrificed by CO₂ exposure and then perfused with PBS + 5mM EDTA; brains were harvested and immediately frozen at -80°C. Brains were homogenized at 10% in PMCA buffer (PBS + NaCl 1% + 1% Triton X-100 + protease inhibitors) using a tissue grinder.

PMCA was performed in 0.2-µl PCR tubes. Five µl of each inoculum (seed) were diluted in 50 µl of substrate; each reaction was performed in quadruplicate. Tubes were placed in a S-4000 Misonix sonicator (QSonica) and subjected to cycles of 20-second sonication pulses (at 80% power) intercalated with 30-minute periods of incubation at 37°C. After 24 hours, aliquots were obtained from each replicate and diluted (1/10) in

fresh substrate. This process was repeated along 15 cycles of serial PMCA. Unseeded replicates, containing only substrate, were included and co-incubated with inoculated replicates to control cross-contamination. Given the stochastic nature of the misfolding event, a second repetition of the whole experiment was performed in each case.

Bioassay. TgNN6h and Tg340 animals were experimentally inoculated with both original and PMCA-adapted isolates. Animals received an intracerebral inoculation of 20 µl of the inoculum using a 50-µl precision syringe and a 25-G needle and under general anesthesia. They were provided a subcutaneous dose of buprenorphine (0.3 mg/kg) to reduce post-inoculation pain. They were caged in HEPA-filtered ventilated racks and monitored three times per week. Mice were culled by cervical dislocation under heavy anesthesia after the development of severe clinical signs or at the end of the study (700 dpi). Brains were harvested and divided sagittally. One brain hemisphere was frozen at -80°C for biochemical analyses, while the other was fixed in 10% formalin for histopathological studies.

Western blot. Original inocula, PMCA-propagated isolates and brain homogenates from diseased mice were diluted 1:2 in sarkosyl 10% and digestion was performed with 170 µg/ml proteinase K for one hour at 42°C with constant agitation, as previously described (Castilla *et al.*, 2005). Digestion was stopped with the addition of loading buffer (NuPage Laemli Buffer, Invitrogen) prior to subjecting samples to SDS-PAGE in 12% Bis-Tris gels (Biorad). Proteins were later transferred to a PVDF membrane and probed with anti-PrP antibody 3F4 (1:10,000) (Merck), followed by incubation with a HRP-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology) and development with a chemiluminescent substrate (SuperSignal West Pico).

Tissue processing. Mouse hemibrains were embedded in paraffin wax and mounted in appropriate cassettes prior to obtaining 4 µm-thick sections were that were recovered on slides for subsequent analysis.

Haematoxylin-eosin (H&E) staining. Dewaxing and rehydration of the slides was achieved by sequential immersion in xylene and graded alcohols. They were later stained by immersion in a haematoxylin solution, rinsed with tap water, incubated in acid alcohol (1% acetic acid in a 70% ethanol solution) and counterstained with an eosin solution. Slides were finally dehydrated and mounted prior to visualization under light microscope.

Immunohistochemistry. After dewaxing and rehydration, slides were sequentially subjected to three pre-treatments for antigen retrieval: immersion in 98% formic acid for 10 min, treatment with 4 µg/ml proteinase K for 15 min at 37°C, and hydrated autoclaving in citrate buffer at 96°C for 10 min. Endogen peroxidase activity was blocked using a commercial blocking solution (Dako Agilent), followed by 1-hour

incubation with anti-PrP antibody 3F4 (1:10,000). The EnVision+ System (Agilent Dako) was used as the secondary antibody, prior to development with the DAB+ System (Agilent Dako). Counterstaining was performed with haematoxylin.

Results

PMCA in TgNN6h substrate is able to support the propagation of both classical and atypical human prion strains

Protein misfolding cyclic amplification (PMCA) reactions were performed in quadruplicate in non-glycosylated PrP^C substrate prepared from brain homogenates of healthy TgNN6h. Two independent repetitions of the experiment were performed in each case (**Fig. 1**).

Human prions responsible for TSE with classical phenotypes (sCJDMM1, sCJDMM2 and sFI) propagated readily in the unglycosylated substrate, 4/4 replicates being positive on first PMCA round in almost all cases. The only exception was sFI on the first repetition of the experiment, which showed 3/4 positive replicates on first passage that increased to 4/4 on second round. These results are in agreement with previous studies (Camacho *et al.*, 2019) and indicate high propagation efficiency for classical strains in unglycosylated substrate.

VPSPr isolates with two different codon 129 genotypes (V/V and M/V) showed distinct propagation efficiencies in the TgNN6h substrate. VPSPr-129V/V caused 4/4 positive replicates at round 3 on both first and second repetitions. In contrast, positive signal for VPSPr-129M/V appeared much later on first repetition (round 8 and only 3/4 replicates), while the second repetition worked better (1/4 on round 4, 4/4 on round 9). The reason why VPSPr-129V/V prions propagate more efficiently in unglycosylated substrate than VPSPr-129M/V prions remain to be elucidated.

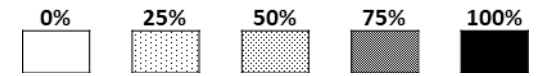
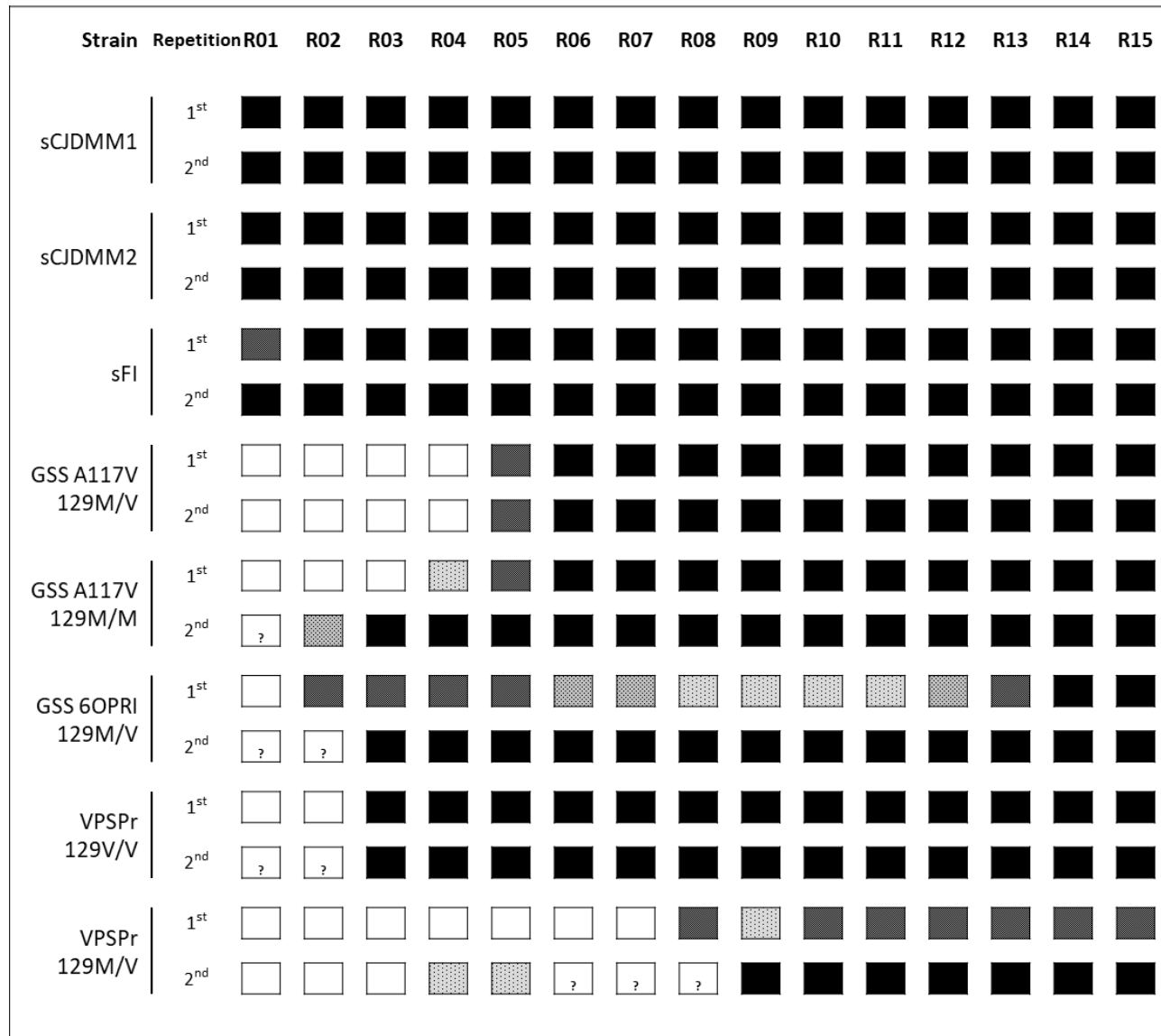


Figure 1. Propagation of classical and atypical human prion strains on TgNN6h substrate by PMCA. All experiments were performed on quadruplicate and the proportion of PrP^{res}-positive replicates was assessed on each amplification round; two independent repetitions were performed in each case. Prions responsible for sporadic cases with classical features (sCJDMM1, sCJDMM2 and sFI) propagated very efficiently in the TgNN6h substrate, while genetic cases and VPSPr showed variable efficiencies and, occasionally, high heterogeneity between repetitions, reflecting the stochastic nature of the misfolding process. sCJDMM1 and sCJDMM2: sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, subtypes MM1 and MM2; sFI: sporadic fatal insomnia; GSS: Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome; A117V: alanine-to-valine substitution; 6OPRI: 6 octapeptide repeat insertion; VPSPr: variably protease-sensitive prionopathy; 129M/M, M/V, V/V: genotypes at codon 129 of the PrP^C (M: methionine, V: valine).

The GSS A117V-129M/V isolate remained negative for four rounds of serial PMCA, and showed 3/4 positive replicates on round 5 that increased to 4/4 on next passages. This pattern of amplification was again observed in the second repetition of the experiment.

The GSS A117-129M/M isolate behaved very similarly on first repetition, showing 1/4 positive replicates on round 4 that progressively increased to 4/4 by round 6. However the second repetition of this inoculum worked differently, with 2/4 positive replicate already on round 2, and 4/4 on round 3. This incoherent result may reflect the intrinsic stochasticity of the misfolding event and leaves unresolved the question of whether codon 129 determines the propagation capability of GSS A117V prions.

In the case of the GSS 6OPRI-129M/V isolate, positive replicates arose as soon as in round 2, although it was not fully stabilized until round 14. In contrast, the second repetition of the experiment was much straightforward as 4/4 positive replicate were obtained already at round 3.

Altogether, our results indicate that PMCA on TgNN6h substrate could be a good methodology to distinguish prion disease cases with atypical characteristics. However, in order to ensure the *bona fide* propagation of atypical prions (i.e. the maintenance of their strain properties), the study of these isolates through bioassay was mandatory. In view of the results obtained in these and other *in vitro* experiments, we selected a number of isolates for further *in vivo* studies. These were GSS A117V-129M/V, GSS 6OPRI-129M/V and VSPPr-129V/V. sCJDMM1 was included as control.

Direct inoculation of sCJDMM1 prions caused disease with classical features in Tg340, but not TgNN6h mice

Table 1. Incubation periods and attack rates in bioassay. dpi: days post-inoculation; n/d: not done; *Time from inoculation of animals that currently remain asymptomatic.

	TgNN6h		Tg340	
	Incubation period (dpi)	Attack rate	Incubation period (dpi)	Attack rate
sCJDMM1	381*	ongoing	201	6/6
VSPPr-129V/V	378	4/6	>700	0/6
GSS A117V	>700	0/8	>700	0/6
GSS A117V_PMCA	244	6/6	>700	0/6
GSS A117V_PMCA (2nd passage)	233	6/6	n/d	n/d
GSS 6OPRI	380	5/5	206	6/6
GSS 6OPRI_PMCA	362	3/4	>700	0/7

Intracerebral administration of the sCJDMM1 isolate to Tg340 mice, expressing normally glycosylated 129M human PrP^C, produced clinical disease in 201 days post-

inoculation (dpi) and a complete (100%) attack rate (**Table 1**), which proved the efficient transmission of human prions with classical properties to hosts expressing homologous PrP, as previously described (Padilla *et al.*, 2011). Neuropathological features included synaptic PrP^{Sc} accumulations in the pyramidal layer of frontal and temporoparietal cerebral cortices, central thalamus, hypothalamus, cortex of the superior colliculus and pons (**Fig. 2D**), and total absence of amyloid plaques. The distribution of spongiform lesions mirrored that of PrP^{Sc} deposits (**Fig. 2A, B**). Spongiform change consisted of small, round vacuoles widespread in cortices, *cornu ammonis* of hippocampus, thalamus and mesencephalon (**Fig. 2C**).

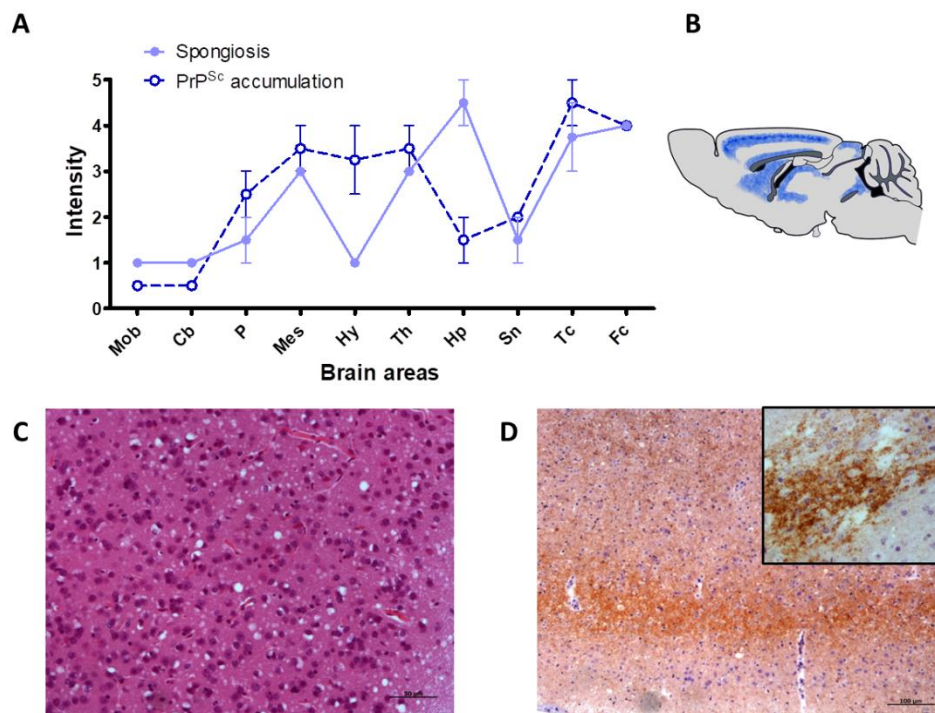


Figure 2. Tg340 mice infected with sCJDMM1. A) Lesion profile and PrP^{Sc} accumulation curve, B) PrP^{Sc} distribution in brain, C) detail of spongiform change and D) PrP^{Sc} accumulation in the pyramidal layer of frontal cortex with detail of the synaptic type (D, inset).

The inoculation of sCJDMM1 prions in TgNN6h mice has caused neither clinical disease nor neuropathological alterations after more than 380 dpi. However, this part of the experiment is still ongoing.

Direct inoculation of VPSPR-129V/V prions caused disease with atypical neuropathology in TgNN6h, but not Tg340 mice

In contrast with sCJDMM1, VPSPR-129V/V did not transmit to Tg340 mice (**Table 1**). This is in strong agreement with other reports of the low transmission capability of these isolates to different mouse models, including humanized mice (Notari *et al.*, 2014).

However, VPSPr-129V/V transmitted with relatively good efficiency to TgNN6h mice (**Table 1**). The most likely explanation for this observation is that the lack of glycosylation facilitated the transmission. This is in agreement with previous unpublished results (Notari *et al.*, 2017, poster communication at Prion2017 conference). The neuropathology in these animals consisted of amorphous and multicentric amyloid plaques abundantly distributed in cerebellum and thalamus, while in hippocampus and frontal and temporoparietal cortices they were less frequent (**Fig.3**). Of notice, cerebellum was much more affected with this strain than with other atypical strains (**Fig. 3D, F**), and, in some areas, the lesion was very severe, to the point of causing total disparition of the molecular and Purkinje layers and severe atrophy of the granular layer (**Fig. 3D, inset**).

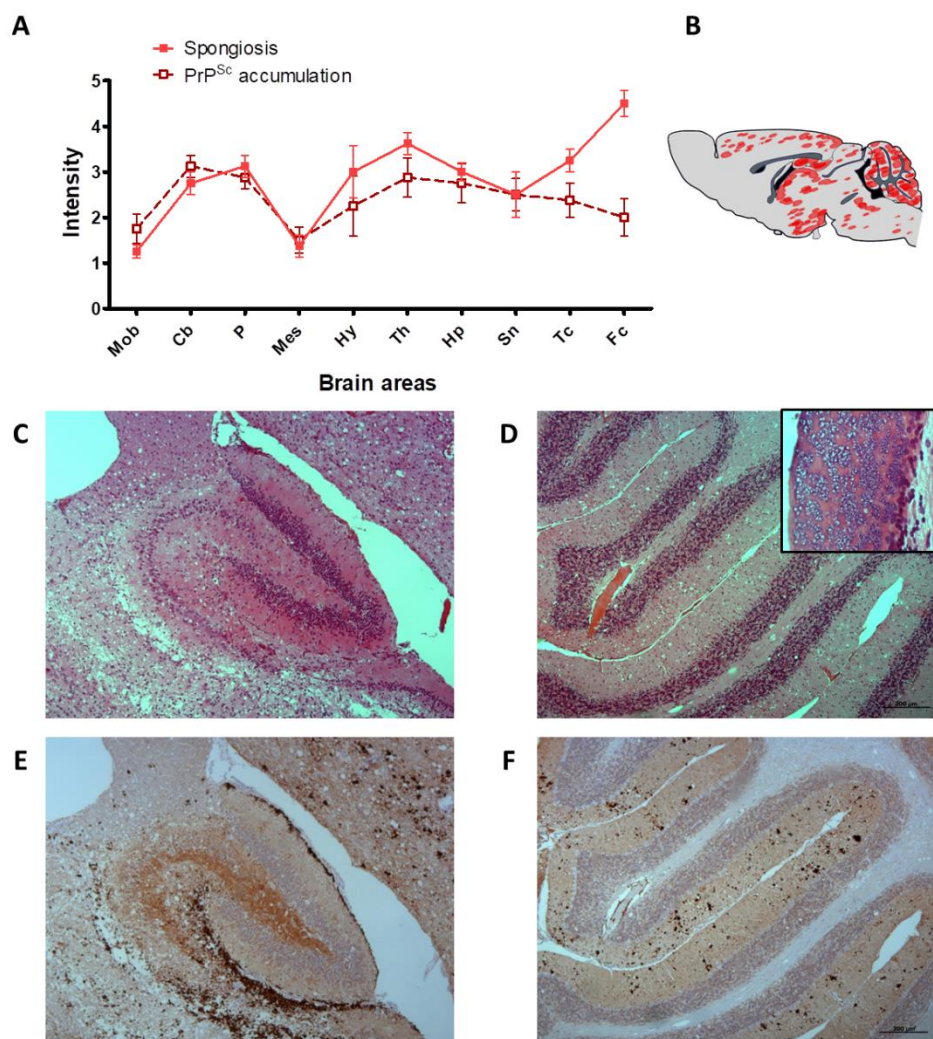


Figure 3. TgNN6h mice infected with VPSPr-129V/V. A) Lesion profile and PrP^{Sc} accumulation curve, B) PrP^{Sc} distribution in brain, C-D) spongiform change and amyloid plaques and E-F) PrP^{Sc} deposits and plaques in hippocampus (C and E) and cerebellar cortex (D and F), with detail of the atrophy of the cerebellar granular layer (D, inset).

GSS A117 prions are able to infect TgNN6h mice after in vitro adaptation and maintain their neuropathological signature

Direct inoculation of GSS A117V-129M/V prions produce no disease in either TgNN6h or Tg340 mice (**Table 1**). This is in agreement with the low transmissibility historically reported for this type of isolates.

However, as said, PMCA on TgNN6h substrate allowed the *in vitro* adaptation of this isolate to the TgNN6h line. For that, after positive PrP^{res} detection was achieved from PMCA products of GSS A117V-129M/V, this strain was serially propagated for 25 rounds (at dilution 1/10) to ensure that no molecules of the original inoculum were present. This PMCA-propagated GSS A117V isolate (hereafter termed GSS A117V_PMCA) was inoculated into both TgNN6h and Tg340 mice.

TgNN6h mice infected with the GSS A117V_PMCA inoculum developed clinical disease with an average incubation period of 244 dpi and 100% attack rate. When a second passage was performed, incubation periods were not significantly shortened (233 dpi), which suggest that PMCA was enough to fully stabilize the strain to the TgNN6h host (**Table 1**).

The brain of diseased animals showed severe lesions. Structures surrounding lateral ventricles and hippocampal formation (**Fig. 4C**) and deep structures such as septal area and diencephalon (**Fig. 4D**) were highly affected, while vacuoles were scarcer in caudal areas such as cerebellum and medulla oblongata. Nervous tissue at the level of cortices was severely damaged by large amyloid plaques that in some cases were confluent and very disruptive. In other areas, amyloid plaques were more discretely distributed. Immunohistochemical analysis revealed that these plaques were formed of prion protein (**Fig. 4E, F**) and that their distribution largely overlapped with that of spongiform lesions (**Fig. 4A**). No particulate or synaptic-type PrP^{res} deposits were noted (**Fig. 4B**).

When Tg340 mice were challenged with the GSS A117V_PMCA isolate, no clinical disease appeared in more than 700 dpi (**Table 1**). No PrP^{Sc} deposition or vacuolization was observed in the brains of aged mice after sacrifice, which allowed discarding subclinical infection. This observation suggests that the reintroduction of glycans blocked the propagation of the GSS A117V atypical strain in Tg340 mice.

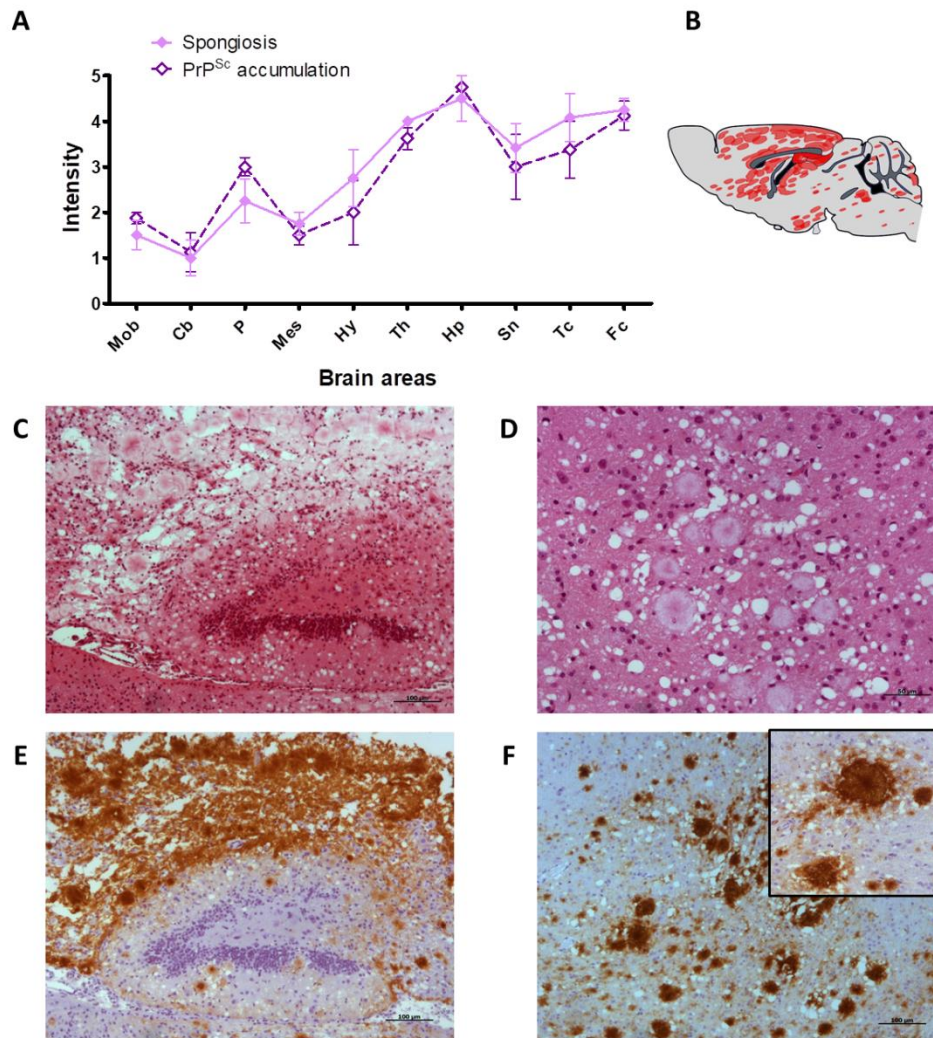


Figure 4. TgNN6h mice infected with PMCA-adapted GSS A117V. A) Lesion profile and PrP^{Sc} accumulation curve, B) PrP^{Sc} distribution in brain, C-D) spongiform change and amyloid plaques, and E-F) PrP^{Sc} deposits and plaques in hippocampus (C and E) and thalamus (D and F) with detail of PrP^{Sc} plaques (F, inset).

GSS 6OPRI phenotype diverges between normal and unglycosylated PrP^C-expressing humanized mice

Direct administration of GSS 6OPRI prions to Tg340 mice produced clinical disease with complete attack rates and an average incubation period of 206 dpi (**Table 1**). These results are surprisingly similar to those of sCJDMM1 prions in the same murine line and suggest that a classical agent has propagated in these mice. Accordingly, the neuropathology shown by these animals resembled that of sCJDMM1-infected Tg340 individuals, with overlapping lesion profiles and a similar distribution of synaptic-type PrP^{Sc}, although scarcer in thalamus, hypothalamus and superior colliculus and more abundant in deep layers of cortex, septal area and striatum (**Fig. 5A-D**).

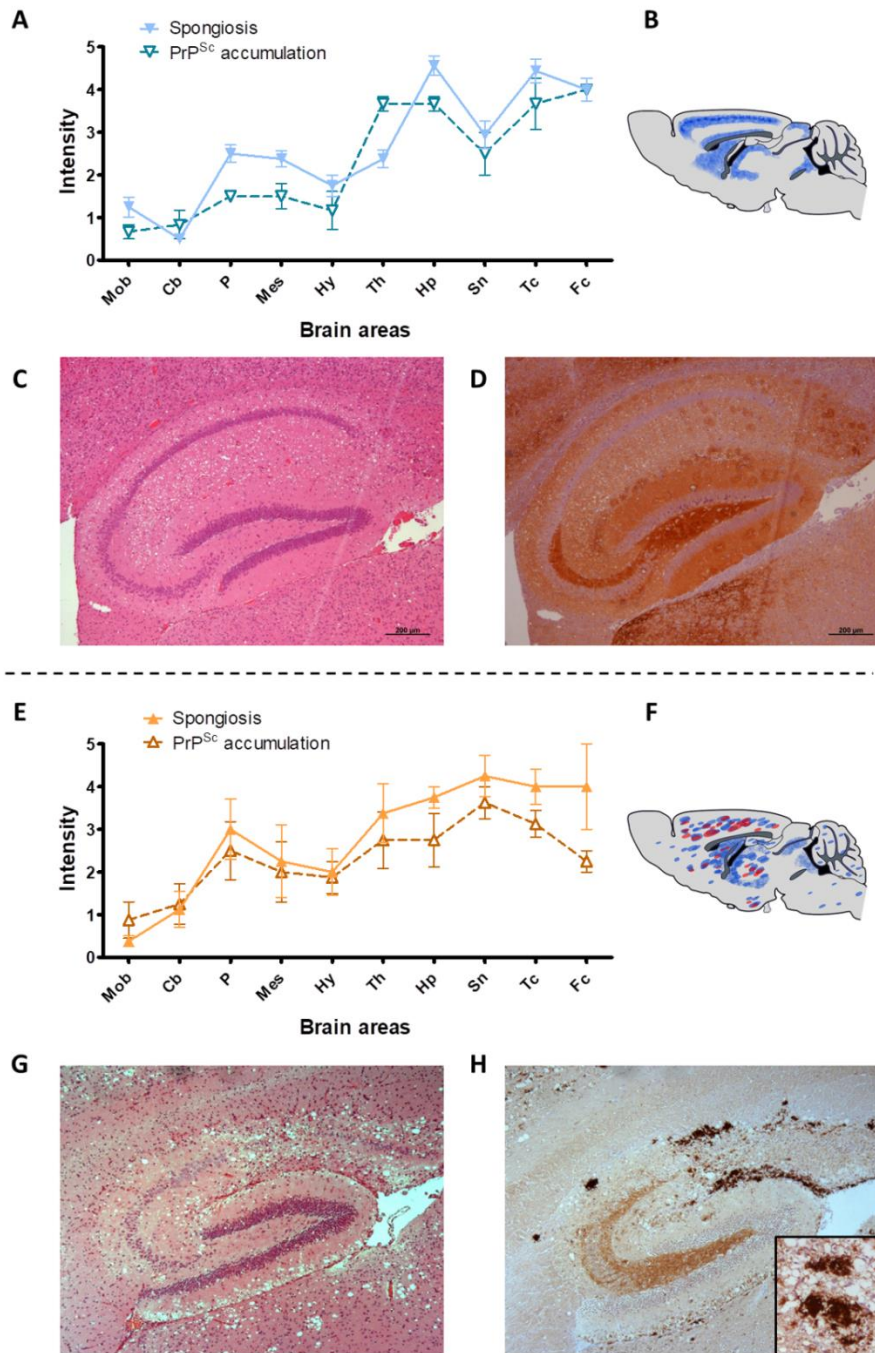


Figure 5. Tg340 (A-D) and TgNN6h mice (E-H) infected with GSS 6OPRI. A) Lesion profile and PrP^{Sc} accumulation curve, B) PrP^{Sc} distribution in brain, C) spongiform change, and D) PrP^{Sc} synaptic accumulation in hippocampus of Tg340 mice. E) Lesion profile and PrP^{Sc} accumulation curve, E) PrP^{Sc} distribution in brain, F) spongiform change and amyloid plaques, and G) PrP^{Sc} deposits and plaques in hippocampus of TgNN6h mice.

Moreover, Western blot of diseased mice showed the presence of PrP^{res} with clearly classical banding patterns, identical to those of the original 6OPRI isolate, and with a molecular weight slightly higher than that of type 1 PrP^{res} (**Fig. 6**)

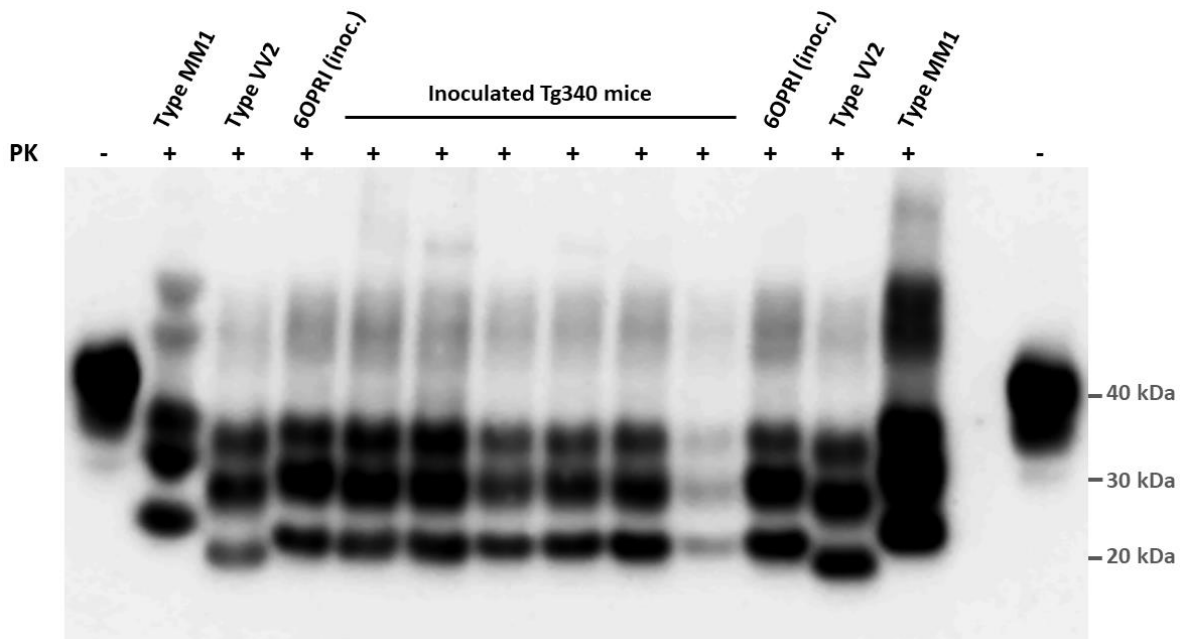


Figure 6. Western blot of original 6OPRI isolate and brains from 6OPRI-infected Tg340 mice. Notice the total correspondence of PrP^{res} banding patterns between inoculum and mouse brains and that its intermediate molecular weight. Type 1 (sCJDMM1 isolate) and type 2 (sCJDVV2 isolate) PrP^{res} were used as controls.

The original GSS 6OPRI isolate was also transmitted to TgNN6h on direct passage, although with more protracted incubation periods and incomplete attack rates; positive animals died with an average time of 380 dpi (**Table 1**). This inoculum was also propagated for 25 rounds of PMCA in TgNN6h substrate and the PMCA-adapted isolate was inoculated into both transgenic lines. Tg340 developed no clinical disease after more than 700 dpi and their brains were free from both spongiform lesions and PrP^{Sc} deposits. In contrast, the disease progression in TgNN6h was similar to that observed after direct GSS 6OPRI inoculation, with average survival period of 362 dpi and 3/4 animals affected (**Table 1**).

Both direct and PMCA-adapted GSS 6OPRI prions triggered the same neuropathology in TgNN6h mice. Severe spongiosis was found in cortices, septal area, thalamus and hypothalamus (**Fig. 5E, G**), and consisted of a mixture of differently sized vacuoles with presence of microvacuoles inside neurons and bigger vacuoles in the neuropil. On immunohistochemistry, fine punctuate to coarse granulate accumulations were scarce and located in caudal areas (pons and mesencephalon), while the more severely affected rostral areas showed coalescing and plaque-like depositions (**Fig. 5E, F, H**). Few of these plaque-like structures were visible on H&E-stained sections (**Fig. 5G, H**), in contrast with evident amyloid plaques seen in GSS A117V-affected individuals. The fact that mice infected with the PMCA-adapted inoculum showed the same neuropathology proves that it is a strain-specific feature. This pattern strongly

contrasted with that of Tg340 mice and to some extent mirrored that of atypical strains in TgNN6h.

Biochemical studies of TgNN6h mice inoculated with each of the mentioned isolates (VSPPr-129V/V, GSS A117V_PMCA and GSS 6OPRI) are ongoing and will complement the histopathological results presented here.

Discussion

Protein misfolding cyclic amplification (PMCA), a technology that arose primarily to be used as a powerful diagnostic tool (Castilla, Saá, & Soto, 2005; Saá *et al.*, 2006a; Saborio *et al.*, 2001), has showed an extraordinary ability to faithfully amplify classical prion strains of animal origin, such as classical scrapie or BSE (Chen *et al.*, 2010; Franz *et al.*, 2012; Hedman *et al.*, 2018; Murayama *et al.*, 2010; Saá *et al.*, 2006b). Moreover, it has been demonstrated that such PMCA-propagated prions retain the strain properties of the original seeds (Castilla *et al.*, 2005). However, its usefulness for human prions with atypical properties is more limited, as few reports exist of successful propagation of such strains on PMCA (Peden *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019).

Glycosylation of PrP^C is known to affect not only *in vivo* transmission of prion isolates (Tuzi *et al.*, 2008; Wiseman *et al.*, 2015), but also the efficiency of *in vitro* propagation. Partially and totally de-glycosylated substrates proved useful for the amplification of several types of prions on PMCA (Camacho *et al.*, 2019; Makarava *et al.*, 2013; Nishina *et al.*, 2006). Our study provides further evidence of this with classical human strains, but also, for the first time, with some strains historically considered as poorly transmissible.

Importantly, in our experiments, *in vitro* propagation efficiencies of classical and atypical strains were not alike. All classical prions tested (sCJDMM1, sCJDMM2 and sFI) readily propagated as soon as in first round, which seems to indicate that the amino acid changes introduced in TgNN6h PrP^C do not cause a barrier for the propagation of these strains. In contrast, atypical strains suffered a delay on propagation. This is in agreement with historical reports of their low transmission capability *in vivo*. Distinct PMCA results among atypical strains may reflect actual differences in propagation capability or be due to the intrinsic stochasticity of the *in vitro* propagation process.

Most of previous attempts of transmitting atypical human prion diseases to rodent models relied on the introduction of the causal mutations into either mouse PrP or human PrP transgenically expressed in mouse. This approach allowed circumventing the transmission barrier introduced by the genotypic mismatch between incoming PrP^{Sc} and host PrP^C, although, even with that, the transmission efficiency was low (Nonno *et al.*, 2016). In contrast, our results demonstrate the possibility of

transmitting atypical human prions, with relatively good efficiency, to humanized models in absence of total genotypic correspondence though the abolishment of PrP^C glycosylation.

Mice expressing unglycosylated human PrP^C were susceptible to a number of atypical isolates, including VPSPr-129V/V and GSS 6OPRI. In contrast, GSS A117V prions were not directly transmissible to TgNN6h and needed previous adaptation by PMCA. Low transmissibility has been historically endorsed to GSS A117V isolates which, in contrast with some other GSS types (Baker *et al.*, 1990; Tateishi *et al.*, 1996), have only been transmitted to transgenic mice expressing homologous PrP (Asante *et al.*, 2013).

After *in vitro* adaptation of GSS A117V prions to the TgNN6h substrate, this isolate efficiently transmitted to TgNN6h mice with complete attack rates and incubation times shorter than those of other directly transmitted atypical strains (VPSPr-129V/V and GSS 6OPRI). Diseased animals showed neuropathological features that agreed with those of the human patient wherefrom the inoculum derived (San Millán *et al.*, oral communication at LXIV Reunión Annual de la Sociedad Española de Neurología) and of other human cases (Mastrianni *et al.*, 1995; Tagliavini *et al.*, 2001; Tateishi & Kitamoto, 1995). This suggests that strain properties were faithfully conserved through the *in vitro* amplification process, and so that *bona fide* propagation of the strain was achieved. This is in agreement with previous observations that glycosylation affects propagation capability but does not alter strain properties, which are encoded in the structural backbone of PrP^{Sc} molecules (Moudjou *et al.*, 2016; Piro *et al.*, 2009). Overall, our results indicate that lack of PrP^C glycosylation facilitates the transmission of GSS A117V prions to humanized transgenic models, including the maintenance of their phenotypic traits, although previous *in vitro* adaptation is needed given its intrinsically poor transmission capability.

Prion disease cases caused by octapeptide repeat insertions (OPRI), such as 6OPRI cases, show a remarkable variability in clinical presentation and neuropathological findings, which led physicians and neuropathologists to classify them sometimes as classical CJD cases and sometimes as GSS. Some authors prefer the term “prion disease with OPR” instead of CJD or GSS (Collinge *et al.*, 1992) and propose that the phenotype of the disease depend on the number of OPR insertions. Notably, despite the clinical and neuropathological presentation, PrP^{res} biochemical signature is normally classical, corresponding to either type 1 (21 kDa) or type 2 (19 kDa).

6OPRI cases have been described associated with both CJD and GSS phenotypes. It can be suggested that some 6OPRI cases appear as a mixture of classical and atypical components that can be separated and selectively amplified. The notion that brains from human patients of prion disease sometimes contain several isoforms of PrP^{Sc} is not new and has been proved for sCJD (Polymenidou *et al.*, 2005) and vCJD (Yull *et al.*, 2006) cases.

According to this, our 6OPRI isolate propagated well on Tg340 mice expressing normal human 129M/M PrP^C, in agreement with previous, although scarce, studies (Mead *et al.*, 2006). The phenotype in terms of incubation periods and neuropathology strongly resembled that of sCJDMM1 prions, which suggest that the propagation of a classical strain occurred in these mice. To our knowledge, this is the first description of the neuropathological phenotype of GSS 6OPRI in mice.

In striking contrast, TgNN6h inoculated with either direct or PMCA-adapted 6OPRI prions led to the development of a disease with a clearly distinct neuropathological picture, which included widespread distribution of coalescing and plaque-like deposits. According to our results, we propose that an atypical minor component in the 6OPRI isolate has been selectively propagated in the TgNN6h model. Slight changes in PrP^C glycosylation status are known to determine whether classical or atypical components in a mixture are selected for propagation (Katorcha *et al.*, 2014; Makarava *et al.*, 2013). Whether this selection of the atypical component occurred during *in vitro* amplification (serial PMCA rounds) or *in vivo* transmission (bioassay in TgNN6h) remains to be elucidated.

Neither PMCA-adapted GSS A117V nor GSS 6OPRI could be transmitted to Tg340 mice. The most straightforward conclusion is that the reintroduction of PrP^C glycosylation hinders the propagation of the atypical strain that has been amplified by serial rounds of TgNN6h-PMCA, although the mechanisms underlying this phenomenon would require further investigation. However, we cannot discard the possibility that the genotypic mismatches at codons 181 and 197 between Tg340 and TgNN6h are actually responsible for the impeded transmission of TgNN6h-adapted GSS A117V to Tg340. Even though these mutations seemed not to hinder the amplification of wild type human prions to TgNN6h substrate, the barrier could be unidirectional and affect only the retro-transmission of TgNN6h-adapted prions back to wild type human PrP in Tg340. This issue is currently being addressed by *in vitro* experiments.

All diseased TgNN6h mice showed similar phenotypes, associated to the presence of plaques or plaque-like PrP^{Sc} depositions mice, irrespectively of the inoculated strain. Given that the expression of non-glycosylated PrP^C in mice is known to promote plaque formation in atypical locations (Chesebro *et al.*, 2005; Tuzi *et al.*, 2008), the possibility remains that the observed phenotypes are due to a host effect. However, each atypical strain possessed some differential neuropathological feature: VPSPr showed severe affection of cerebellum, GSS A117V caused strong affection of cortices and hippocampus and presence of amorphous amyloid plaques, and GSS 6OPRI provoked milder presence of amyloid plaques and different vacuolization. This fact allows discarding, to some extent, that the host is the only determinant of this phenotype. Transmission of a prototypically classical strain, such as sCJDMM1, to TgNN6h and

manifestation of a classical phenotype would allow completely discarding this possibility. This experiment is currently underway.

References

- Aguilar-Calvo, P., Xiao, X., Bett, C., Erana, H., Soldau, K., Castilla, J., Nilsson, K. P., Surewicz, W. K., and Sigurdson, C. J. (2017). Post-translational modifications in PrP expand the conformational diversity of prions in vivo. *Scientific Reports*, *7*, 43295. doi:10.1038/srep43295 [doi]
- Asante, E. A., Grimshaw, A., Smidak, M., Jakubcova, T., Tomlinson, A., Jeelani, A., Hamdan, S., Powell, C., Joiner, S., Linehan, J. M., Brandner, S., Wadsworth, J. D., and Collinge, J. (2015). Transmission properties of human PrP 102L prions challenge the relevance of mouse models of GSS. *PLoS Pathogens*, *11*(7), e1004953. doi:10.1371/journal.ppat.1004953 [doi]
- Asante, E. A., Linehan, J. M., Smidak, M., Tomlinson, A., Grimshaw, A., Jeelani, A., Jakubcova, T., Hamdan, S., Powell, C., Brandner, S., Wadsworth, J. D., and Collinge, J. (2013). Inherited prion disease A117V is not simply a proteinopathy but produces prions transmissible to transgenic mice expressing homologous prion protein. *PLoS Pathogens*, *9*(9), e1003643. doi:10.1371/journal.ppat.1003643 [doi]
- Baker, H. F., Duchen, L. W., Jacobs, J. M., and Ridley, R. M. (1990). Spongiform encephalopathy transmitted experimentally from creutzfeldt-jakob and familial gerstmann-straussler-scheinker diseases. *Brain*, *113* (Pt 6)(Pt 6), 1891-1909. doi:10.1093/brain/113.6.1891 [doi]
- Bessen, R. A., and Marsh, R. F. (1994). Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *Journal of Virology*, *68*(12), 7859-7868.
- Brown, P., Gibbs, C. J., Jr, Rodgers-Johnson, P., Asher, D. M., Sulima, M. P., Bacote, A., Goldfarb, L. G., and Gajdusek, D. C. (1994). Human spongiform encephalopathy: The national institutes of health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Annals of Neurology*, *35*(5), 513-529. doi:10.1002/ana.410350504 [doi]
- Bruce, M. E. (1993). Scrapie strain variation and mutation. *British Medical Bulletin*, *49*(4), 822-838.
- Budka, H., Aguzzi, A., Brown, P., Brucher, J. M., Bugiani, O., Gullotta, F., Haltia, M., Hauw, J. J., Ironside, J. W., and Jellinger, K. (1995). Neuropathological diagnostic criteria for creutzfeldt-jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathology*, *5*(4), 459-466.
- Camacho, M. V., Telling, G., Kong, Q., Gambetti, P., and Notari, S. (2019). Role of prion protein glycosylation in replication of human prions by protein misfolding cyclic amplification. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, doi:10.1038/s41374-019-0282-1 [doi]
- Capellari, S., Vital, C., Parchi, P., Petersen, R. B., Ferrer, X., Jarnier, D., Pegoraro, E., Gambetti, P., and Julien, J. (1997). Familial prion disease with a novel 144-bp insertion in the prion protein gene in a basque family. *Neurology*, *49*(1), 133-141.
- Castilla, J., Saá, P., Hetz, C., and Soto, C. (2005). In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*, *121*(2), 195-206. doi:S0092-8674(05)00156-X [pii]
- Castilla, J., Saá, P., and Soto, C. (2005). Detection of prions in blood. *Nature Medicine*, *11*(9), 982-985. doi:nm1286 [pii]

Caughey, B., Race, R. E., Ernst, D., Buchmeier, M. J., and Chesebro, B. (1989). Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *Journal of Virology*, *63*(1), 175-181.

Collinge, J. (2010). Medicine. prion strain mutation and selection. *Science*, *328*(5982), 1111-1112. doi:10.1126/science.1190815 [doi]

Collinge, J., Brown, J., Hardy, J., Mullan, M., Rossor, M. N., Baker, H., Crow, T. J., Lofthouse, R., Poulter, M., and Ridley, R. (1992). Inherited prion disease with 144 base pair gene insertion. 2. clinical and pathological features. *Brain*, *115* (Pt 3)(Pt 3), 687-710.

Collinge, J., and Clarke, A. R. (2007). A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science*, *318*(5852), 930-936. doi:10.1126/science.1150530 [pii]

Chen, B., Morales, R., Barria, M. A., and Soto, C. (2010). Estimating prion concentration in fluids and tissues by quantitative PMCA. *Nature Methods*, *7*(7), 519-520. doi:10.1038/nmeth.1465 [doi]

Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., LaCasse, R., Raymond, L., Favara, C., Baron, G., Priola, S., Caughey, B., Masliah, E., and Oldstone, M. (2005). Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science*, *308*(5727), 1435-1439. doi:10.1126/science.1115030 [pii]

Franz, M., Eiden, M., Balkema-Buschmann, A., Greenlee, J., Schatzl, H., Fast, C., Richt, J., Hildebrandt, J. P., and Groschup, M. H. (2012). Detection of PrP(sc) in peripheral tissues of clinically affected cattle after oral challenge with bovine spongiform encephalopathy. *The Journal of General Virology*, *93*(Pt 12), 2740-2748. doi:10.1099/vir.0.044578-0 [doi]

Gambetti, P., Dong, Z., Yuan, J., Xiao, X., Zheng, M., Alsheklee, A., Castellani, R., Cohen, M., Barria, M. A., Gonzalez-Romero, D., Belay, E. D., Schonberger, L. B., Marder, K., Harris, C., Burke, J. R., Montine, T., Wisniewski, T., Dickson, D. W., Soto, C., Hulette, C. M., Mastrianni, J. A., Kong, Q., and Zou, W. Q. (2008). A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Annals of Neurology*, *63*(6), 697-708. doi:10.1002/ana.21420 [doi]

Gambetti, P., Kong, Q., Zou, W., Parchi, P., and Chen, S. G. (2003). Sporadic and familial CJD: Classification and characterisation. *British Medical Bulletin*, *66*, 213-239. doi:10.1093/bmb/66.1.213 [doi]

Haldiman, T., Kim, C., Cohen, Y., Chen, W., Blevins, J., Qing, L., Cohen, M. L., Langeveld, J., Telling, G. C., Kong, Q., and Safar, J. G. (2013). Co-existence of distinct prion types enables conformational evolution of human PrPSc by competitive selection. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(41), 29846-29861. doi:10.1074/jbc.M113.500108 [doi]

Hedman, C., Otero, A., Douet, J. Y., Lacroux, C., Lugan, S., Filali, H., Corbiere, F., Aron, N., Badiola, J. J., Andreoletti, O., and Bolea, R. (2018). Detection of PrPres in peripheral tissue in pigs with clinical disease induced by intracerebral challenge with sheep-passaged bovine spongiform encephalopathy agent. *PLoS One*, *13*(7), e0199914. doi:10.1371/journal.pone.0199914 [doi]

Hill, A. F., Joiner, S., Wadsworth, J. D., Sidle, K. C., Bell, J. E., Budka, H., Ironside, J. W., and Collinge, J. (2003). Molecular classification of sporadic creutzfeldt-jakob disease. *Brain*, *126*(Pt 6), 1333-1346.

Katorcha, E., Makarava, N., Savtchenko, R., D'Azzo, A., and Baskakov, I. V. (2014). Sialylation of prion protein controls the rate of prion amplification, the cross-species barrier, the ratio of PrPSc glycoform and prion infectivity. *PLoS Pathogens*, *10*(9), e1004366. doi:10.1371/journal.ppat.1004366 [doi]

- King, A., Doey, L., Rossor, M., Mead, S., Collinge, J., and Lantos, P. (2003). Phenotypic variability in the brains of a family with a prion disease characterized by a 144-base pair insertion in the prion protein gene. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 29(2), 98-105. doi:423 [pii]
- Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry*, 54, 631-664. doi:10.1146/annurev.bi.54.070185.003215 [doi]
- Korth, C., Kaneko, K., and Prusiner, S. B. (2000). Expression of unglycosylated mutated prion protein facilitates PrP(sc) formation in neuroblastoma cells infected with different prion strains. *The Journal of General Virology*, 81(Pt 10), 2555-2563.
- Kretzschmar, H. A., Neumann, M., and Stavrou, D. (1995). Codon 178 mutation of the human prion protein gene in a german family (backer family): Sequencing data from 72-year-old celloidin-embedded brain tissue. *Acta Neuropathologica*, 89(1), 96-98.
- Locht, C., Chesebro, B., Race, R., and Keith, J. M. (1986). Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(17), 6372-6376.
- Makarava, N., Savtchenko, R., and Baskakov, I. V. (2013). Selective amplification of classical and atypical prions using modified protein misfolding cyclic amplification. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(1), 33-41. doi:10.1074/jbc.M112.419531 [doi]
- Manson, J. C., Jamieson, E., Baybutt, H., Tuzi, N. L., Barron, R., McConnell, I., Somerville, R., Ironside, J., Will, R., Sy, M. S., Melton, D. W., Hope, J., and Bostock, C. (1999). A single amino acid alteration (101L) introduced into murine PrP dramatically alters incubation time of transmissible spongiform encephalopathy. *The EMBO Journal*, 18(23), 6855-6864. doi:10.1093/emboj/18.23.6855 [doi]
- Mastrianni, J. A., Curtis, M. T., Oberholtzer, J. C., Da Costa, M. M., DeArmond, S., Prusiner, S. B., and Garbern, J. Y. (1995). Prion disease (PrP-A117V) presenting with ataxia instead of dementia. *Neurology*, 45(11), 2042-2050. doi:10.1212/wnl.45.11.2042 [doi]
- Mead, S., Poulter, M., Beck, J., Webb, T. E., Campbell, T. A., Linehan, J. M., Desbruslais, M., Joiner, S., Wadsworth, J. D., King, A., Lantos, P., and Collinge, J. (2006). Inherited prion disease with six octapeptide repeat insertional mutation--molecular analysis of phenotypic heterogeneity. *Brain : A Journal of Neurology*, 129(Pt 9), 2297-2317. doi:129/9/2297 [pii]
- Minikel, E. V., Vallabh, S. M., Lek, M., Estrada, K., Samocha, K. E., Sathirapongsasuti, J. F., McLean, C. Y., Tung, J. Y., Yu, L. P., Gambetti, P., Blevins, J., Zhang, S., Cohen, Y., Chen, W., Yamada, M., Hamaguchi, T., Sanjo, N., Mizusawa, H., Nakamura, Y., Kitamoto, T., Collins, S. J., Boyd, A., Will, R. G., Knight, R., Ponto, C., Zerr, I., Kraus, T. F., Eigenbrod, S., Giese, A., Calero, M., de Pedro-Cuesta, J., Haik, S., Laplanche, J. L., Bouaziz-Amar, E., Brandel, J. P., Capellari, S., Parchi, P., Poggi, A., Ladogana, A., O'Donnell-Luria, A. H., Karczewski, K. J., Marshall, J. L., Boehnke, M., Laakso, M., Mohlke, K. L., Kahler, A., Chambert, K., McCarroll, S., Sullivan, P. F., Hultman, C. M., Purcell, S. M., Sklar, P., van der Lee, S. J., Rozemuller, A., Jansen, C., Hofman, A., Kraaij, R., van Rooij, J. G., Ikram, M. A., Uitterlinden, A. G., van Duijn, C. M., Exome Aggregation Consortium (ExAC), Daly, M. J., and MacArthur, D. G. (2016). Quantifying prion disease penetrance using large population control cohorts. *Science Translational Medicine*, 8(322), 322ra9. doi:10.1126/scitranslmed.aad5169 [doi]
- Moudjou, M., Chapuis, J., Mekrouti, M., Reine, F., Herzog, L., Sibille, P., Laude, H., Vilette, D., Andreoletti, O., Rezaei, H., Dron, M., and Beringue, V. (2016). Glycoform-independent prion conversion by highly efficient, cell-based, protein misfolding cyclic amplification. *Scientific Reports*, 6, 29116. doi:10.1038/srep29116 [doi]

Murayama, Y., Yoshioka, M., Masujin, K., Okada, H., Iwamaru, Y., Imamura, M., Matsuura, Y., Fukuda, S., Onoe, S., Yokoyama, T., and Mohri, S. (2010). Sulfated dextrans enhance in vitro amplification of bovine spongiform encephalopathy PrP(sc) and enable ultrasensitive detection of bovine PrP(sc). *PLoS One*, *5*(10), 10.1371/journal.pone.0013152. doi:10.1371/journal.pone.0013152 [doi]

Nishina, K. A., Deleault, N. R., Mahal, S. P., Baskakov, I., Luhrs, T., Riek, R., and Supattapone, S. (2006). The stoichiometry of host PrPC glycoforms modulates the efficiency of PrPSc formation in vitro. *Biochemistry*, *45*(47), 14129-14139. doi:10.1021/bi061526k [doi]

Nonno, R., Angelo Di Bari, M., Agrimi, U., and Pirisinu, L. (2016). Transmissibility of gerstmann-straussler-scheinker syndrome in rodent models: New insights into the molecular underpinnings of prion infectivity. *Prion*, *10*(6), 421-433. doi:10.1080/19336896.2016.1239686 [doi]

Nonno, R., Notari, S., Di Bari, M. A., Cali, I., Pirisinu, L., d'Agostino, C., Cracco, L., Kofskey, D., Vanni, I., Lavrich, J., Parchi, P., Agrimi, U., and Gambetti, P. (2019). Variable protease-sensitive prionopathy transmission to bank voles. *Emerging Infectious Diseases*, *25*(1), 73-81. doi:10.3201/eid2501.180807 [doi]

Notari, S., Xiao, X., Espinosa, J. C., Cohen, Y., Qing, L., Aguilar-Calvo, P., Kofskey, D., Cali, I., Cracco, L., Kong, Q., Torres, J. M., Zou, W., and Gambetti, P. (2014). Transmission characteristics of variably protease-sensitive prionopathy. *Emerging Infectious Diseases*, *20*(12), 2006-2014. doi:10.3201/eid2012.140548 [doi]

Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., and Hood, L. E. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, *40*(4), 735-746. doi:0092-8674(85)90333-2 [pii]

Owen, F., Poulter, M., Collinge, J., Leach, M., Lofthouse, R., Crow, T. J., and Harding, A. E. (1992). A dementing illness associated with a novel insertion in the prion protein gene. *Brain Research.Molecular Brain Research*, *13*(1-2), 155-157.

Padilla, D., Beringue, V., Espinosa, J. C., Andreoletti, O., Jaumain, E., Reine, F., Herzog, L., Gutierrez-Adan, A., Pintado, B., Laude, H., and Torres, J. M. (2011). Sheep and goat BSE propagate more efficiently than cattle BSE in human PrP transgenic mice. *PLoS Pathogens*, *7*(3), e1001319. doi:10.1371/journal.ppat.1001319 [doi]

Peden, A. H., Sarode, D. P., Mulholland, C. R., Barria, M. A., Ritchie, D. L., Ironside, J. W., and Head, M. W. (2014). The prion protein protease sensitivity, stability and seeding activity in variably protease sensitive prionopathy brain tissue suggests molecular overlaps with sporadic creutzfeldt-jakob disease. *Acta Neuropathologica Communications*, *2*, 152-014-0152-4. doi:10.1186/s40478-014-0152-4 [doi]

Piccardo, P., Manson, J. C., King, D., Ghetti, B., and Barron, R. M. (2007). Accumulation of prion protein in the brain that is not associated with transmissible disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(11), 4712-4717. doi:0609241104 [pii]

Pirisinu, L., Di Bari, M. A., D'Agostino, C., Marcon, S., Riccardi, G., Poleggi, A., Cohen, M. L., Appleby, B. S., Gambetti, P., Ghetti, B., Agrimi, U., and Nonno, R. (2016). Gerstmann-straussler-scheinker disease subtypes efficiently transmit in bank voles as genuine prion diseases. *Scientific Reports*, *6*, 20443. doi:10.1038/srep20443 [doi]

Pirisinu, L., Nonno, R., Esposito, E., Benestad, S. L., Gambetti, P., Agrimi, U., and Zou, W. Q. (2013). Small ruminant nor98 prions share biochemical features with human gerstmann-straussler-scheinker disease and variably protease-sensitive prionopathy. *PLoS One*, *8*(6), e66405. doi:10.1371/journal.pone.0066405 [doi]

- Piro, J. R., Harris, B. T., Nishina, K., Soto, C., Morales, R., Rees, J. R., and Supattapone, S. (2009). Prion protein glycosylation is not required for strain-specific neurotropism. *Journal of Virology*, *83*(11), 5321-5328. doi:10.1128/JVI.02502-08 [doi]
- Polymenidou, M., Stoeck, K., Glatzel, M., Vey, M., Bellon, A., and Aguzzi, A. (2005). Coexistence of multiple PrPSc types in individuals with creutzfeldt-jakob disease. *The Lancet. Neurology*, *4*(12), 805-814. doi:S1474-4422(05)70225-8 [pii]
- Priola, S. A. (1999). Prion protein and species barriers in the transmissible spongiform encephalopathies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *53*(1), 27-33. doi:S0753332299800572 [pii]
- Priola, S. A., and Lawson, V. A. (2001). Glycosylation influences cross-species formation of protease-resistant prion protein. *The EMBO Journal*, *20*(23), 6692-6699. doi:10.1093/emboj/20.23.6692 [doi]
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, *216*(4542), 136-144.
- Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D., and Carlson, G. A. (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, *63*(4), 673-686. doi:0092-8674(90)90134-Z [pii]
- Saá, P., Castilla, J., and Soto, C. (2006a). Presymptomatic detection of prions in blood. *Science*, *313*(5783), 92-94. doi:313/5783/92 [pii]
- Saá, P., Castilla, J., and Soto, C. (2006b). Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(46), 35245-35252. doi:M603964200 [pii]
- Saborio, G. P., Permanne, B., and Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, *411*(6839), 810-813. doi:10.1038/35081095 [doi]
- Scott, M., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., Walchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S. J., Westaway, D., and Prusiner, S. B. (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell*, *59*(5), 847-857. doi:0092-8674(89)90608-9 [pii]
- Scott, M. R., Peretz, D., Nguyen, H. O., Dearmond, S. J., and Prusiner, S. B. (2005). Transmission barriers for bovine, ovine, and human prions in transgenic mice. *Journal of Virology*, *79*(9), 5259-5271. doi:79/9/5259 [pii]
- Somerville, R. A., Chong, A., Mulqueen, O. U., Birkett, C. R., Wood, S. C., and Hope, J. (1997). Biochemical typing of scrapie strains. *Nature*, *386*(6625), 564. doi:10.1038/386564a0 [doi]
- Tagliavini, F., Lievens, P. M., Tranchant, C., Warter, J. M., Mohr, M., Giaccone, G., Perini, F., Rossi, G., Salmona, M., Piccardo, P., Ghetti, B., Beavis, R. C., Bugiani, O., Frangione, B., and Prelli, F. (2001). A 7-kDa prion protein (PrP) fragment, an integral component of the PrP region required for infectivity, is the major amyloid protein in gerstmann-straussler-scheinker disease A117V. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(8), 6009-6015. doi:10.1074/jbc.M007062200 [doi]
- Takada, L. T., Kim, M. O., Cleveland, R. W., Wong, K., Forner, S. A., Gala, I. I., Fong, J. C., and Geschwind, M. D. (2017). Genetic prion disease: Experience of a rapidly progressive dementia center in the united states and a review of the literature. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics*, *174*(1), 36-69. doi:10.1002/ajmg.b.32505 [doi]

- Tateishi, J., and Kitamoto, T. (1995). Inherited prion diseases and transmission to rodents. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 5(1), 53-59.
- Tateishi, J., Kitamoto, T., Hoque, M. Z., and Furukawa, H. (1996). Experimental transmission of creutzfeldt-jakob disease and related diseases to rodents. *Neurology*, 46(2), 532-537.
- Telling, G. C., Parchi, P., DeArmond, S. J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P., and Prusiner, S. B. (1996). Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science*, 274(5295), 2079-2082.
- Torres, J. M., Espinosa, J. C., Aguilar-Calvo, P., Herva, M. E., Relano-Gines, A., Villa-Diaz, A., Morales, M., Parra, B., Alamillo, E., Brun, A., Castilla, J., Molina, S., Hawkins, S. A., and Andreoletti, O. (2014). Elements modulating the prion species barrier and its passage consequences. *PLoS One*, 9(3), e89722. doi:10.1371/journal.pone.0089722 [doi]
- Tuzi, N. L., Cancellotti, E., Baybutt, H., Blackford, L., Bradford, B., Plinston, C., Coghill, A., Hart, P., Piccardo, P., Barron, R. M., and Manson, J. C. (2008). Host PrP glycosylation: A major factor determining the outcome of prion infection. *PLoS Biology*, 6(4), e100. doi:10.1371/journal.pbio.0060100 [doi]
- Vital, C., Gray, F., Vital, A., Parchi, P., Capellari, S., Petersen, R. B., Ferrer, X., Jarnier, D., Julien, J., and Gambetti, P. (1998). Prion encephalopathy with insertion of octapeptide repeats: The number of repeats determines the type of cerebellar deposits. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 24(2), 125-130.
- Wang, Z., Yuan, J., Shen, P., Abskharon, R., Lang, Y., Dang, J., Adornato, A., Xu, L., Chen, J., Feng, J., Moudjou, M., Kitamoto, T., Lee, H. G., Kim, Y. S., Langeveld, J., Appleby, B., Ma, J., Kong, Q., Petersen, R. B., Zou, W. Q., and Cui, L. (2019). In vitro seeding activity of glycoform-deficient prions from variably protease-sensitive prionopathy and familial CJD associated with PrP(V180I) mutation. *Molecular Neurobiology*, 56(8), 5456-5469. doi:10.1007/s12035-018-1459-0 [doi]
- Wiseman, F. K., Cancellotti, E., Piccardo, P., Iremonger, K., Boyle, A., Brown, D., Ironside, J. W., Manson, J. C., and Diack, A. B. (2015). The glycosylation status of PrPC is a key factor in determining transmissible spongiform encephalopathy transmission between species. *Journal of Virology*, 89(9), 4738-4747. doi:10.1128/JVI.02296-14 [doi]
- Yull, H. M., Ritchie, D. L., Langeveld, J. P., van Zijderveld, F. G., Bruce, M. E., Ironside, J. W., and Head, M. W. (2006). Detection of type 1 prion protein in variant creutzfeldt-jakob disease. *The American Journal of Pathology*, 168(1), 151-157. doi:S0002-9440(10)62078-0 [pii]
- Zou, W. Q., Puoti, G., Xiao, X., Yuan, J., Qing, L., Cali, I., Shimoji, M., Langeveld, J. P., Castellani, R., Notari, S., Crain, B., Schmidt, R. E., Geschwind, M., Dearmond, S. J., Cairns, N. J., Dickson, D., Honig, L., Torres, J. M., Mastrianni, J., Capellari, S., Giaccone, G., Belay, E. D., Schonberger, L. B., Cohen, M., Perry, G., Kong, Q., Parchi, P., Tagliavini, F., and Gambetti, P. (2010). Variably protease-sensitive prionopathy: A new sporadic disease of the prion protein. *Annals of Neurology*, 68(2), 162-172. doi:10.1002/ana.22094 [doi]

**Distribution of neurotrophins and
role of p75^{NTR} receptor in
neurodegeneration in natural and
experimental scrapie models**

Distribution of neurotrophins and role of p75^{NTR} receptor in neurodegeneration in natural and experimental scrapie models

Neurotrophins constitute a group of growth factor that exerts important functions in the nervous system of vertebrates. They act through two classes of transmembrane receptors: three types of tyrosine-kinase receptors, and the p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}). The activation of p75^{NTR} can favor cell survival or apoptosis depending on diverse factors, such as the presence of cofactors or the coexpression of other related receptors. Several studies proved a relationship between p75^{NTR} and the pathogenesis of prion disease. In this work, we investigated the distribution of p75^{NTR} in the brain of naturally scrapie-affected sheep and experimentally infected transgenic mice using an immunohistochemical approach, as well as its correlation with other markers of prion disease.

Immunohistochemistry against p75^{NTR} labelled both neurons and glial cells whose morphology and distribution resembled those of astrocytes. Infected mice showed higher abundance of this pattern than their non-infected counterparts. This astrocytic labeling correlated with other neuropathological alterations of prion disease including spongiosis, PrP^{Sc} accumulation and gliosis. Confocal microscopy demonstrated the collocation of p75^{NTR} and the astrocyte-specific marker GFAP, suggesting an involvement of astrocytes in p75^{NTR}-mediated neurodegeneration.

In contrast, p75^{NTR} staining in sheep lacked the astrocytic labeling. Visual assessment of neuronal and neuropil patterns identified no differences between infected and control animals; however, digital image analyses revealed increased labelling intensities in preclinical sheep compared with control, non-infected sheep in several brain nuclei. This suggests that this receptor is overexpressed in early stages of prion-related neurodegeneration in sheep. Whether this overexpression is a primary cause or a secondary event triggered by misfolded protein accumulation or other mechanisms remains to be elucidated.

Introduction

Neurotrophins are a group of growth factors that exert important functions in the nervous system of vertebrates. They are synthesized and secreted by neurons and other cell types and regulate critical processes, from neuron maturation and synaptic plasticity to maintenance of the nervous tissue during adulthood (Bibel & Barde, 2000; Meeker & Williams, 2015). Their activity has been linked to a number of neuropathological conditions, and changes in their expression have been observed as a response to cell and tissue damage (Dawbarn & Allen, 2003; Shu *et al.*, 2015).

Neurotrophins constitute a family of structurally and functionally related peptides that include the nerve growth factor (NGF), the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and the neurotrophin 3 (NT-3), among others (Meeker & Williams, 2015). All of them are synthesized in the form of pro-neurotrophins, which are later processed intra or extra-cellularly and converted into their mature forms (Lu *et al.*, 2005; Teng *et al.*, 2010).

Neurotrophins action depends on two types of transmembrane receptors: the tyrosine-kinase receptors TrkA, TrkB and TrkC, and the p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}), that belongs to the tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily (Segal, 2003). While Trk receptors A, B and C join to mature forms of NGF, BDNF and NT-3, respectively, and trigger pro-survival signals, p75^{NTR} respond to both pre-processed and mature forms, although it has higher affinity for pro-neurotrophins (Meeker & Williams, 2015; Teng *et al.*, 2010). In both cases this receptor activates alternative signaling pathways leading to apoptosis and cell death (Bibel & Barde, 2000). Interestingly, p75^{NTR} is also able to interact with other membrane elements, including Trk receptors, in which case it increases their affinity for mature neurotrophins and contributes to pro-survival signaling (Bibel *et al.*, 1999; Hempstead *et al.*, 1991), and with sortilin, which participates in the apoptosis outcome through not-yet clarified ways (Meeker & Williams, 2015; Nykjaer & Willnow, 2012).

For all these reasons, p75^{NTR} is positioned in the crossroad between cell survival and death and thus has attracted interest due to its potential use as a biomarker for neurodegenerative disorders and, more importantly, as a therapeutic agent.

Prion diseases represent a new paradigm of neurodegenerative conditions. They are caused by unconventional transmissible agents called prions, which are thought to consist exclusively of a misfolded protein (PrP^{Sc}) with the ability to transfer its aberrant conformation to the otherwise healthy, physiological protein PrP^C (Prusiner, 1982; Prusiner, 1991). The accumulation of the pathogenic isoform in the brain triggers currently unclarified mechanisms that lead to a neurodegenerative disorder characterized by spongiosis, gliosis, and sometimes presence of amyloid plaques (Budka *et al.*, 1995; Lazarini *et al.*, 1994; Ligios *et al.*, 2002; Rezaie & Lantos, 2001; Wood *et al.*, 1997).

Prions infect multiple species, including human beings and domestic animals. Bovine spongiform encephalopathy (BSE) affects cattle and can be transmitted to humans through consumption of contaminated meat, causing the variant form of Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) (Hill *et al.*, 1997). For its part, sheep suffer a form of prion disease called scrapie, which transmits naturally between individuals. Prion diseases can be experimentally induced in transgenic mice expressing the cellular prion protein (PrP^C) of other species, via intracerebral inoculation with brain material of infected individuals (Groschup & Buschmann, 2008). These murine models recapitulate most of

the features of the disorder in the original hosts, and have been routinely employed for the study of all facets of TSEs (Bencsik *et al.*, 2007; Bruce *et al.*, 2002; Thackray *et al.*, 2011).

Studies addressing the relationship between prion pathogenesis and neurotrophins, although scarce, go in line with several pieces of evidence that link these growth factors and neurodegeneration. One example of such studies proved that PrP₁₀₆₋₁₂₆, a synthetic peptide homologous to the fragment between amino acids 106 and 126 of human PrP, was able to induce apoptosis in an *in vitro* model (N2a cells) through the activation of p75^{NTR} and the nuclear factor κ B (NF- κ B); this suggests some kind of direct interaction between these molecules (Bai *et al.*, 2008; Della-Bianca *et al.*, 2001). Other study, this time using an *in vivo* approach, found a positive correlation between the neuropathological hallmarks of prion disease (spongiosis, PrP^{Sc} accumulation and gliosis) and overexpression of p75^{NTR} in a bovinized murine model inoculated with BSE (Marco-Salazar *et al.*, 2014). A third work evidenced a decrease in the levels of p75^{NTR} and other related factors in the brain of scrapie-infected hamsters, which was progressive throughout the course of the disease and correlated with PrP^{Sc} accumulation and neuron death (Wang *et al.*, 2016).

These works have prompted the interest of the scientific community and thus, neurotrophins have been proposed as potential biomarkers for TSEs, possible therapeutic agents, or target molecules whose study may shed light on the pathogenesis of prion diseases and other neurodegenerative conditions.

In this study, we analyzed the distribution of several neurotrophins and neurotrophin receptors in brain samples sourced from two different models of scrapie: sheep as the natural host, and ovinized mice from the transgenic line Tg338 as an experimental model. After a pilot study to determine the most changing neurotrophins in scrapie-affected animals, that confirmed previous observations in other experimental scenarios (Marco-Salazar *et al.*, 2014), we focused on the p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) and decided to further investigate its distribution, expression and correlation with other markers of prion disease.

Materials and methods

Sheep. Sheep included in this study belonged to three different groups: control, preclinical and clinical. Clinical animals were diagnosed through assessment of clinical signs and sacrificed in the terminal stage of the disease; diagnosis was later confirmed by detection of PrP^{Sc} in their brains by immunohistochemical procedures. Preclinical animals were identified by immunohistochemical detection of PrP^{Sc} in samples of rectal mucosa-associated lymphoid tissue obtained by rectal biopsy, as previously described (Monleon *et al.*, 2011), and confirmed post-mortem. Control animals were

sacrificed without clinical signs at ages similar to those of the other groups and were negative to PrP^{Sc} immunohistochemical detection. After sacrifice, complete necropsy and sampling was performed. Brains were sectioned and fixed in 10% formalin for at least 48 hours before processing.

Mice. The Tg338 line used in this study carries the ovine prion protein gene (*Prnp*) and expresses ovine PrP^C (VRQ) under the control of the ovine *Prnp* promoter at levels 8 to 10-fold that of sheep brain (Vilotte *et al.*, 2001). They were inoculated with either physiological saline (control group) or an adapted scrapie isolate, i.e. a pool of brain homogenates from Tg338 mice inoculated with a natural case of scrapie. Inoculation was performed by the intracerebral route using a precision syringe and under general anesthesia; after inoculation, they were provided adequate analgesia. Mice were caged together and monitored three times per week. The terminal group was sacrificed at the end stage of disease, while the preclinical group was culled before the onset of clinical signs. The control group was culled at similar ages. Sacrifice was done by cervical dislocation under heavy anesthesia. After sacrifice, brains were harvested and fixed in 10% formalin for at least 48 hours.

Ethics. All experimental procedures in this study were approved by the Ethics Committee for Animal Testing of the University of Zaragoza (permit numbers PI02/08 and PI19/14) and performed in strict accordance with the recommendations for the care and use of experimental animals and in agreement with national law (RD 1201/05).

Tissue processing. Mouse brains were trimmed in four sections as previously described for assessment of prion lesions (Fraser & Dickinson, 1968), while sheep samples were processed following and adapted protocol. Tissues were then embedded in paraffin wax and mounted in appropriate cassettes. 4 µm-thick sections were obtained using a microtome and recovered on slides or nitrocellulose membranes for subsequent analysis.

Immunohistochemistry. Dewaxing and rehydration of the sections was achieved by sequential immersion in graded alcohols. For neurotrophins immunohistochemistry, a heat-induced antigen retrieval step was included by incubating the samples in citrate buffer at 96°C for 20 min, while for GFAP this step was skipped. Endogen peroxidase activity was blocked using a commercial blocking solution (Dako Agilent), followed by overnight incubation with primary antibodies raised against NGF (Sigma-Aldrich), BDNF, NT-3, TrkA, TrkB, TrkC and p75NTR (Abcam), or by one-hour incubation with an anti-GFAP antibody (Dako Agilent). The EnVision+ System (Agilent Dako) was used as the secondary antibody in all cases, followed by development with the DAB+ System (Agilent Dako). Counterstaining of the samples was performed with haematoxylin.

Haematoxylin-eosin (H&E) staining. Dewaxing and rehydration of preparations by sequential immersion in xylene and graded alcohols was followed by incubation in a haematoxylin solution. After rinsing with tap water, preparations were incubated in acid alcohol (1% acetic acid in a 70% ethanol solution) and then counterstained with an eosin solution. Finally, preparations were dehydrated and mounted prior to visualization under light microscope.

Paraffin-embedded tissue blot. Mice brain samples were subjected to PET-blot as described elsewhere (Schulz-Schaeffer *et al.*, 2000). Briefly, 4- μ m paraffin-embedded brain sections were collected onto a nitrocellulose membrane and dried at 37°C for 24 hours. Membranes were then subjected to dewaxing and rehydration and incubated for 2 hours in a solution of proteinase K (250 μ g/ml) at 56°C to completely digest PrP^C. Denaturation of the remaining PrP^{res} was achieved by incubating the membranes in a solution of guanidine thiocyanate 3M. After blocking the membrane with 0.2% BSA to avoid cross-reactivity, detection was carried out through sequential incubation with the anti-PrP antibody Sha31 (1:8,000) (SPI-Bio) and a secondary alkaline phosphatase (AP)-conjugated antibody (Agilent Dako), followed by development with NBT/BCIP (Thermo Scientific). Membranes were then washed and dried for 24 hours at room temperature.

Semi-quantitative assessments. Spongiosis and PrP^{Sc} deposition were evaluated in H&E-stained and PET-blotted or immunostained brain sections from both mice and sheep. Glial p75^{NTR} and GFAP immunostaining were also measured in mice brains. A semi-quantitative standardized methodology was used by attributing scores from 0 (total absence) to 4 (abundant presence) to each parameter in pre-determined brain areas. The average score for each area was computed as the arithmetic mean of the scores in each experimental group (control, preclinical and terminal).

Image analysis. Microphotographs of sheep and mouse brain areas and nuclei were taken using an Axioskop 40 microscope and an AxioCam MRC5 camera (Zeiss) and the software AxioVision40 v4.6.3.0 (Zeiss). At least three microphotographs of each area or nuclei were taken. The software ImageJ was used for image analysis. Briefly, microphotographs were subjected to color deconvolution using the algorithm for DAB-stained samples. The mean gray value of the processed images was measured and these values were employed to calculate the optical density (OD) of the pictures applying the formula $OD = \log(\text{max intensity}/\text{mean intensity})$, where max intensity = 255 for 8-bit images. The average optical density for each area or nucleus was computed as the arithmetic mean of measured optical density values.

Statistics. Graphical representations and statistical analyses of data were done using the software GraphPad Prism 5. In all cases, Shapiro-Wilk and Kolmogórov-Smirnov tests were applied prior to further analyses, in order to assess the normality of the data, which led to the selection of non-parametric tests. The Kruskal-Wallis test was

used to search for differences among control, preclinical and clinical mice and sheep groups, and was followed by pairwise comparisons using Dunn's post-hoc test. Finally, correlations between total p75^{NTR} immunolabeling, glial p75^{NTR} immunolabeling, spongiosis, PrP^{Sc} deposition and astrogliosis were studied using Spearman's correlation coefficients.

Confocal microscopy. Dewaxing, rehydration and heat-induced antigen retrieval was performed as for immunohistochemistry. To avoid background signal caused by paraffin green autofluorescence, sections were immersed in a solution of Sudan Black B (SBB) for 10 minutes and protected from light, followed by rinsing with 70% ethanol. Endogenous enzymatic activity was blocked with 10% fetal bovine serum for 60 min, and then, samples were incubated with a mixture of two primary antibodies raised in distinct species (rabbit anti-p75^{NTR} antibody (Abcam) and either mouse anti-GFAP antibody (Dako Agilent) or mouse anti-PrP antibody L42 (SPI-Bio)), at 4°C overnight. Next, two fluorophore-conjugated secondary antibodies, emitting at different wavelengths (Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor Plus 594) were employed to visualize the attachment of each of the primary antibodies. Slides were examined using a LSM 510 equipment (Zeiss).

Results

Mapping of neurotrophins and neurotrophin receptors in the brain reveals different staining patterns among markers and between models

Three neurotrophins (NGF, BDNF and NT-3) and four neurotrophin receptors (TrkA, TrkB, TrkC and p75^{NTR}) were mapped in the brain of sheep and mice to investigate their distribution and expression in both models. Samples from both infected and uninfected individuals were included in this pilot experiment to assess whether differences would arise from the study of a limited number of samples, in order to select markers for further, more in-depth analyses.

Each combination of marker and model (ovine or murine) gave a distinctive distribution pattern; however no clear association with the disease was observed in any case, except for p75^{NTR} in mice.

NGF. In both mice and sheep, NGF showed an evident neuronal labeling together with neuropil staining of variable intensity. In neuronal bodies, immunostaining was located in the cytoplasm and sometimes in the nucleus. Considering that neurotrophins are synthesized as precursors in the endoplasmic reticulum / Golgi and then secreted, nuclear staining is likely to be artefactual. Staining of other cell types or structures in the brain was not observed, suggesting that the distribution of NGF in brain is restricted to neurons at both the pericarion and their projections through the neuropil.

This labeling pattern was ubiquitous in medulla oblongata (**Fig. 1A-D**), midbrain, cortices and hippocampus of both infected and control mice and in medulla oblongata and hippocampus of sheep. Neuropil staining seemed to be weaker in infected animals of both species; however this difference was very subtle and was not taken into account.

BDNF. Mice immunostained for BDNF showed an intracytoplasmic and nuclear neuronal staining with mild neuropil labeling, similar to those of NGF (**Fig. 1E, F**). Sheep replicated this same distribution pattern (**Fig. 1G, H**). No evident differences were detected between infected and control individuals on either sheep or mice. The distributions of NGF and BDNF seemed fairly similar, suggesting similar or parallel roles in the nervous tissue.

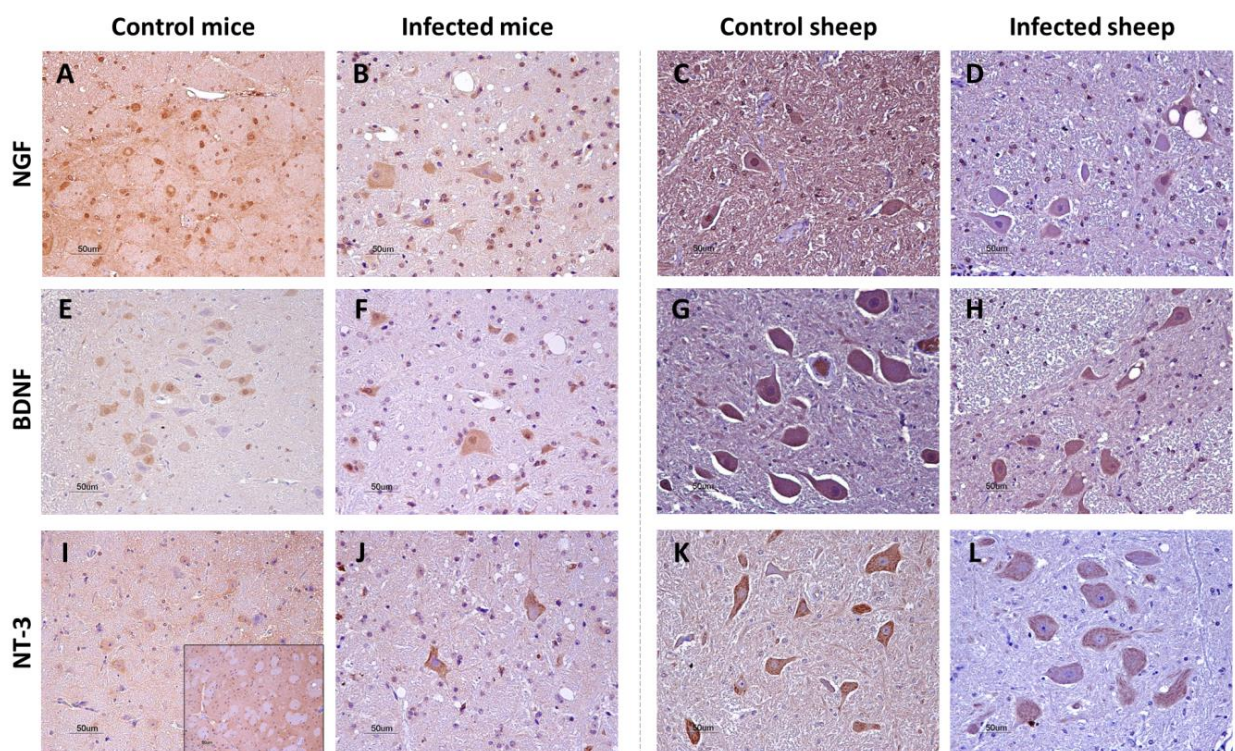


Fig.1. Neurotrophins in the brain of infected and control mice and sheep. Microphotographs taken from medulla oblongata, except (I [inset]) which was taken from striatum.

NT-3. In control mice, NT-3 immunostaining followed a low intensity intracytoplasmic neuronal pattern (**Fig. 1I**) together with a diffuse neuropil labeling, which was very conspicuous in the striatum, in contrast with white matter tracts (**Fig. 1I [inset]**). The neuronal staining seemed to be higher in infected mice (**Fig. 1J**) although in general differences with control mice were poor. Intracytoplasmic neuronal labelling in sheep were clearly granulated (**Fig.1 K, L**) and more intense than that of mice, while differences between control and infected sheep were subtly and did not prompt any interest for further studies.

TrkA. The NGF-specific tyrosine-kinase receptor *TrkA* followed a weak and inconstant intraneuronal labelling in both mice (**Fig. 2A [inset]**, medulla oblongata) and sheep (**Fig. 2D**, Purkinje cells in cerebellum and **Fig.2C [inset]**, hippocampus). Remarkably considering that it is a membrane receptor, no perineuronal pattern was noted. It was also detected at the level of neuropil. No differences between infected and controls were found.

TrkB. In agreement with the fact that it is a membrane receptor, *TrkB* was located at the level of neuron membranes (perineuronal labelling) and of neuron prolongations through neuropil (**Fig. 2E**). This pattern was clearly observed in control mice, while in infected mice it was less evident (**Fig. 2F**). In contrast, neither infected nor control sheep manifested this perineuronal pattern, but both showed a mild granular intracytoplasmic staining, similar to that seen for NT-3 (**Fig. 2G-H**).

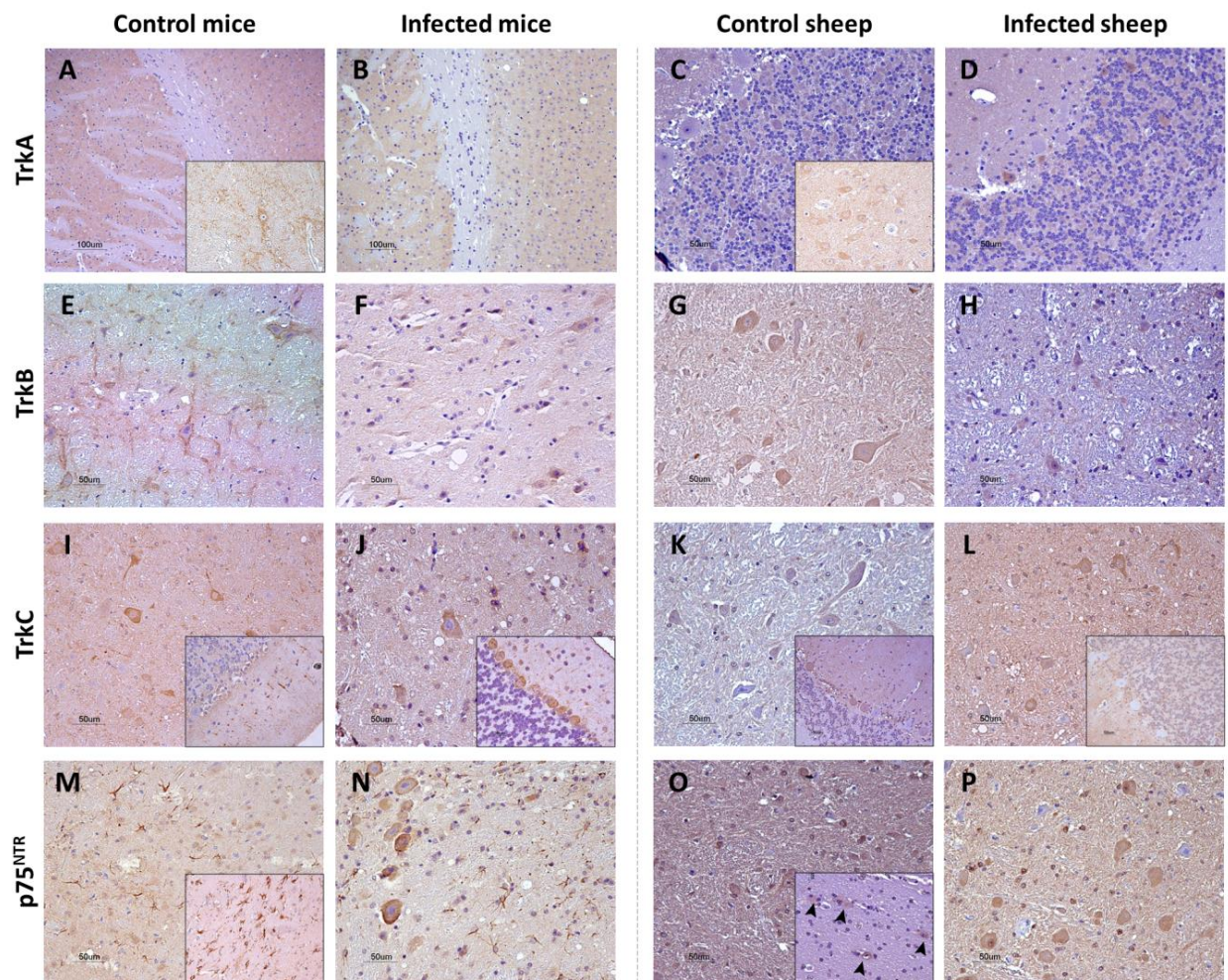


Fig.2. Neurotrophin receptors in the brain of infected and control mice and sheep. Microphotographs taken from frontal cortex/striatum (A-B), medulla oblongata (E-P and A [inset]), cerebellar cortex (C-D and I-L [insets]), hippocampus (C[inset] and O [inset]) and corpus callosum (M [inset]).

TrkC. In control mice, *TrkC* followed a neuronal intracytoplasmic staining pattern together with a conspicuous labeling of neuron branching. These branches were particularly notorious in the molecular layer of cerebellar cortex, probably corresponding to Bergmann radial glia (**Fig. 2I [inset]**). In addition to these features, infected mice showed strong labeling of Purkinje neurons in the cerebellum (**Fig. 2J [inset]**). In sheep, the intracytoplasmic labeling was weaker and, in opposition with the situation in mice, Purkinje cells staining was only noted in control, but not in infected sheep (**Fig. 2K-L [insets]**).

p75^{NTR}. Remarkably, *p75* neurotrophin receptor manifested two distinct, clearly differentiable immunostaining patterns. As the rest of neurotrophins and receptors, the first pattern was a neuronal intracytoplasmic staining that was observed in all brain areas and in both mice and sheep (**Fig. 2M-P**). An apparent increase of this neuronal pattern was noted in infected individuals (**Fig. 2N**)

The second pattern was only visualized in mice and consisted of star-shaped immunostained cells, different from neurons and thus corresponding to the glia, and whose morphology and distribution resembled that of astrocytes. This labeling was particularly conspicuous in white matter structures, including the corpus callosum (**Fig. 2M [inset]**). In addition, these immunostained star-shaped cells were more abundant and fibrous in the brains of infected mice than in control mice.

In contrast, sheep showed the neuronal intracytoplasmic labeling but not the glial labeling, not even after several harsher epitope retrieval protocols were tested. However in the white matter of sheep, some positive glial cells (probably astrocytes and oligodendrocytes) were detected (**Fig. 2O [inset]**). No changes were observed between control and infected sheep.

Semi-quantitative assessment of glial *p75^{NTR}* labeling reveals significant differences between terminal, preclinical and control mice

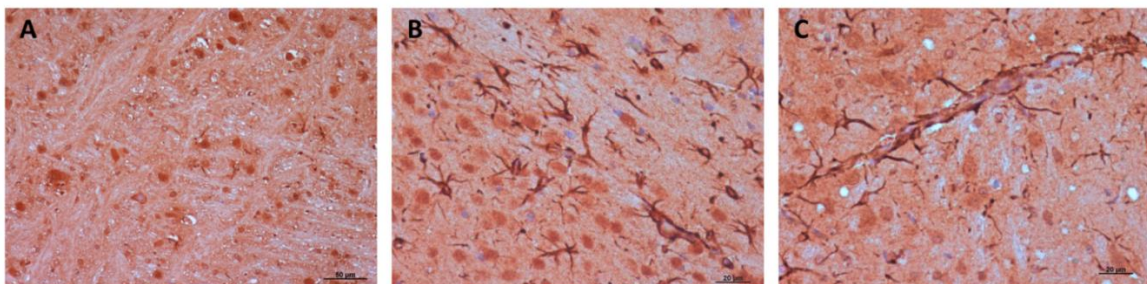


Fig. 3. *p75^{NTR}* labeling patterns in mice. (A) Neuronal intracytoplasmic pattern; (B-C) glial, likely astrocytic, pattern.

After careful assessment of each of the neurotrophins and receptors, we found the immunostaining for *p75^{NTR}* to be the most interesting for further analysis. Thus, we

performed immunohistochemistry for p75^{NTR} on an ample selection of mouse and sheep brain samples. To ensure that no background signal was interfering, control tissue sections from both mice and sheep were subjected to IHC in absence of primary anti-p75^{NTR} antibody incubation; no signal appeared in those sections, proving the specificity of p75^{NTR} immunostaining.

In agreement with the results of pilot experiments, immunostaining for p75^{NTR} in mice followed two different patterns: a neuronal intracytoplasmic labeling (**Fig. 3A**) and a glial staining characterized by a ramified pattern likely corresponding to astrocytes (**Fig. 3B, C**).

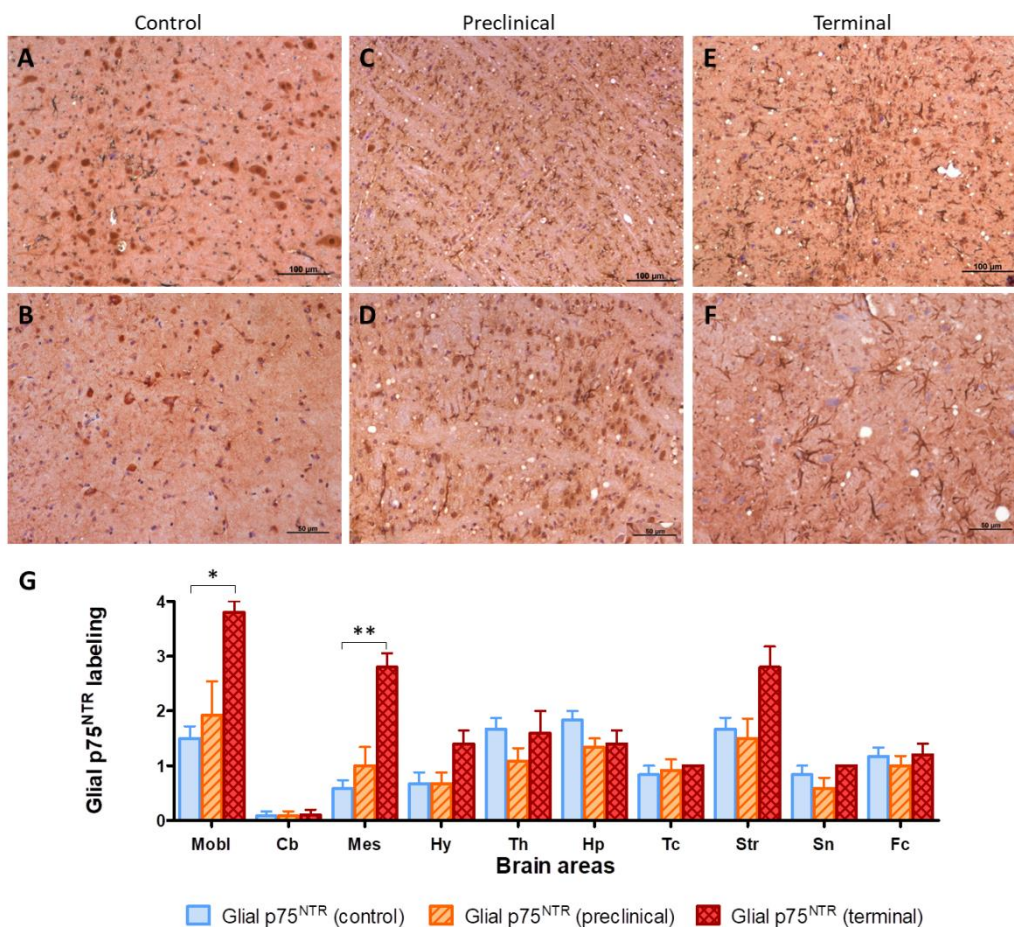


Figure 4. (A-F) Visual comparison of p75^{NTR} glial immunolabeling between control (A-B), preclinical (C-D) and terminal mice (E-F). Notice the presence of more abundant and fibrous p75^{NTR}-positive glial cells (purportedly astrocytes) in infected animals, together with the presence of vacuolization (spongiform lesion) in infected but not in control mice. (G) Semi-quantification of glial p75^{NTR} labeling in ten brain areas. Mobl: medulla oblongata, Cb: cerebellar cortex, Mes: mesencephalon, Hy: hypothalamus, Th: thalamus, Hp: hippocampus, Tc: cerebral cortex at the level of thalamus, Str: striatum, Sn: septal nuclei, Fc: frontal cortex. Error bars represent SEM. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

It was evident from direct visual examination of the samples that the glial labeling was more intense in terminal mice (**Fig. 4E, F**), in comparison with control mice (**Fig. 4A, B**). This was especially notorious in medulla oblongata, where p75^{NTR}-positive star-shaped

cells were more abundant and fibrous. This increased glial p75^{NTR} pattern was not so evident in the preclinical group (**Fig. 4C, D**).

To measure these changes, a semi-quantitative evaluation of glial p75^{NTR} labeling was performed in ten areas of mouse brains. Results were statistically compared with the Kruskal-Wallis test, followed by pairwise comparisons using Dunn's post-hoc test. Using this methodology, significant differences were found between control and terminal animals in medulla oblongata ($p= 0.0187$) and mesencephalon ($p= 0.0067$). Significant variability were also found at striatum ($p= 0.0020$), and although post-hoc pairwise comparison did not disclose significant differences between groups, terminal animals showed clearly increased values (**Fig. 4G**).

Additionally, microphotographs of the stained sections were subjected to image analysis using the ImageJ software. Since this method was not able to differentiate staining patterns, global p75^{NTR} immunolabeling was measured instead, in contrast to the semi-quantitative approach that quantified exclusively the glial pattern. Following this procedure, no significant differences were found between terminal, preclinical and control mice in any area (**Fig. 5**). This suggests that although higher numbers of p75^{NTR}-positive glial cells are present in diseased animals, the overall levels of this receptor seem not to be affected by the disease progression. Rather, this higher abundance of alleged astrocytes is likely to reflect the presence of astrogliosis, a neuropathological feature usually found in prion disease- terminally affected individuals.

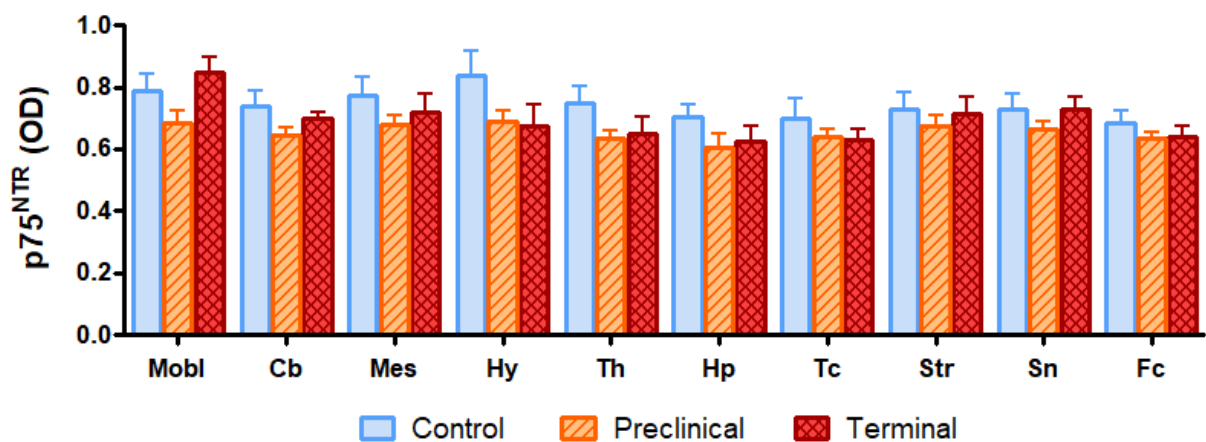


Fig. 5. Image analysis of global p75^{NTR} immunostaining in mice brains. No significant differences between infected, preclinical and terminal mice were noted in any brain area. Mobl: medulla oblongata, Cb: cerebellar cortex, Mes: mesencephalon, Hy: hypothalamus, Th: thalamus, Hp: hippocampus, Tc: cerebral cortex at the level of thalamus, Str: striatum, Sn: septal nuclei, Fc: frontal cortex. OD: optical density. Error bars represent SEM.

Image analyses of sheep brains identifies differences on global p75^{NTR} staining between control, preclinical and clinical groups

In contrast with mice, p75^{NTR} immunostaining in sheep consisted of an intense intraneuronal, pancytoplasmic labeling, together with a generalized staining of neuropil. White matter structures showed a strong intracytoplasmic targeting of glial cells probably corresponding to oligodendrocytes. However, and in accordance to pilot experiments, sheep brain samples lacked the ramified astrocytic labeling observed in mice.

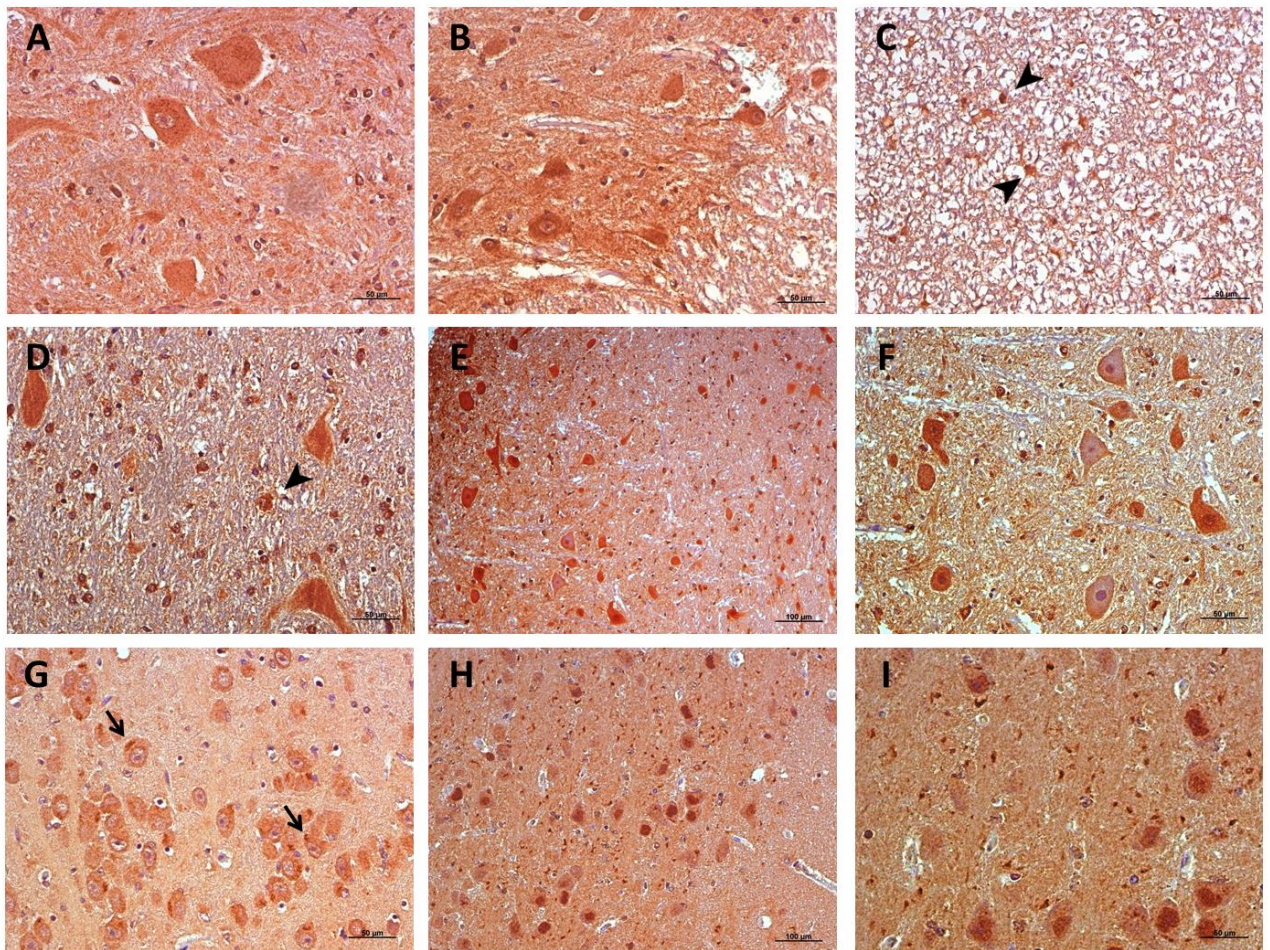


Fig. 6. Immunohistochemistry for p75^{NTR} in brain of a healthy control sheep (A-F) and a naturally scrapie-infected sheep at terminal stage (G-I). (A, B) Granular intraneuronal cytoplasmic staining in motor neurons in ventral horns of cervical spinal cord. (C) Intraglial cytoplasmic staining (*arrowhead*) in the white matter of cervical spinal cord. (D) Intraneuronal and intraglial (*arrowhead*) cytoplasmic staining in pons. (E, F) Granular intraneuronal cytoplasmic staining and neuropil punctuate deposits in oculomotor nucleus of the mesencephalon. (G) Granular intracytoplasmic deposits (*arrows*) in pyramidal neurons of the CA3 region of hippocampus. (H, I) Coarse particulate deposits in neuropil in CA3 region of hippocampus.

Careful visual examination identified several staining patterns in sheep. However, few differences between infected and control animals were noted. In hippocampus,

control sheep showed intraneuronal granular deposits located in one of the poles of the pericarion (**Fig. 6E**) and diffuse, fine punctuate staining in the neuropil, while infected sheep showed coarse granular deposits in neuropil (**Fig. 6H-I**) together with granular accumulations widely spread in the cytoplasm of neurons. No differences in immunostaining were observed between control and infected animals in brainstem structures (mesencephalon, pons, medulla oblongata) or spinal cord, in which an intense intraneuronal pancytoplasmic, sometimes granular, staining was observed (**Fig. 6A, B, D-F**), or in white matter tracts, which showed a strong intracytoplasmic targeting of glial cells probably corresponding to oligodendrocytes (**Fig. 6C**).

Nevertheless, the observed differences were subtle and it was not possible to quantify them for statistical purposes.

However, image analyses performed on ImageJ comparing immunohistochemical microphotographs of infected and control ovine samples disclosed significant differences in several brain nuclei. Most of the differences consisted of higher immunostaining intensity in preclinical sheep compared with control, non-infected sheep and with clinical sheep.

The area where the most significant differences were recorded ($p= 0.0018$) was medulla oblongata. Image analysis of the different nuclei included in this region were performed and significant differences were noted in hypoglossal nucleus (between control and preclinical and between preclinical and clinical, $p= 0.0147$) and olive (between control and preclinical, $p= 0.0221$).

Significance was also found in comparisons between control and preclinical sheep in pons ($p= 0.0085$) and between preclinical and terminal sheep in mesencephalon ($p= 0.0176$) and diencephalon ($p= 0.0019$).

Further image analysis performed on microphotographs of separate nuclei found significant differences between control and preclinical animals in reticular formation ($p= 0.0303$) and vestibular nucleus ($p= 0.0103$), between control and clinical animals in *substantia nigra* ($p= 0.0046$), and between preclinical and clinical animals in superior colliculus ($p= 0.0053$), ventral nucleus of the thalamus ($p= 0.0443$), lenticular nucleus ($p= 0.0120$) and caudate nucleus ($p= 0.0530$).

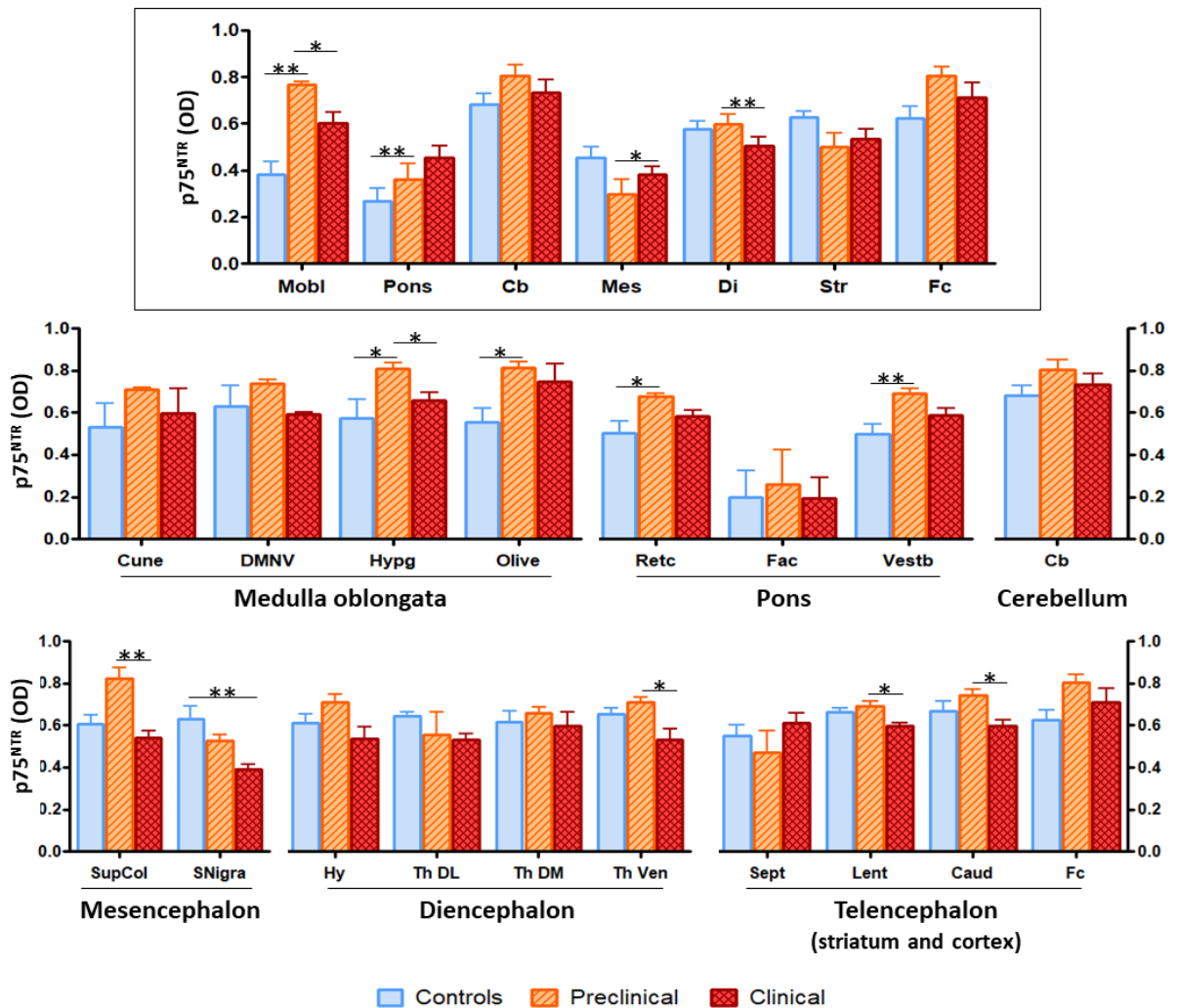


Fig. 7. Image analysis of p75^{NTR} immunostaining in sheep brains showed significant differences between groups of animals in a number of brain areas and nuclei. Mobl: medulla oblongata, Pons: pons, Cb: cerebellum, Mes: mesencephalon, Di: diencephalon, Str: striatum, Fc: frontal cortex, Cune: cuneate nucleus, DMNV: dorsal motor nucleus of the vagus, Hypg: hypoglossal nucleus, Retc: reticular formation, Fac: facial nucleus, Vestb: vestibular nucleus, SupCol: superior colliculus, SNigra: *substantia nigra*, Hy: hypothalamus, Th DL: dorsolateral nuclei of thalamus, Th DM: dorsomedial nuclei of thalamus, Th Ven: ventral nuclei of thalamus, Sept: septal area, Lent: lenticular nucleus, Caud: caudate nucleus. OD: optical density. Error bars represent SEM. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Similarities in the distribution of p75^{NTR} - and GFAP-immunolabeled glial cells suggest p75^{NTR} expression in astrocytes from mouse, but not sheep

Considering the evidently glial pattern found in mice, we wondered whether this staining really corresponded to astrocytes. Presence of reactive astrocytes is a frequent hallmark of prion diseases at advanced stages of neurodegeneration.

There was an evident parallelism between p75^{NTR} and GFAP immunostainings in mouse brains. Immunohistochemistry against GFAP revealed a distribution of astrocytes that closely resembled that of p75^{NTR}-positive glial cells (Fig. 8A, C). In contrast, GFAP did not disclose any neuronal staining (Fig. 8D), as did p75^{NTR} (Fig. 8B), indicating that

GFAP is a specific astrocytic marker and that p75^{NTR} does not only label astrocytes but other cell populations too.

Importantly, the abundance of astrocytes targeted for GFAP (**Fig. 8C**) was higher than that of glial cells targeted for p75^{NTR} (**Fig. 8A**), indicating that apparently only a subpopulation of astrocytes expresses detectable levels of p75^{NTR} in mice brain. Similarly to p75^{NTR}-targeted glial cells, GFAP-targeted astrocytes were more abundant and fibrous in infected mice, especially in medulla oblongata of terminal animals.

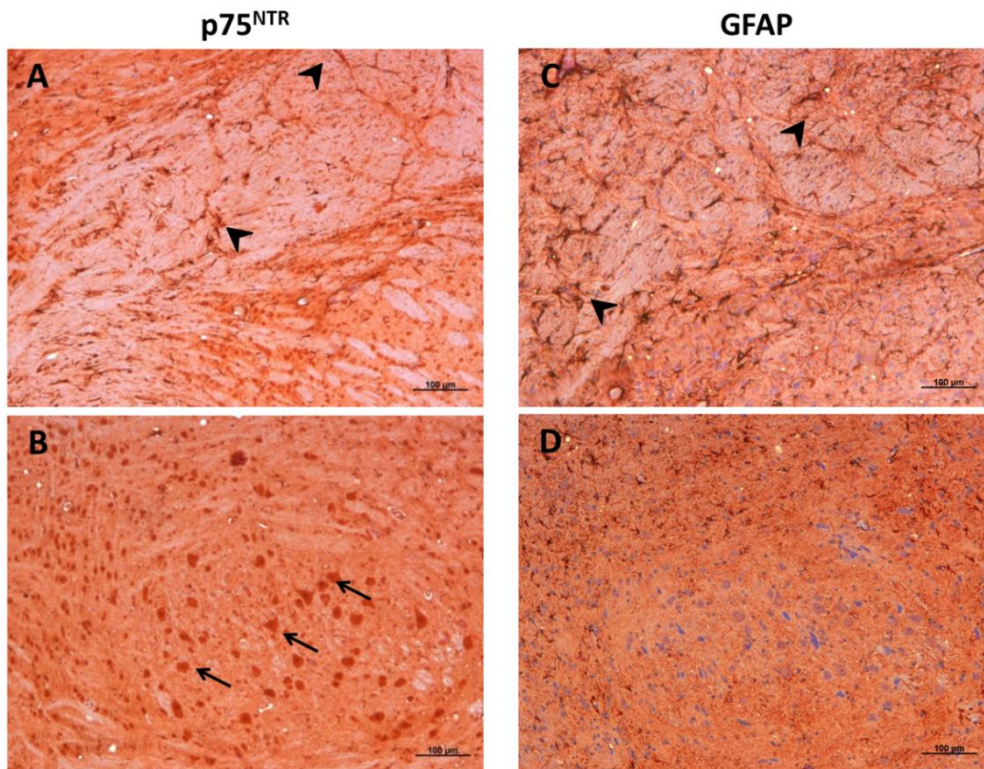


Fig. 8. Comparison between p75^{NTR} and GFAP immunostaining patterns in mice. Notice that p75^{NTR} marks both glial cells (probably astrocytes) (A) and neurons (B), while GFAP targets astrocytes (C) but not other cell types (D). Importantly, GFAP-positive astrocytes (C) are more abundant than p75^{NTR}-positive glial cells (A), suggesting that only a subpopulation of astrocytes express p75^{NTR}.

In sheep, immunohistochemistry against GFAP disclosed GFAP-positive protoplasmic astrocytes in high numbers in the *stratum lacunosum-moleculare* (border between the CA1 region of the *cornu ammonis* and the dentate gyrus) and in the polymorphic layer of the dentate gyrus, below the granular layer (**Fig. 9D-F**). More fibrous astrocytes were observed in white matter tracts of the *hilus* (**fig**). Infected sheep were found to have an increased population of GFAP-positive astrocytes in these zones, in comparison with control sheep. Nevertheless, no similarities were observed between p75^{NTR} (**Fig. 9A-C**) and GFAP immunostainings (**Fig. 9D-F**), which is in agreement with the lack of the glial pattern in p75^{NTR}-immunostained sections from sheep. The reason why ovine astrocytes do not express detectable levels of p75^{NTR} or why our technique is below the detection threshold remains unknown.

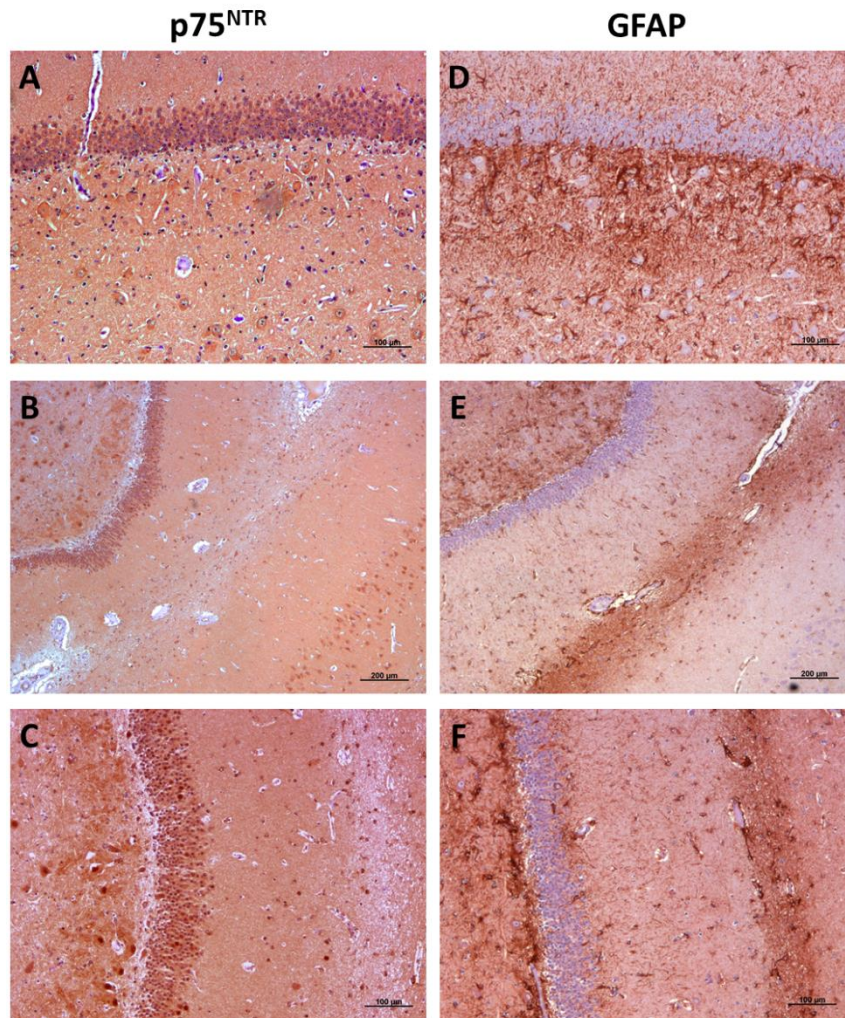


Fig. 9. Comparison between p75^{NTR} (A-C) and GFAP immunostaining (D-F) patterns in sheep. Notice the lack of correlation between both distribution patterns, indicative of the fact that ovine astrocyte do not express significant levels of the receptor.

Glial p75^{NTR} staining abundance correlate positively with the severity of spongiosis, PrP^{Sc} deposition and gliosis in mice.

The visual approach employed to assess the relationship between p75^{NTR} and astrocytes in mice was complemented with a semi-quantitative measurement of the severity of the gliosis in GFAP-immunolabeled sections. In addition, spongiform change and PrP^{Sc} accumulation in the brain were evaluated on haematoxylin-eosin stained sections and with PET-blot, respectively. Curves were traced representing the intensity of these three parameters (**Fig. 10**), and statistical analyses were performed to search for significant differences between terminal, preclinical and control mice (**Supplementary Table 1**).

Significant differences were found in all areas except cerebellar cortex for espongiosis and cerebellar cortex and hippocampus for PrP^{Sc} deposits. Gliosis showed significant

differences in medulla oblongata, mesencephalon, hypothalamus and striatum, in close agreement with what was observed with glial p75^{NTR} labeling (Fig. 4E).

Correlation coefficients of these three parameters with glial p75^{NTR} labeling were computed and significant results were found in each case (Fig. 10) indicating that the accumulation of the causal agent (PrP^{Sc}) and its related neuropathological alterations (spongiosis and gliosis) are linked to the presence of p75^{NTR}-positive glial cells. Considering all the aforementioned observations, the most likely possibility is that these glial cells are indeed astrocytes.

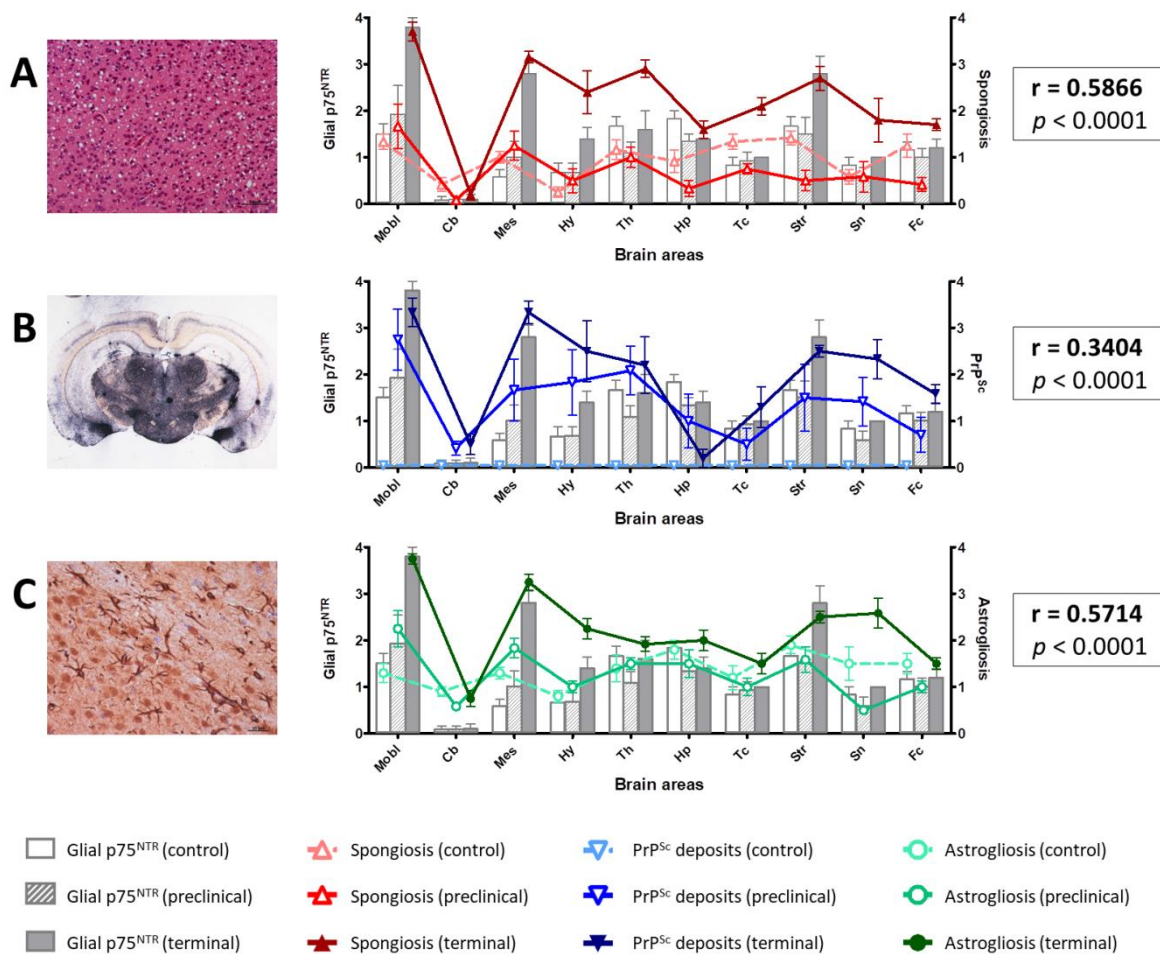


Fig. 10. Distribution of spongiform change (A), PrP^{Sc} deposits (B) and gliosis (C) in comparison with the distribution of glial p75^{NTR} labeling in the brain of control, preclinical and terminal mice. Notice the overlapping of the curves representing the three parameters and the bars representing glial p75^{NTR} staining intensity. Positive Spearman's correlation coefficients (r) were obtained in each case, which were highly significant. Mobl: medulla oblongata, Cb: cerebellar cortex, Mes: mesencephalon, Hy: hypothalamus, Th: thalamus, Hp: hippocampus, Tc: cerebral cortex at the level of thalamus, Str: striatum, Sn: septal nuclei, Fc: frontal cortex. Error bars represent SEM.

In contrast, no positive correlation was noted between total p75^{NTR} labeling (measured as average optical density of immunostained sections) and glial p75^{NTR}, spongiosis or PrP^{Sc} deposition. Only a slight correlation was found between total p75^{NTR} and gliosis,

which was statistically significant ($p= 0.0259$). However, the low correlation coefficient ($r= 0.2133$) rendered this observation negligible.

Spongiosis and PrP^{Sc} deposits do not correlate with global p75^{NTR} labeling in sheep.

Spongiosis and PrP^{Sc} deposits assessed semi-quantitatively in sheep brains showed statistically significant variation between groups (**Supplementary Table 2**), but did not correlate with the global p75^{NTR} immunostaining measured by image analysis, as demonstrated non-significant Spearman’s correlation coefficients (**Fig. 11**). This observation is in agreement with the notion that p75^{NTR} expression as a whole is not related to prion disease pathogenesis, at least with its two more prominent hallmarks.

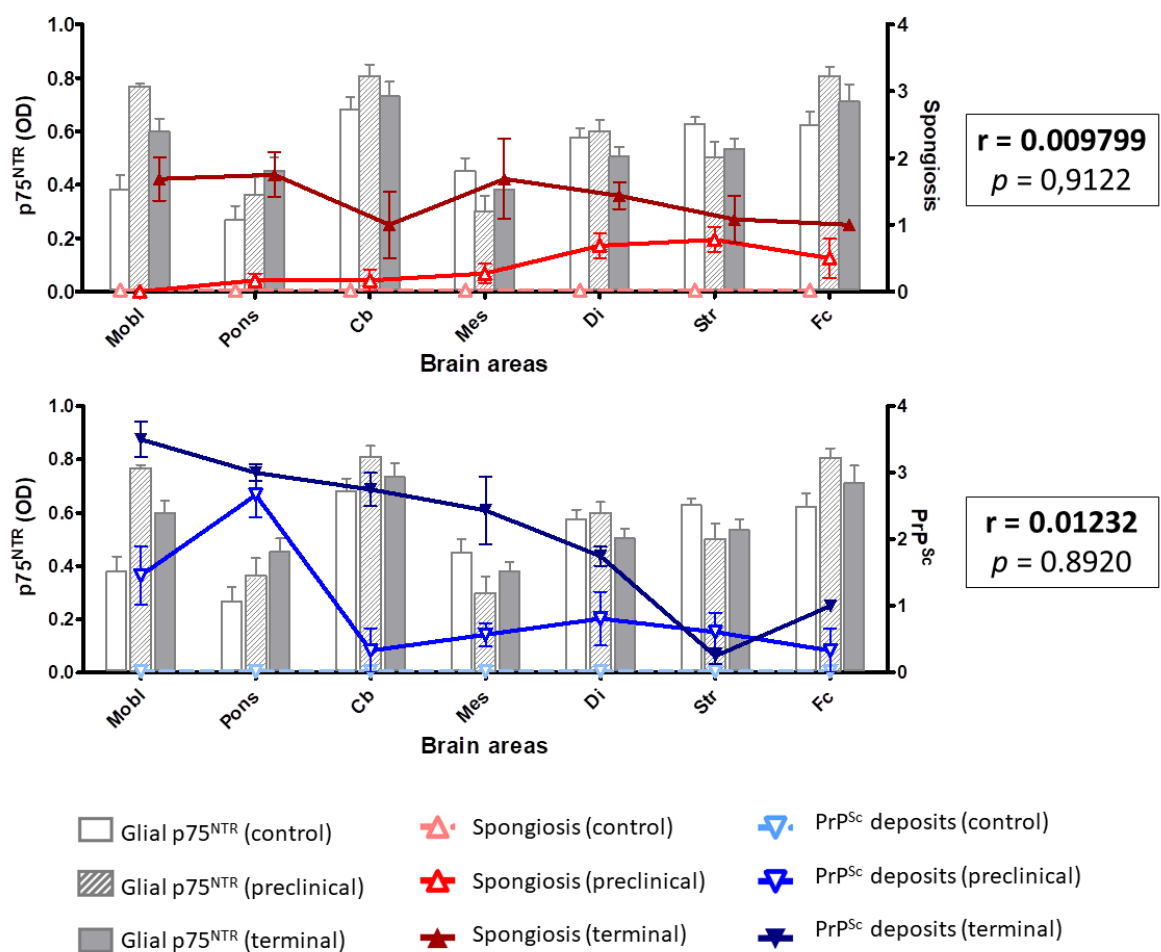


Fig. 11. Distribution of spongiform change (A) and PrP^{Sc} deposits (B) in comparison with the distribution of global p75^{NTR} labeling in the brain of control, preclinical and terminal sheep. Spearman’s correlation analyses showed low correlation coefficients (r) that were not statistically significant. Mobl: medulla oblongata, Pons: pons, Cb: cerebellar cortex, Mes: mesencephalon, Di: diencephalon, Str: striatum, Fc: frontal cortex. OD: optical density. Error bars represent SEM.

Confocal microscopy confirms the relationship between glial p75^{NTR} patterns and astrocytes in mice, but not sheep

Confocal microscopy was used with a double objective. In the first place, considering that medulla oblongata was the brain area with the most abundant p75^{NTR} labeling and PrP^{Sc} deposits (**Fig. 10B**), we wondered whether there was a direct relationship between these two parameter. To assess this, we performed confocal microscopy combining the anti-PrP antibody L42 with the anti-p75^{NTR} antibody.

In the second place, given the apparent labeling of astrocytes by the anti-p75^{NTR} antibody and its positive correlation with the distribution of the astrocyte-specific marker GFAP, we aimed at further confirming the co-location of these two markers. To do so, we combined the anti-p75^{NTR} and the anti-GFAP antibodies previously used in immunohistochemistry.

In both cases, p75^{NTR} labeling disclosed patterns that matched with those observed by immunohistochemistry, including: perineuronal labeling with neuropil staining (**Fig. 11A**), glial labeling, probably corresponding to oligodendrocytes in the white matter (**Fig. 11B**), and intraneuronal staining with evidences of the neuron branching (**Fig. 11C**).

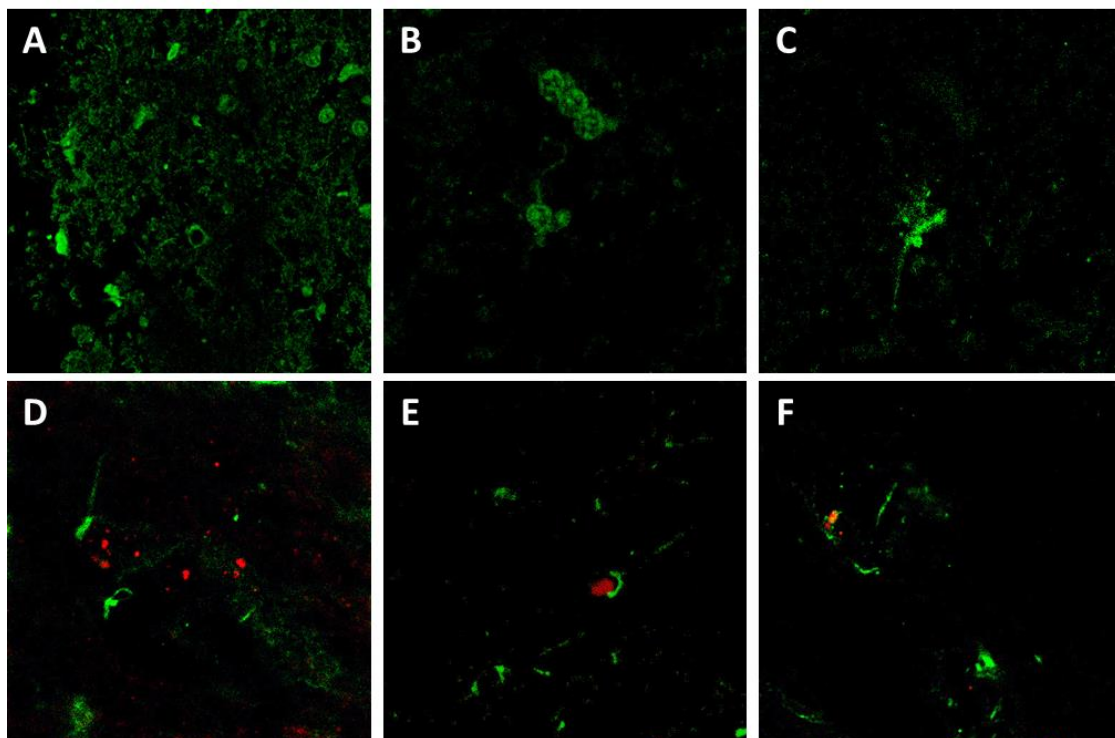


Fig. 11. Confocal microscopy for p75^{NTR} (green) and PrP (red) in sheep brain samples. Notice that p75^{NTR} distribution patterns agreed with those observed by IHC, including neuropil and perineuronal staining (A), glial staining (probably oligodendrocytes) (B) and neuronal intracytoplasmic staining with evidences of neuron processes (C). Co-location of p75^{NTR} with PrP, although observed in a number of cases (D-F), was not the general rule.

In the samples targeted for p75^{NTR} and PrP^{Sc}, a mild red labeling corresponding to PrP^{Sc} deposits appeared in some areas, but co-localization with p75^{NTR}, although found in some cases, was not the general rule (**Fig. 11D-F**).

In the confocal microscopy for p75^{NTR} and GFAP, a very clear co-location was observed in mice samples (**Fig. 12A**), which definitely confirmed that the p75^{NTR}-positive star-shaped cells in mice brains were indeed astrocytes, as suggested by the observations on immunohistochemistry. In contrast, and also reinforcing previous immunohistochemical findings, no co-location between GFAP and p75^{NTR} was noted in sheep brain samples (**Fig. 12B**), confirming the absence of p75^{NTR} expression in ovine astrocytes, at least to levels detectable by either immunohistochemistry and confocal microscopy.

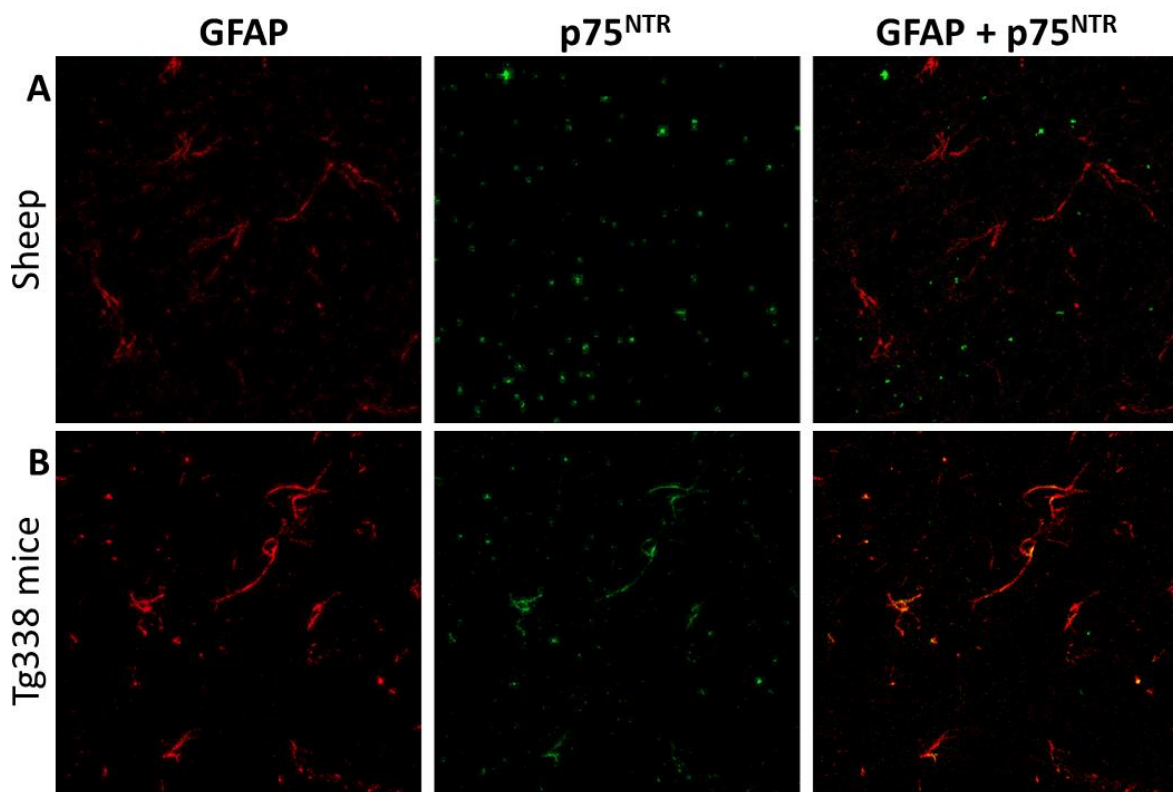


Fig. 12. Confocal microscopy for GFAP (red) and p75^{NTR} (green) in sheep (A) and mouse (B) brain samples. Notice the lack of correlation between both markers in sheep tissues and the clear co-location that in contrast is observed in mice, suggesting that mouse but not sheep astrocytes express detectable levels of p75^{NTR}.

Discussion

Our results indicate that increased numbers of p75^{NTR}-positive astrocytes are present in terminal stages of neurodegeneration in a murine model of scrapie. This finding correlates with other neuropathological features of prion disease, including spongiosis,

PrP^{Sc} accumulation and gliosis. In comparisons between control, preclinical and terminal individuals, all areas with significant differences in glial p75^{NTR} labeling showed also significant differences in these three prion disease biomarkers. These results, which are in agreement with previous studies using a similar murine model (Marco-Salazar *et al.*, 2014), provide proof of the causal, biologically relevant association between the receptor and prion disease pathogenesis.

Some studies have proposed an important role for p75^{NTR} in the pathogenesis of prion diseases and other neurodegenerative disorders. Not only is this receptor able to mediate cell death after binding of its natural ligands (pre-processed and mature neurotrophins), as extensively reviewed (Bibel & Barde, 2000), but also upon *in vitro* interaction with non-neurotrophic molecules such as PrP106-126 (Bai *et al.*, 2008; Della-Bianca *et al.*, 2001) and APP (amyloid protein precursor) (Perini *et al.*, 2002; Yaar *et al.*, 1997). Such a direct link between the receptor and peptides involved in the pathogenesis of neurodegeneration prompts the suggestion that a similar mechanism be triggered *in vivo* by PrP^{Sc} deposits in the brain.

However, few studies address these questions using the mouse as the experimental model, since the majority of investigations on neurotrophin actions are performed in rats (Friedman *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 1997; Zhou & Rush, 1994), humans (Connor & Dragunow, 1998; Tang *et al.*, 2010) and non-human primates (Mufson *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2007). In experimental scrapie in mice, it is well known that prion-related lesions in the brain follow a topographical distribution tightly controlled by a combination of agent strain and factors intrinsic to the host. This has led to the development of strain discrimination methodologies based on the assessment of lesion profiles (Fraser & Dickinson, 1968) or PrP^{Sc} accumulation patterns (Gonzalez *et al.*, 2002; Thackray *et al.*, 2008). However, the mechanisms controlling or influencing this distribution are unclear. Given the role of p75^{NTR} in triggering cell death, it is possible that differential expression of this receptor among brain areas or cell populations governs at least in part the distribution of prion-related lesions, as already proposed (Marco-Salazar *et al.*, 2014).

The expression of the p75^{NTR} receptor in astrocytes is well proved. As exposed above, a previous work with both wild type and transgenic mice modeling prion disease found increased presence of p75^{NTR}-positive astrocytes in terminally-diseased animals (Marco-Salazar *et al.*, 2014). Other studies, far from the field of prion diseases, identified this receptor in astrocytes and described how this type of glial cell can both secrete several kinds of neurotrophins (Domeniconi *et al.*, 2007; Furukawa *et al.*, 1986) and act as target of these molecules through expression of their receptors, including p75^{NTR} (Becker *et al.*, 2018; Cragolini & Friedman, 2008). Importantly, according to our results only a subpopulation of astrocytes express detectable levels of the

receptor, as the number of p75^{NTR}-positive glial cells was lower than that of GFAP-positive astrocytes.

Some physiological functions of p75^{NTR} activation in astrocytic populations have been demonstrated, including arresting of cell cycle and attenuation of astrocytes proliferation (Cragolini *et al.*, 2009; Cragolini *et al.*, 2012) and astrocyte-mediated regulation of energy metabolism through circadian control of p75^{NTR} expression (Ishii *et al.*, 2018). Other authors have described the crucial role of p75^{NTR}-mediated astrocytosis in astrocyte-induced toxicity to motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (Kust *et al.*, 2003; Pehar *et al.*, 2004; Shephard *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2015).

Although p75^{NTR} expression levels in astrocytes in the normal adult rodent brain is low (Rudge *et al.*, 1994), upregulation of this receptor has been observed after treatment of *in vitro*-cultured astrocytes with NGF (Hutton *et al.*, 1992) and after some types of damage of nervous tissue *in vivo* (Oderfeld-Nowak *et al.*, 2003). However, the consequences of this upregulation are unclear. It may cause declining of cell population through activation of apoptosis or attenuation of astrocytes proliferation, which would restrict glial scar formation after tissue insults (Cragolini *et al.*, 2009).

Other glial cell types also upregulate p75^{NTR} expression in several neuropathological conditions, including microglia and oligodendrocytes in multiple sclerosis (Dowling *et al.*, 1999), and Schwann cells and alynglia in peripheral nerve injury and during the regeneration process (Becker *et al.*, 2018; Cragolini & Friedman, 2008; Taniuchi *et al.*, 1986; You *et al.*, 1997). In addition, p75^{NTR} has become useful as a biomarker to distinguish canine brain neoplasms, since it can discriminate between oligodendrogliomas and astrocytomas (Spitzbarth *et al.*, 2017).

Concerning the remarkable labeling of astrocytes in murine brains in our study, further analyses are needed to understand the involvement of p75^{NTR} in the neuroinflammatory response mediated by reactive astrocytes during prion disease pathogenesis. In any case, our results reinforce the crucial role of astrocytes in the neurodegeneration associated to prion diseases.

On the other hand, experiments with the natural model of scrapie are also scarce given the intrinsic drawbacks of working with large animals like sheep. In our study, the natural ovine model of the disease did not show the glial p75^{NTR} immunolabeling found in mice, which suggest the absence of p75^{NTR} in sheep astrocytes. This is not rare, since other studies have failed in finding an association between p75^{NTR} and astrocytes in other models of prion disease, such as hamsters infected with the 263K scrapie strain (Wang *et al.*, 2016). However, as already exposed, the presence of p75^{NTR} is largely described in astrocytes and other glial cell types, which allows discarding that the astrocytic pattern observed in mice is artefactual.

Despite the absence of p75^{NTR} astrocytic labeling in sheep, image analysis found global p75^{NTR} immunostaining to be increased in several brain areas and nuclei of preclinical sheep, in comparison with both control and clinical sheep. This observation suggests that an upregulation of this receptor occurs during initial stages of prion-related neurodegeneration. Accordingly, overexpression of p75^{NTR} has been described in other pathological conditions associated with cell death and neurodegeneration. For example, in Alzheimer's disease (AD) re-expression of p75^{NTR} was observed in human cortical neurons by immunohistochemistry (Mufson & Kordower, 1992).

However the reasons of this increase are unclear. Some authors propose that the re-expression of p75^{NTR} in brains of AD patients is mediated by the upregulation of its ligand, NGF (Mufson & Kordower, 1992), since ligand and receptor are linked by a "feed-forward" relationship (Hefti *et al.*, 1989). However, in our pilot experiments the levels of NGF were not noticeably increased in infected individuals. Moreover, levels of BDNF and NT-3, currently known to bind to p75^{NTR}, were found unaltered too. A more in-depth assessment of the expression of these neurotrophic ligands should be done to accept or discard this hypothesis in this particular case.

In contrast with the preclinical group, animals in the clinical stage showed reduced p75^{NTR} levels. The most likely explanation for this is the neuronal loss occurring at later stages of prion neurodegeneration. In agreement with this, several authors have described a similar loss of p75^{NTR} neuronal expression in organotypic brain slice cultures from rat (Weis *et al.*, 2001) and mouse (Spitzbarth *et al.*, 2015) and in cultured canine dorsal root ganglia neurons (Gerhauser *et al.*, 2012), and attributed this observation to neuron death.

In striking contrast to sheep, image analysis of immunostained sections of mouse brains identified no significant differences between terminal, preclinical and control animals. A tentative explanation is that p75^{NTR} is not related to prion pathogenesis in mice, apart from its presence in activated astrocytes involved in prion-related gliosis.

References

- Bai, Y., Li, Q., Yang, J., Zhou, X., Yin, X., and Zhao, D. (2008). p75(NTR) activation of NF-kappa B is involved in PrP106-126-induced apoptosis in mouse neuroblastoma cells. *Neuroscience Research*, 62(1), 9-14. doi:10.1016/j.neures.2008.05.004
- Becker, K., Cana, A., Baumgartner, W., and Spitzbarth, I. (2018). p75 neurotrophin receptor: A double-edged sword in pathology and regeneration of the central nervous system. *Veterinary Pathology*, 55(6), 786-801. doi:10.1177/0300985818781930 [doi]

Bencsik, A., Philippe, S., Debeer, S., Crozet, C., Calavas, D., and Baron, T. (2007). Scrapie strain transmission studies in ovine PrP transgenic mice reveal dissimilar susceptibility. *Histochemistry and Cell Biology*, 127(5), 531-539. doi:10.1007/s00418-007-0276-8 [doi]

Bibel, M., and Barde, Y. A. (2000). Neurotrophins: Key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes & Development*, 14(23), 2919-2937. doi:10.1101/gad.841400 [doi]

Bibel, M., Hoppe, E., and Barde, Y. A. (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *The EMBO Journal*, 18(3), 616-622. doi:10.1093/emboj/18.3.616 [doi]

Bruce, M. E., Boyle, A., Cousens, S., McConnell, I., Foster, J., Goldmann, W., and Fraser, H. (2002). Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *Journal of General Virology*, 83, 695-704.

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

Connor, B., and Dragunow, M. (1998). The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 27(1), 1-39. doi:S0165017398000046 [pii]

Cragolini, A. B., and Friedman, W. J. (2008). The function of p75NTR in glia. *Trends in Neurosciences*, 31(2), 99-104. doi:10.1016/j.tins.2007.11.005 [doi]

Cragolini, A. B., Huang, Y., Gokina, P., and Friedman, W. J. (2009). Nerve growth factor attenuates proliferation of astrocytes via the p75 neurotrophin receptor. *Glia*, 57(13), 1386-1392. doi:10.1002/glia.20857 [doi]

Cragolini, A. B., Volosin, M., Huang, Y., and Friedman, W. J. (2012). Nerve growth factor induces cell cycle arrest of astrocytes. *Developmental Neurobiology*, 72(6), 766-776. doi:10.1002/dneu.20981 [doi]

Dawbarn, D., and Allen, S. J. (2003). Neurotrophins and neurodegeneration. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 29(3), 211-230. doi:487 [pii]

Della-Bianca, V., Rossi, F., Armato, U., Dal-Pra, I., Costantini, C., Perini, G., Politi, V., and Della Valle, G. (2001). Neurotrophin p75 receptor is involved in neuronal damage by prion peptide-(106-126). *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38929-38933. doi:10.1074/jbc.M107454200

- Domeniconi, M., Hempstead, B. L., and Chao, M. V. (2007). Pro-NGF secreted by astrocytes promotes motor neuron cell death. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 34(2), 271-279. doi:S1044-7431(06)00257-0 [pii]
- Dowling, P., Ming, X., Raval, S., Husar, W., Casaccia-Bonnett, P., Chao, M., Cook, S., and Blumberg, B. (1999). Up-regulated p75^{NTR} neurotrophin receptor on glial cells in MS plaques. *Neurology*, 53(8), 1676-1682. doi:10.1212/wnl.53.8.1676 [doi]
- Fraser, H., and Dickinson, A. G. (1968). The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *Journal of Comparative Pathology*, 78(3), 301-311.
- Friedman, W. J., Black, I. B., and Kaplan, D. R. (1998). Distribution of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 in the postnatal rat brain: An immunocytochemical study. *Neuroscience*, 84(1), 101-114. doi:S0306-4522(97)00526-5 [pii]
- Furukawa, S., Furukawa, Y., Satoyoshi, E., and Hayashi, K. (1986). Synthesis and secretion of nerve growth factor by mouse astroglial cells in culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 136(1), 57-63. doi:0006-291X(86)90876-4 [pii]
- Gerhauser, I., Hahn, K., Baumgartner, W., and Wewetzer, K. (2012). Culturing adult canine sensory neurons to optimise neural repair. *The Veterinary Record*, 170(4), 102. doi:10.1136/vr.100255 [doi]
- Gonzalez, L., Martin, S., Begara-McGorum, I., Hunter, N., Houston, F., Simmons, M., and Jeffrey, M. (2002). Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *Journal of Comparative Pathology*, 126(1), 17-29. doi:10.1053/jcpa.2001.0516 [doi]
- Groschup, M. H., and Buschmann, A. (2008). Rodent models for prion diseases. *Veterinary Research*, 39(4), 32. doi:10.1051/vetres:2008008 [doi]
- Hefti, F., Hartikka, J., and Knusel, B. (1989). Function of neurotrophic factors in the adult and aging brain and their possible use in the treatment of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging*, 10(5), 515-533. doi:0197-4580(89)90118-8 [pii]
- Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D. R., Parada, L. F., and Chao, M. V. (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature*, 350(6320), 678-683. doi:10.1038/350678a0 [doi]

Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J., and Lantos, P. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, *389*(6650), 448-50, 526. doi:10.1038/38925 [doi]

Hutton, L. A., deVellis, J., and Perez-Polo, J. R. (1992). Expression of p75NGFR TrkA, and TrkB mRNA in rat C6 glioma and type I astrocyte cultures. *Journal of Neuroscience Research*, *32*(3), 375-383. doi:10.1002/jnr.490320309 [doi]

Ishii, T., Warabi, E., and Mann, G. E. (2018). Circadian control of p75 neurotrophin receptor leads to alternate activation of Nrf2 and c-rel to reset energy metabolism in astrocytes via brain-derived neurotrophic factor. *Free Radical Biology & Medicine*, *119*, 34-44. doi:S0891-5849(18)30036-4 [pii]

Kust, B. M., Brouwer, N., Mantingh, I. J., Boddeke, H. W., and Copray, J. C. (2003). Reduced p75NTR expression delays disease onset only in female mice of a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders : Official Publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases*, *4*(2), 100-105.

Lazarini, F., Boussin, F., Deslys, J. P., Tardy, M., and Dormont, D. (1994). Astrocyte gene expression in experimental mouse scrapie. *Journal of Comparative Pathology*, *111*(1), 87-98. doi:S0021-9975(05)80114-8 [pii]

Ligos, C., Jeffrey, M., Ryder, S. J., Bellworthy, S. J., and Simmons, M. M. (2002). Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *Journal of Comparative Pathology*, *127*(1), 45-57. doi:S002199750290589X [pii]

Lu, B., Pang, P. T., and Woo, N. H. (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nature Reviews.Neuroscience*, *6*(8), 603-614. doi:nrn1726 [pii]

Marco-Salazar, P., Marquez, M., Fondevila, D., Rabanal, R. M., Torres, J. M., Pumarola, M., and Vidal, E. (2014). Mapping of neurotrophins and their receptors in the adult mouse brain and their role in the pathogenesis of a transgenic murine model of bovine spongiform encephalopathy. *Journal of Comparative Pathology*, *150*(4), 449-462. doi:10.1016/j.jcpa.2013.11.209

Meeker, R. B., and Williams, K. S. (2015). The p75 neurotrophin receptor: At the crossroad of neural repair and death. *Neural Regeneration Research*, *10*(5), 721-725. doi:10.4103/1673-5374.156967 [doi]

Monleon, E., Garza, M. C., Sarasa, R., Alvarez-Rodriguez, J., Bolea, R., Monzon, M., Vargas, M. A., Badiola, J. J., and Acin, C. (2011). An assessment of the efficiency of PrPsc detection in rectal mucosa and third-eyelid biopsies from animals infected with scrapie. *Veterinary Microbiology*, *147*(3-4), 237-243. doi:10.1016/j.vetmic.2010.06.028 [doi]

- Mufson, E. J., Conner, J. M., Varon, S., and Kordower, J. H. (1994). Nerve growth factor-like immunoreactive profiles in the primate basal forebrain and hippocampal formation. *The Journal of Comparative Neurology*, 341(4), 507-519. doi:10.1002/cne.903410407 [doi]
- Mufson, E. J., and Kordower, J. H. (1992). Cortical neurons express nerve growth factor receptors in advanced age and alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(2), 569-573. doi:10.1073/pnas.89.2.569 [doi]
- Nykjaer, A., and Willnow, T. E. (2012). Sortilin: A receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends in Neurosciences*, 35(4), 261-270. doi:10.1016/j.tins.2012.01.003 [doi]
- Oderfeld-Nowak, B., Orzylowska-Sliwinska, O., Soltys, Z., Zaremba, M., Januszewski, S., Janeczko, K., and Mossakowski, M. (2003). Concomitant up-regulation of astroglial high and low affinity nerve growth factor receptors in the CA1 hippocampal area following global transient cerebral ischemia in rat. *Neuroscience*, 120(1), 31-40. doi:S0306452203002896 [pii]
- Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M. R., Castellanos, R., Viera, L., Beckman, J. S., Estevez, A. G., and Barbeito, L. (2004). Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 89(2), 464-473. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02357.x [doi]
- Perini, G., Della-Bianca, V., Politi, V., Della Valle, G., Dal-Pra, I., Rossi, F., and Armato, U. (2002). Role of p75 neurotrophin receptor in the neurotoxicity by beta-amyloid peptides and synergistic effect of inflammatory cytokines. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(7), 907-918. doi:10.1084/jem.20011797 [doi]
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216(4542), 136-144.
- Prusiner, S. B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science*, 252(5012), 1515-1522.
- Rezaie, P., and Lantos, P. L. (2001). Microglia and the pathogenesis of spongiform encephalopathies. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 35(1), 55-72. doi:S016501730100042X [pii]
- Rudge, J. S., Li, Y., Pasnikowski, E. M., Mattsson, K., Pan, L., Yancopoulos, G. D., Wiegand, S. J., Lindsay, R. M., and Ip, N. Y. (1994). Neurotrophic factor receptors and their signal transduction capabilities in rat astrocytes. *The European Journal of Neuroscience*, 6(5), 693-705. doi:10.1111/j.1460-9568.1994.tb00981.x [doi]

Schulz-Schaeffer, W. J., Tschoke, S., Kranefuss, N., Drose, W., Hause-Reitner, D., Giese, A., Groschup, M. H., and Kretzschmar, H. A. (2000). The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(sc) early in the incubation time in prion diseases. *The American Journal of Pathology*, 156(1), 51-56. doi:S0002-9440(10)64705-0 [pii]

Segal, R. A. (2003). Selectivity in neurotrophin signaling: Theme and variations. *Annual Review of Neuroscience*, 26, 299-330. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131421 [doi]

Shepherd, S. R., Chataway, T., Schultz, D. W., Rush, R. A., and Rogers, M. L. (2014). The extracellular domain of neurotrophin receptor p75 as a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, 9(1), e87398. doi:10.1371/journal.pone.0087398 [doi]

Shu, Y. H., Lu, X. M., Wei, J. X., Xiao, L., and Wang, Y. T. (2015). Update on the role of p75NTR in neurological disorders: A novel therapeutic target. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 76, 17-23. doi:10.1016/j.biopha.2015.10.010 [doi]

Smith, K. S., Rush, R. A., and Rogers, M. L. (2015). Characterization and changes in neurotrophin receptor p75-expressing motor neurons in SOD1(G93A) G1H mice [corrected]. *The Journal of Comparative Neurology*, 523(11), 1664-1682. doi:10.1002/cne.23763 [doi]

Spitzbarth, I., Cana, A., Hahn, K., Hansmann, F., and Baumgartner, W. (2015). Associated occurrence of p75 neurotrophin receptor expressing aldynoglia and microglia/macrophages in long term organotypic murine brain slice cultures. *Brain Research*, 1595, 29-42. doi:10.1016/j.brainres.2014.11.027 [doi]

Spitzbarth, I., Heinrich, F., Herder, V., Recker, T., Wohlsein, P., and Baumgartner, W. (2017). Canine central nervous system neoplasm phenotyping using tissue microarray technique. *Veterinary Pathology*, 54(3), 369-379. doi:10.1177/0300985816688745 [doi]

Tang, S., Machaalani, R., and Waters, K. A. (2010). Immunolocalization of pro- and mature-brain derived neurotrophic factor (BDNF) and receptor TrkB in the human brainstem and hippocampus. *Brain Research*, 1354, 1-14. doi:10.1016/j.brainres.2010.07.051 [doi]

Taniuchi, M., Clark, H. B., and Johnson, E. M., Jr. (1986). Induction of nerve growth factor receptor in schwann cells after axotomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(11), 4094-4098. doi:10.1073/pnas.83.11.4094 [doi]

Teng, K. K., Felice, S., Kim, T., and Hempstead, B. L. (2010). Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. *Developmental Neurobiology*, 70(5), 350-359. doi:10.1002/dneu.20768 [doi]

Thackray, A. M., Hopkins, L., Lockey, R., Spiropoulos, J., and Bujdoso, R. (2011). Emergence of multiple prion strains from single isolates of ovine scrapie. *The Journal of General Virology*, 92(Pt 6), 1482-1491. doi:10.1099/vir.0.028886-0 [doi]

Thackray, A. M., Hopkins, L., Spiropoulos, J., and Bujdoso, R. (2008). Molecular and transmission characteristics of primary-passaged ovine scrapie isolates in conventional and ovine PrP transgenic mice. *Journal of Virology*, 82(22), 11197-11207. doi:10.1128/JVI.01454-08 [doi]

Vilotte, J. L., Soulier, S., Essalmani, R., Stinnakre, M. G., Vaiman, D., Lepourry, L., Da Silva, J. C., Besnard, N., Dawson, M., Buschmann, A., Groschup, M., Petit, S., Madelaine, M. F., Rakatobe, S., Le Dur, A., Vilette, D., and Laude, H. (2001). Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *Journal of Virology*, 75(13), 5977-5984. doi:10.1128/JVI.75.13.5977-5984.2001 [doi]

Wang, T. T., Tian, C., Sun, J., Wang, H., Zhang, B. Y., Chen, C., Wang, J., Xiao, K., Chen, L. N., Lv, Y., Gao, C., Shi, Q., Xin, Y., and Dong, X. P. (2016). Down-regulation of brain-derived neurotrophic factor and its signaling components in the brain tissues of scrapie experimental animals. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 79, 318-326. doi:S1357-2725(16)30250-3 [pii]

Weis, C., Marksteiner, J., and Humpel, C. (2001). Nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factor restore the cholinergic neuronal phenotype in organotypic brain slices of the basal nucleus of meynert. *Neuroscience*, 102(1), 129-138. doi:S0306-4522(00)00452-8 [pii]

Wood, J. L., McGill, I. S., Done, S. H., and Bradley, R. (1997). Neuropathology of scrapie: A study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *The Veterinary Record*, 140(7), 167-174.

Yaar, M., Zhai, S., Pilch, P. F., Doyle, S. M., Eisenhauer, P. B., Fine, R. E., and Gilchrest, B. A. (1997). Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for alzheimer's disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(9), 2333-2340. doi:10.1172/JCI119772 [doi]

Yan, Q., Rosenfeld, R. D., Matheson, C. R., Hawkins, N., Lopez, O. T., Bennett, L., and Welcher, A. A. (1997). Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*, 78(2), 431-448. doi:S0306452296006136 [pii]

You, S., Petrov, T., Chung, P. H., and Gordon, T. (1997). The expression of the low affinity nerve growth factor receptor in long-term denervated schwann cells. *Glia*, 20(2), 87-100. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199706)20:23.O.CO;2-1 [pii]

Zhang, H. T., Li, L. Y., Zou, X. L., Song, X. B., Hu, Y. L., Feng, Z. T., and Wang, T. T. (2007). Immunohistochemical distribution of NGF, BDNF, NT-3, and NT-4 in adult rhesus monkey brains. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 55(1), 1-19. doi:jhc.6A6952.2006 [pii]

Zhou, X. F., and Rush, R. A. (1994). Localization of neurotrophin-3-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Brain Research*, 643(1-2), 162-172. doi:0006-8993(94)90022-1 [pii]

Supplementary Table 1. Statistical comparison between terminal, preclinical and control mice for the semi-quantitative parameters evaluated (glial p75^{NTR} labeling, spongiosis, PrP^{Sc} deposits and gliosis).

	Glial p75 ^{NTR} labeling							
	Mean			p-value (Kruskal-Wallis)		Dunn's post-hoc test		
	Control	Preclinical	Terminal			Control vs Preclinical	Control vs Terminal	Preclinical vs Terminal
Mobl	1,50	1,92	3,80	0,0187	*	ns	*	ns
Cb	0,00	0,08	0,00	> 0,05	ns	ns	ns	ns
Mes	0,58	1,00	2,80	0,0067	**	ns	**	ns
Hy	0,67	0,67	1,40	> 0,05	ns	ns	ns	ns
Th	1,67	1,08	1,60	> 0,05	ns	ns	ns	ns
Hp	1,83	1,33	1,40	> 0,05	ns	ns	ns	ns
Tc	0,83	0,92	1,00	> 0,05	ns	ns	ns	ns
Str	1,67	0,58	2,80	0,0020	*	ns	ns	ns
Sn	0,83	1,50	1,00	> 0,05	ns	ns	ns	ns
Fc	1,17	0,50	1,20	> 0,05	ns	ns	ns	ns

	PrP ^{Sc} deposits							
	Mean			p-value (Kruskal-Wallis)		Dunn's post-hoc test		
	Control	Preclinical	Terminal			Control vs Preclinical	Control vs Terminal	Preclinical vs Terminal
Mobl	0,00	2,75	3,33	0,0021	**	*	**	ns
Cb	0,00	0,42	0,50	> 0,05	ns	ns	ns	ns
Mes	0,00	1,67	3,33	0,0036	**	ns	**	ns
Hy	0,00	1,83	2,50	0,0279	*	ns	*	ns
Th	0,00	2,08	2,20	0,0074	**	*	*	ns
Hp	0,00	1,00	0,20	> 0,05	ns	ns	ns	ns
Tc	0,00	0,50	1,30	0,0293	*	ns	*	ns
Str	0,00	1,42	2,50	0,0117	**	ns	**	ns
Sn	0,00	1,50	2,33	0,0031	**	ns	**	ns
Fc	0,00	0,70	1,58	0,0040	**	ns	**	ns

	Spongiosis							
	Mean			p-value (Kruskal-Wallis)		Dunn's post-hoc test		
	Control	Preclinical	Terminal			Control vs Preclinical	Control vs Terminal	Preclinical vs Terminal
Mobl	1,33	1,67	3,70	0,0081	**	ns	*	*
Cb	0,42	0,08	0,20	> 0,05	ns	ns	ns	ns
Mes	1,00	1,25	3,15	0,0058	**	ns	**	*
Hy	0,25	0,50	2,40	0,0063	**	ns	**	*
Th	1,17	1,00	2,90	0,0046	**	ns	*	**
Hp	0,92	0,33	1,60	0,0223	*	ns	ns	*
Tc	1,33	0,75	2,10	0,0028	**	ns	ns	**
Str	1,42	0,58	2,70	0,0017	**	ns	ns	**
Sn	0,58	0,50	1,80	0,0387	*	ns	ns	ns
Fc	1,25	0,42	1,70	0,0066	**	**	ns	**

	Gliosis							
	Mean			p-value (Kruskal-Wallis)		Dunn's post-hoc test		
	Control	Preclinical	Terminal			Control vs Preclinical	Control vs Terminal	Preclinical vs Terminal
Mobl	1,30	2,25	3,75	0,0016	**	ns	**	ns
Cb	0,90	0,58	0,75	> 0,05	ns	ns	ns	ns
Mes	1,30	1,83	3,25	0,0017	**	ns	**	*
Hy	0,80	1,00	2,25	0,0025	**	ns	**	*
Th	1,40	1,50	1,92	> 0,05	ns	ns	ns	ns
Hp	1,80	1,50	2,00	> 0,05	ns	ns	ns	ns
Tc	1,20	1,00	1,50	> 0,05	ns	ns	ns	ns
Str	1,90	0,50	2,50	0,0230	*	ns	ns	*
Sn	1,50	1,58	2,58	0,0025	**	ns	ns	**
Fc	1,50	1,00	1,50	> 0,05	ns	ns	ns	ns

Supplementary Table 2. Statistical comparison between terminal, preclinical and control sheep for the semi-quantitative parameters evaluated (spongiosis and PrP^{Sc} deposits and gliosis).

	Spongiosis							
	Mean			p-value (Kruskal-Wallis test)		Dunn's post-hoc test		
	Control	Preclinical	Terminal			Control vs Preclinical	Control vs Terminal	Preclinical vs Terminal
Mobl	0,00	0,00	1,69	< 0,0001	***	ns	***	***
Pons	0,00	0,17	1,75	0,0002	***	ns	***	*
Cb	0,00	0,17	1,00	> 0,05	ns	ns	ns	ns
Mes	0,00	0,27	1,69	0,0003	***	ns	***	*
Thal	0,00	0,69	1,44	< 0,0001	***	*	***	ns
Str	0,00	0,78	1,08	0,0010	***	**	**	ns
Fc	0,00	0,50	1,00	> 0,05	ns	ns	ns	ns

	PrP ^{Sc} deposits							
	Mean			p-value (Kruskal-Wallis test)		Dunn's post-hoc test		
	Control	Preclinical	Terminal			Control vs Preclinical	Control vs Terminal	Preclinical vs Terminal
Mobl	0,00	1,46	3,50	< 0,0001	***	*	***	ns
Pons	0,00	2,67	3,00	0,0004	***	*	***	ns
Cb	0,00	0,33	2,75	> 0,05	ns	ns	ns	ns
Mes	0,00	0,57	2,44	< 0,0001	***	ns	***	ns
Thal	0,00	0,81	1,75	0,0009	***	ns	**	ns
Str	0,00	0,61	0,25	> 0,05	ns	ns	ns	ns
Fc	0,00	0,33	1,00	> 0,05	ns	ns	ns	ns

ESTUDIO Nº 4

**Cerebrospinal fluid prion disease
biomarkers in pre-clinical and clinical
naturally occurring scrapie**

Cerebrospinal fluid prion disease biomarkers in pre-clinical and clinical naturally occurring scrapie

Abstract

The analysis of the cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers in patients with suspected prion diseases became a useful tool in diagnostic routine. Prion diseases can only be identified at clinical stages when the disease already spread throughout the brain and massive neuronal damage occurs. Consequently, the accuracy of CSF tests detecting non-symptomatic patients is unknown. Here, we aimed to investigate the usefulness of CSF-based diagnostic tests in pre-clinical and clinical naturally occurring scrapie. While decreased total prion protein (PrP) levels and positive PrP seeding activity were already detectable at pre-symptomatic stages, the surrogate markers of neuronal damage total tau (tau) and 14-3-3 proteins were exclusively increased at clinical stages. The present findings confirm that alterations in PrP levels and conformation are primary events in the pathology of prion diseases preceding neuronal damage. Our work also supports the potential use of these tests in the screening of pre-symptomatic scrapie and human prion disease cases.

Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) or prion diseases are fatal transmissible neurodegenerative diseases caused by prions, which abnormally folded, pathological forms of the prion protein (PrP). Prion diseases are characterized by the presence of long incubation periods, ranging from several months to years. After disease onset, they usually present a rapid progression with characteristic spongiform changes associated with neuronal loss and gliosis (Budka, 2003).

Different mammalian species such as mice, sheep and cattle can be affected by prion diseases. The most prevalent type in humans is sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD), developing in patients with no known risk factors and characterized by rapidly progressive dementia and ataxia, although clinical presentation and molecular pathology is heterogeneous (Ironsides *et al.*, 2005; Puoti *et al.*, 2012). Its diagnosis is supported by the analysis of the cerebrospinal fluid (CSF) in suspected sCJD individuals. Among them, two established markers in the routine diagnostic are 14-3-3 and total tau (tau), both considered as markers of neuronal damage (Otto *et al.*, 2002; Sanchez-Juan *et al.*, 2006; Schmitz, Ebert *et al.*, 2016; Zerr *et al.*, 1998). As a test for the direct detection of the pathogen, the real-time quaking induced conversion assay (RT-QuIC) has emerged as a highly specific and sensitive sCJD test (Atarashi *et al.*, 2011; Cramm *et al.*, 2016). The RT-QuIC is based on the ability of pathogenic prion protein to seed recombinant prion protein (rec-PrP) into an amyloid fibril conformation able to uptake

thioflavin-T, causing a change on its emission spectrum that can be monitored in real-time. Additionally, several studies have demonstrated a decrease of total PrP in the CSF of sCJD cases (Abu Rumeileh *et al.*, 2017; Dorey *et al.*, 2015; Meyne *et al.*, 2009), although the precise reason of this observation is unknown. While these tests present high accuracy in detecting sCJD cases, their performance on genetic TSEs is highly dependent on the PrP mutation, which also defines the clinicopathological phenotype of the disease (Gambetti *et al.*, 2003). Importantly, human prion diseases are diagnosed in symptomatic patients, usually at advanced disease stage, as the fast progressive rate of the disease impedes the assessment of pre-symptomatic and early clinical cases. At these stages, massive neuronal damage is detected and even if treatments were available, the benefit would be limited. Thus, there is a need for defining if available CSF tests could detect asymptomatic cases, but CSF human samples at pre-clinical stages are rarely available.

In sheep and goat, scrapie is the naturally occurring prion disease. Absorption of prions from the intestine is considered to be the natural route of infection, which later appear in lymphoid tissues, especially in Peyer's patches at the small intestine, before spreading to the central nervous system (Heggebo *et al.*, 2000; van Keulen *et al.*, 1996; van Keulen *et al.*, 2000). Consequently, contrary to human cases, non-asymptomatic animals infected with prions can be routinely detected by the use of rectal biopsy (Gonzalez *et al.*, 2008).

In order to investigate if current human CSF biomarkers could detect pre-symptomatic prion disease cases, their diagnostic accuracy in pre-clinical and clinical naturally occurring scrapie sheep were tested and compared to controls. The correlations between biomarkers were also studied.

Materials and methods

Animals and tissue collection. A total of 27 female *Rasa Aragonesa* sheep were included in this study. Immunohistochemical analyses of rectal mucosa biopsies (Monleon *et al.*, 2011) were used to identify animals in the pre-clinical disease stage, which were sacrificed before the clinical signs were detectable. Sheep in the clinical stage were identified by assessing clinical signs associated with the disease and neuropathological confirmation by the detection of Proteinase K-resistant prion protein (PrP^{res}) in the brain by immunohistochemical analysis. Age of onset for clinical animals was 52±22 months. PrP^{res} was detected in serial sections of the brain, after formic acid treatment and proteinase K digestion, using the monoclonal primary antibody L42 (1:500; R-Biopharm) as previously described (Monleon *et al.*, 2004). Negative controls were performed omitting the primary antibody from control and scrapie sections. Postmortem examinations revealed no additional pathological

findings. To quantify the presence of PrP^{Sc} in the obex or adjacent brain areas (mesencephalon, pons or cervical spinal cord), a ligand-based enzyme immunoassay (IDEXX HerdChek[®] BSE-Scrapie Antigen Test, hereafter referred to as IDEXX) was used (Garza *et al.*, 2014).

CSF samples were extracted from sheep right after sacrifice and before necropsy. After dissection of the muscles surrounding the atlanto-occipital joint, this joint was flexed dorsally to visualize the ventral section of the foramen magnum, and a puncture using a 20-G needle and a 5-ml syringe was performed on the dura matter penetrating into the subarachnoid space and extracting the CSF carefully to avoid blood contamination.

Mean ages at the time of sacrifice and CSF collection were 67±28 months for controls, 40±20 months for pre-clinical and 54±23 months for clinical animals. Blood contamination was tested using Hemastix[®] (Siemens). Only samples containing less than 80 erythrocytes per µl were included in the study.

CSF tests. Quantification of CSF total tau (tau) (in pg/ml) and 14-3-3 (in Arbitrary Units (AU)) were performed as described previously (Llorens *et al.*, 2016; Schmitz *et al.*, 2016) using the INNOTESThTAU-Ag (Fujirebio) and the CircuLex 14-3-3 gamma (BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH) ELISA kits, respectively. Both kits were designed for detecting human isoforms of tau and 14-3-3 but successfully detected sheep isoforms since antibodies' epitopes were identical in both species. 14-3-3 semi-quantification was performed by Western blot analysis as previously described (Zerr *et al.*, 1998). Total PrP was analyzed by western blot using the anti-PrP antibody SAF32 (40 µl of CSF) and by ELISA using the PrP Sheep kit from Analytik Jena AG. RT-QuIC analysis was performed as described previously (Schmitz, Cramm *et al.*, 2016). Positive cases were considered those above 10000 relative fluorescent units in at least 2 out of 3 replicates.

Statistical analysis. CSF biomarkers were initially tested for normality. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test was applied for groups' comparisons. Correlations between biomarkers were assessed using Spearman's rank correlation coefficient. *p*-values <0.05 were considered as significant.

Ethics. This study was approved by the Ethics Committee for Animal Experiments of the University of Zaragoza (Permit Number: PI38/15) and was carried out in strict accordance with the recommendations for the care and use of experimental animals and in agreement with national law (RD 1201/2005).

Results

A total of 27 sheep (10 controls, 8 pre-clinical and 9 clinical) were included in the study. Pre-clinical animals were identified by immunohistochemical analyses of rectal biopsies, showing PrP^{res} staining in the gut-associated lymphoid tissue (GALT). Three pre-clinical cases also presented significant quantities of pathogenic PrP in the obex or adjacent brain regions as tested positive for IDEXX (**Fig. 1A**).

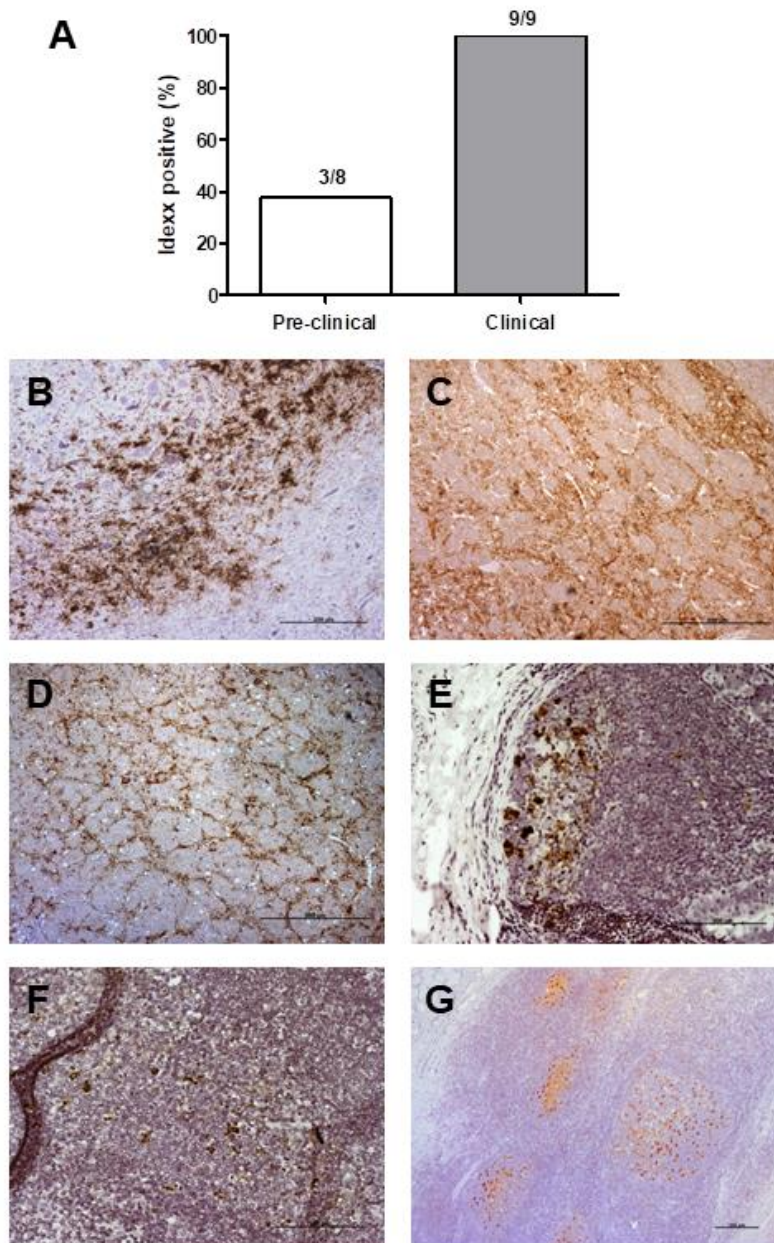


Fig. 1. Detection of pathogenic PrP in naturally occurring scrapie. A) IDEXX analysis of brainsamples from pre-clinical and clinical sheep. Number of positive cases from total is indicated. B-G) Immunohistochemical detection of PrP^{res} in B) obex of pre-clinical sheep, C) obex, and D) mesencephalon of clinical sheep, E) ileal Peyer's patch and F) retropharyngeal lymph node of pre-clinical sheep, and G) mesenteric lymph node of clinical sheep.

Moreover, most pre-clinical animals showed PrP^{res} deposition in the obex and adjacent areas by immunohistochemical techniques, although at a lower extent than clinical sheep (Fig. 1B). Scrapie diagnosis in clinical animals was made on the basis of clinical signs and confirmed by means of PrP^{res} immunodetection in the obex and mesencephalon by immunohistochemical procedures (Fig. 1C, D) and IDEXX (Fig. 1A). Of note, sheep at both the pre-clinical and the clinical stage displayed positive immunostaining not only in intestine-related lymphoid structures, such as Peyer's patches (Fig. 1E), but also in other lymphatic organs (Fig. 1F, G).

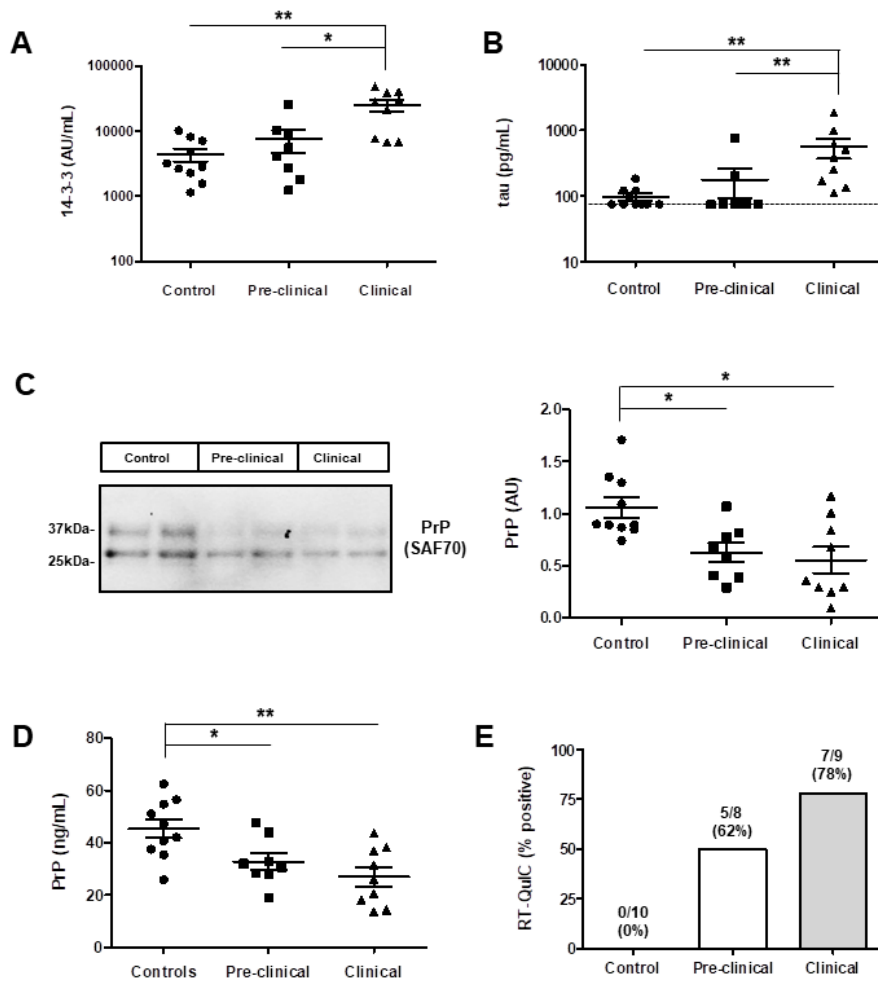


Fig. 2. CSF prion biomarkers in naturally occurring scrapie. Quantification of CSF 14-3-3 (A) and tau (B) by ELISA in control, pre-clinical and clinical sheep. Assay detection limit for tau ELISA (75pg/mL) is indicated with a dashed line. CSF total PrP quantification by western blot (C) and ELISA (D) in control, pre-clinical and clinical sheep. (E) Quantification of RT-QuIC positive cases in the CSF of control, pre-clinical and clinical sheep. Number of positive cases from total and sensitivity is indicated.

CSF 14-3-3 levels were significantly increased in clinical scrapie (25219 ± 15567 AU/mL) compared to controls (4395 ± 3078 AU/mL, $p < 0.01$) and pre-clinical animals (7438 ± 8047 AU/mL, $p < 0.05$) (Fig. 2A). Similarly, CSF tau levels were significantly increased in clinical scrapie (562 ± 561 pg/mL) compared to control (97 ± 36 pg/mL, $p < 0.01$) and pre-clinical

(177 ± 240 pg/mL, $p<0.01$) animals (**Fig. 2B**). While all CSF cases were above assay detection limit for 14-3-3 quantification, 6 controls and 6 pre-clinical cases were below detection limit of the tau assay (75 pg/ml), suggesting the absence of neuronal damage and tau release to the CSF fluid in control and pre-clinical scrapie.

Densitometry quantification of CSF PrP detected by western blot analysis showed decreased PrP levels in pre-clinical and clinical scrapie compared to controls ($p<0.05$) (**Fig. 2C**), which were further confirmed using a PrP-specific sheep ELISA test ($p<0.05$ controls *versus* pre-clinical and $p<0.001$ control *versus* clinical) (**Fig. 2D**). RT-QuIC analysis revealed the presence of positive PrP seeding activity in 62% (5/8) of pre-clinical and 78% (7/9) of clinical scrapie. No positive signal was detected in controls (100% specificity) (**Fig. 2E**).

A significant correlation between CSF 14-3-3 and tau levels in clinical stages was detected ($p<0.05$). No other correlations were detected between biomarkers. Additionally, pre-clinical cases presenting higher 14-3-3 and tau levels, and low PrP levels did not correlate with those displaying positive IDEXX values, and only one of the four positive RT-QuIC cases tested positive for IDEXX.

Discussion

In the present study we demonstrated that CSF tests related to alterations in PrP levels (total PrP quantification) and seeding activity (RT-QuIC) may be useful in the identification of pre-clinical prion cases. Additionally, although statistical differences were not reached, CSF 14-3-3 and tau mean values were higher in pre-clinical animals compared to controls, suggesting that neurodegenerative mechanisms could also be occurring at asymptomatic disease stages. While this study focuses on scrapie, it suggests the possibility that similar alterations might be detected in non-symptomatic human cases in which prion infection is already present. The confirmation of this hypothesis would be important, since a prolonged incubation period between exposure and symptom onset is suggested in human prion cases (Wadsworth & Collinge, 2007). Although CSF samples from sCJD patients are not available, these samples can be collected from asymptomatic PrP gene (*PRNP*) mutation carriers. In this regard, a clinical trial is ongoing in individuals at genetic risk of developing prion disease (Forloni *et al.*, 2015). Therefore, PrP quantification and evaluation of seeding activity could become useful tools tracking disease progression and evaluating the efficiency of therapeutic intervention.

The observation that PrP seeding activity can be detected in the CSF before clinical onset goes in line with a previous report showing positive RT-QuIC signal in the CSF of intracerebrally scrapie-infected hamsters before the onset of clinical signs (Orru *et al.*, 2012). The fact that only one RT-QuIC-positive pre-clinical case was positive for IDEXX

indicates the presence of PrP seeding activity before evident accumulation of pathogenic PrP in the brain tissue. Thus, PrP seeding activity may not require PrP conformations traditionally related to PK-resistance and to PrP^{Sc} structural forms. Whether PrP seeding activity and decreased total CSF PrP are related pathological events needs further clarification, since our study was not able to find correlations between both biomarker outcomes. In a similar manner, the reason for decreased total PrP in the CSF of prion cases is unknown, but it is suggested to be a consequence of its aggregation in the brain tissue, making it less available in the CSF.

Although the number of cases is not optimal for the study of correlation between biomarkers, the lack of association between CSF biomarkers, both at pre-clinical and clinical stages, suggests that each single biomarker may provide independent information about the pathological state of the brain tissue. This is in agreement with the lack of correlation between RT-QuIC and 14-4-3/tau in the CSF of sCJD cases (Cramm *et al.*, 2015). Indeed, a positive correlation was only detected in clinical animals between 14-3-3 and tau, considered as markers of neuronal and axonal damage, respectively.

While CSF 14-3-3 and tau did not appear to be significantly altered in pre-clinical cases in agreement with a lack of evident lesion profiles in the CNS, we cannot rule out the presence of neuro-axonal damage in these cases. Therefore, further studies in large cohorts of control and pre-clinical samples should be carried out in order to establish the precise value of 14-3-3 and tau in detecting asymptomatic animals.

Overall, our data suggest that CSF prion seeding activity and a decrease on CSF total PrP level may be related to prion pathological events and useful tools to detect pre-clinical and early-clinical prion cases in scrapie and, potentially, also in humans.

References

Abu Rumeileh, S., Lattanzio, F., Stanzani Maserati, M., Rizzi, R., Capellari, S., and Parchi, P. (2017). Diagnostic accuracy of a combined analysis of cerebrospinal fluid t-PrP, t-tau, p-tau, and Abeta42 in the differential diagnosis of creutzfeldt-jakob disease from alzheimer's disease with emphasis on atypical disease variants. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 55(4), 1471-1480. doi:10.3233/JAD-160740 [doi]

Atarashi, R., Satoh, K., Sano, K., Fuse, T., Yamaguchi, N., Ishibashi, D., Matsubara, T., Nakagaki, T., Yamanaka, H., Shirabe, S., Yamada, M., Mizusawa, H., Kitamoto, T., Klug, G., McGlade, A., Collins, S. J., and Nishida, N. (2011). Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nature Medicine*, 17(2), 175-178. doi:10.1038/nm.2294 [doi]

Budka, H. (2003). Neuropathology of prion diseases. *British Medical Bulletin*, *66*, 121-130. doi:10.1093/bmb/66.1.121 [doi]

Cramm, M., Schmitz, M., Karch, A., Mitrova, E., Kuhn, F., Schroeder, B., Raeber, A., Varges, D., Kim, Y. S., Satoh, K., Collins, S., and Zerr, I. (2016). Stability and reproducibility underscore utility of RT-QuIC for diagnosis of creutzfeldt-jakob disease. *Molecular Neurobiology*, *53*(3), 1896-1904. doi:10.1007/s12035-015-9133-2 [doi]

Cramm, M., Schmitz, M., Karch, A., Zafar, S., Varges, D., Mitrova, E., Schroeder, B., Raeber, A., Kuhn, F., and Zerr, I. (2015). Characteristic CSF prion seeding efficiency in humans with prion diseases. *Molecular Neurobiology*, *51*(1), 396-405. doi:10.1007/s12035-014-8709-6 [doi]

Dorey, A., Tholance, Y., Vighetto, A., Perret-Liaudet, A., Lachman, I., Krolak-Salmon, P., Wagner, U., Struyfs, H., De Deyn, P. P., El-Moualij, B., Zorzi, W., Meyronet, D., Streichenberger, N., Engelborghs, S., Kovacs, G. G., and Quadrio, I. (2015). Association of cerebrospinal fluid prion protein levels and the distinction between alzheimer disease and creutzfeldt-jakob disease. *JAMA Neurology*, *72*(3), 267-275. doi:10.1001/jamaneurol.2014.4068 [doi]

Forloni, G., Tettamanti, M., Lucca, U., Albanese, Y., Quaglio, E., Chiesa, R., Erbetta, A., Villani, F., Redaelli, V., Tagliavini, F., Artuso, V., and Roiter, I. (2015). Preventive study in subjects at risk of fatal familial insomnia: Innovative approach to rare diseases. *Prion*, *9*(2), 75-79. doi:10.1080/19336896.2015.1027857 [doi]

Gambetti, P., Kong, Q., Zou, W., Parchi, P., and Chen, S. G. (2003). Sporadic and familial CJD: Classification and characterisation. *British Medical Bulletin*, *66*, 213-239. doi:10.1093/bmb/66.1.213 [doi]

Garza, M. C., Monzon, M., Marin, B., Badiola, J. J., and Monleon, E. (2014). Distribution of peripheral PrP(sc) in sheep with naturally acquired scrapie. *PloS One*, *9*(5), e97768. doi:10.1371/journal.pone.0097768 [doi]

Gonzalez, L., Dagleish, M. P., Martin, S., Dexter, G., Steele, P., Finlayson, J., and Jeffrey, M. (2008). Diagnosis of preclinical scrapie in live sheep by the immunohistochemical examination of rectal biopsies. *The Veterinary Record*, *162*(13), 397-403. doi:162/13/397 [pii]

Heggebo, R., Press, C. M., Gunnes, G., Lie, K. I., Tranulis, M. A., Ulvund, M., Groschup, M. H., and Landsverk, T. (2000). Distribution of prion protein in the ileal peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *The Journal of General Virology*, *81*(Pt 9), 2327-2337. doi:10.1099/0022-1317-81-9-2327 [doi]

Ironside, J. W., Ritchie, D. L., and Head, M. W. (2005). Phenotypic variability in human prion diseases. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 31(6), 565-579. doi:NAN697 [pii]

Llorens, F., Schmitz, M., Karch, A., Cramm, M., Lange, P., Gherib, K., Varges, D., Schmidt, C., Zerr, I., and Stoeck, K. (2016). Comparative analysis of cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of neurodegenerative dementia. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 12(5), 577-589. doi:10.1016/j.jalz.2015.10.009 [doi]

Meyne, F., Gloeckner, S. F., Ciesielczyk, B., Heinemann, U., Krasnianski, A., Meissner, B., and Zerr, I. (2009). Total prion protein levels in the cerebrospinal fluid are reduced in patients with various neurological disorders. *Journal of Alzheimer's Disease*, 17(4), 863-873. doi:10.3233/JAD-2009-1110 [doi]

Monleon, E., Garza, M. C., Sarasa, R., Alvarez-Rodriguez, J., Bolea, R., Monzon, M., Vargas, M. A., Badiola, J. J., and Acin, C. (2011). An assessment of the efficiency of PrPsc detection in rectal mucosa and third-eyelid biopsies from animals infected with scrapie. *Veterinary Microbiology*, 147(3-4), 237-243. doi:10.1016/j.vetmic.2010.06.028 [doi]

Monleon, E., Monzon, M., Hortells, P., Vargas, A., Acin, C., and Badiola, J. J. (2004). Detection of PrPsc on lymphoid tissues from naturally affected scrapie animals: Comparison of three visualization systems. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 52(2), 145-151. doi:10.1177/002215540405200201 [doi]

Orru, C. D., Hughson, A. G., Race, B., Raymond, G. J., and Caughey, B. (2012). Time course of prion seeding activity in cerebrospinal fluid of scrapie-infected hamsters after intratongue and intracerebral inoculations. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1464-1466. doi:10.1128/JCM.06099-11 [doi]

Otto, M., Wiltfang, J., Cepek, L., Neumann, M., Mollenhauer, B., Steinacker, P., Ciesielczyk, B., Schulz-Schaeffer, W., Kretschmar, H. A., and Poser, S. (2002). Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of creutzfeldt-jakob disease. *Neurology*, 58(2), 192-197. doi:10.1212/wnl.58.2.192 [doi]

Puoti, G., Bizzi, A., Forloni, G., Safar, J. G., Tagliavini, F., and Gambetti, P. (2012). Sporadic human prion diseases: Molecular insights and diagnosis. *The Lancet.Neurology*, 11(7), 618-628. doi:10.1016/S1474-4422(12)70063-7 [doi]

Sanchez-Juan, P., Green, A., Ladogana, A., Cuadrado-Corrales, N., Saanchez-Valle, R., Mitrova, E., Stoeck, K., Sklaviadis, T., Kulczycki, J., Hess, K., Bodemer, M., Slivarichova, D., Saiz, A., Calero, M., Ingrosso, L., Knight, R., Janssens, A. C., van Duijn, C. M., and Zerr, I. (2006). CSF tests in the differential diagnosis of creutzfeldt-jakob disease. *Neurology*, 67(4), 637-643. doi:67/4/637 [pii]

Schmitz, M., Cramm, M., Llorens, F., Muller-Cramm, D., Collins, S., Atarashi, R., Satoh, K., Orru, C. D., Groveman, B. R., Zafar, S., Schulz-Schaeffer, W. J., Caughey, B., and Zerr, I. (2016). The real-time quaking-induced conversion assay for detection of human prion disease and study of other protein misfolding diseases. *Nature Protocols*, *11*(11), 2233-2242. doi:10.1038/nprot.2016.120 [doi]

Schmitz, M., Ebert, E., Stoeck, K., Karch, A., Collins, S., Calero, M., Sklaviadis, T., Laplanche, J. L., Golanska, E., Baldeiras, I., Satoh, K., Sanchez-Valle, R., Ladogana, A., Skinningsrud, A., Hammarin, A. L., Mitrova, E., Llorens, F., Kim, Y. S., Green, A., and Zerr, I. (2016). Validation of 14-3-3 protein as a marker in sporadic creutzfeldt-jakob disease diagnostic. *Molecular Neurobiology*, *53*(4), 2189-2199. doi:10.1007/s12035-015-9167-5 [doi]

van Keulen, L. J., Schreuder, B. E., Meloen, R. H., Mooij-Harkes, G., Vromans, M. E., and Langeveld, J. P. (1996). Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *Journal of Clinical Microbiology*, *34*(5), 1228-1231.

van Keulen, L. J., Schreuder, B. E., Vromans, M. E., Langeveld, J. P., and Smits, M. A. (2000). Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Archives of Virology. Supplementum*, *(16)*(16), 57-71.

Wadsworth, J. D., and Collinge, J. (2007). Update on human prion disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1772*(6), 598-609. doi:S0925-4439(07)00059-2 [pii]

Zerr, I., Bodemer, M., Gefeller, O., Otto, M., Poser, S., Wiltfang, J., Windl, O., Kretzschmar, H. A., and Weber, T. (1998). Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of creutzfeldt-jakob disease. *Annals of Neurology*, *43*(1), 32-40. doi:10.1002/ana.410430109 [doi]



SECCIÓN **IV**

Discusión general

La existencia de cepas y las barreras de transmisión son dos fenómenos característicos de las enfermedades priónicas, que condicionan la transmisión de los priones no sólo en un contexto experimental (tanto entre individuos de la misma especie como entre especies), sino también en condiciones naturales, afectando por lo tanto a la capacidad de dispersión de estos agentes patógenos en poblaciones animales y entre los seres humanos. A pesar de que los determinantes moleculares de estos fenómenos no se comprenden todavía con absoluta claridad, los modelos más recientes apuntan a una fuerte relación entre ambos. Así, el modelo de selección conformacional (Collinge & Clarke, 2007) interpreta las cepas como mezclas o “nubes” de conformaciones de PrP^{Sc} diferentes, entre las cuales existe una predominante que determina las características fenotípicas de la enfermedad. Sin embargo, en esta “nube” pueden estar presentes isoformas de PrP^{Sc} minoritarias, en ocasiones llamadas “subcepas” o “cuasi-especies”, que se transmiten y replican junto con el conformero dominante por debajo del umbral de detección de las técnicas actuales. Para evidenciar la presencia de estas subcepas, es necesario el empleo de modelos y metodologías que puedan propagarlas selectivamente.

Por su parte, el término “barrera de transmisión” es relativamente nuevo. Esta terminología surge de la evolución del concepto de “barrera de especie” (Priola, 1999), que se empleaba para referirse a la dificultad encontrada a la hora de transmitir ciertos tipos de priones a especies distintas a la del hospedador natural. Los estudios posteriores sugirieron que la causa principal de estas bajas eficiencias de transmisión interespecífica era la falta de identidad entre las secuencias de la PrP (Bartz *et al.*, 1994; Prusiner *et al.*, 1990; Scott, M. *et al.*, 1989). Estos resultados llevaron a revisar el concepto de barrera de especie y sustituir este término por la denominación de “barrera genotípica” o de secuencia. En consecuencia, el grado de solapamiento de las secuencias de PrP^C de dos especies influye de forma importante en la facilidad o dificultad de transmisión de priones entre ellas (Collinge & Clarke, 2007).

Sin embargo, el concepto actual de “barrera de transmisión” (Collinge, 1999; Supattapone *et al.*, 1999) recoge también en su definición otros fenómenos que imponen trabas a la transmisión de priones entre individuos o especies. El más importante es la “barrera de cepa” (Scott, M. R. *et al.*, 2005). Esta terminología reconoce el papel que juega la cepa priónica en la eficiencia de transmisión (Bessen & Marsh, 1992a; Bessen & Marsh, 1992b), siendo según algunos autores incluso el determinante principal (Jones & Surewicz, 2005; Torres *et al.*, 2014). Además de la secuencia y la cepa, existen otras barreras de menor importancia o menos conocidas, como por ejemplo la “barrera de cofactor” (Baskakov, 2014).

De acuerdo con el modelo de selección conformacional, y desde un punto de vista molecular, una barrera de transmisión ocurre cuando la secuencia o estructura primaria de la PrP^C del nuevo hospedador no es compatible con la isoforma de PrP^{Sc}

predominante en el inóculo, es decir, cuando no puede malplegarse adoptando la conformación de dicha isoforma mayoritaria. De esa situación pueden derivarse dos posibilidades: si existen conformaciones minoritarias que sí sean compatibles, una de ellas se propagará selectivamente, apareciendo una barrera de transmisión parcial acompañada de un cambio fenotípico (“mutación” de cepa aparente); si no hay conformaciones compartidas, se observará una completa falta de transmisión, que será interpretada como una barrera absoluta (Collinge & Clarke, 2007).

Ambos fenómenos, las cepas y las barreras de transmisión, son por lo tanto manifestaciones de la propia naturaleza conformacional de los procesos de selección y propagación de los priones. La consecuencia directa de esta natural adaptabilidad de los aislados priónicos es que el estudio de la variabilidad real de cepas en una determinada EET debe realizarse con cautela, seleccionando los modelos apropiados, pues distintas aproximaciones experimentales podrían provocar la amplificación selectiva de confórmeros distintos del mayoritario. Por su parte, si lo que se quiere es identificar de forma integral y sistemática todas las variantes de PrP^{Sc} presentes en un aislado, debe emplearse siempre más de un modelo para poder evidenciar subcepas minoritarias presentes en baja proporción. El primer estudio de esta tesis es un buen ejemplo de este fenómeno. En él, se encontraron al menos tres componentes en los aislados de scrapie natural analizados. El componente mayoritario en casi todos ellos (salvo un aislado de origen linfoide) poseía un perfil bioquímico con la banda no glicosilada a 19 kDa y predominancia de la banda diglicosilada; en el estudio se le identifica como “19k”. Esta firma bioquímica es característica de la cepa experimental CH1641 y de algunos aislados naturales con propiedades biológicas similares a la misma, incluyendo características de transmisión diferentes de las de la mayor parte de aislados de scrapie natural (Baron & Biacabe, 2007; Foster & Dickinson, 1988; Hope *et al.*, 1999). Las otras dos subcepas presentes en nuestros inóculos poseían un patrón de bandas similar, con la banda no glicosilada a 21 kDa; sin embargo, sus propiedades patobiológicas fueron completamente diferentes.

La primera subcepa de 21 kDa (denominada “21k-TgShp XI”) se propagó selectivamente en ratones TgShp XI tras la infección con tres inóculos de origen nervioso (3N, 4N y 5N), provocando periodos de supervivencia, patrones lesionales y perfiles de distribución similares a los de la cepa “19K”. Asimismo, el inóculo de origen linfoide 7L contenía esta subcepa como componente mayoritario y dio lugar al mismo patrón de transmisión y características patológicas en los ratones TgShp XI.

La otra subcepa de 21 kDa, a la que se hace referencia como “21k-Tg338”, fue capaz de propagarse únicamente en ratones Tg338, dando lugar a patrones de transmisión atípicos y a una presentación neuropatológica característica. En contra del resto de aislados, que provocaron periodos de supervivencia que o bien fueron estables desde el primer pase o bien se acortaron en el segundo, los inóculos de origen linfoide 2L, 4L,

5L, 6L y 8L causaron enfermedad con tasas de ataque incompletas y periodos de supervivencia muy prolongados en ambos países. La gravedad de las lesiones a nivel histopatológico fue menor y la acumulación de PrP^{Sc} en la médula espinal fue inconstante, puesto que no se demostró en algunos de los grupos de ratones inoculados. Adicionalmente, en algunos animales inoculados con los aislados 6L y 8L se observaron placas en el encéfalo, compuestas de PrP y positivas a tinción con rojo Congo, lo que demuestra su naturaleza amiloide. Todos estos indicios sugieren que la subcepa “21k-Tg338”, a pesar de estar presente en bajas proporciones, es capaz de interferir con la propagación de la cepa mayoritaria “19k”, retrasando la instauración de la neuropatología y, por tanto, la aparición de signos clínicos. Este efecto de interferencia o competición, que ha sido descrito previamente con otras cepas de scrapie adaptado al ratón (Dickinson *et al.*, 1972), podría estar mediado por una propensión más alto de lo normal a formar agregados de PrP^{Sc} en formato de amiloide. Se conoce que las formas de PrP^{Sc} con mayor capacidad neurotóxica son los oligómeros de bajo peso molecular (Collinge & Clarke, 2007; Hill *et al.*, 2000; Hill & Collinge, 2003), y algunos autores sugieren que la amiloidogénesis podría ser un mecanismo de defensa del organismo para proteger al tejido nervioso de su efecto patógeno mediante su secuestro en estructuras de mayor tamaño y relativamente inertes (Chesebro *et al.*, 2005; Piccardo *et al.*, 2007; Tuzi *et al.*, 2008).

Los datos indican que el componente “21k-Tg338” se encuentra exclusivamente en el sistema linfóide de las ovejas, aunque esto no parece impedir que se propague en el tejido nervioso de los ratones Tg338, aunque lo haga con menor eficacia. Es posible que esta subcepa se halle optimizada para su replicación en el sistema linforreticular y que ello se asocie con su baja neurotoxicidad. Investigar si los ratones Tg338 inoculados con estos aislados acumularon PrP^{Sc} de 21 kDa en sus órganos linfoides podría ser de gran interés para la continuación de este estudio.

El hecho de que no todos los ratones TgShp XI inoculados manifestaran el fenotipo asociado a la subcepa “21k-TgShp XI”, ni todos los Tg338 el fenotipo de “21k-Tg338”, sugiere que estos dos componentes coexisten en los inóculos originales con la isoforma mayoritaria “19k”, o dicho de otra forma, no son generados *de novo* durante la transmisión a los modelos experimentales, como parece ser el caso en otras aproximaciones experimentales (Le Dur *et al.*, 2017).

Adicionalmente, nuestros resultados parecen indicar que la coinfección de los animales de la especie ovina con varias subcepas de scrapie es más frecuente que la infección con un solo componente. Nuestro estudio refuerza la idea de que la utilización de más de un modelo experimental es siempre precisa para discriminar estas mezclas de subcepas. Sin embargo, no es posible asegurar que los aislados que manifestaron el fenotipo “19k” en ambas líneas contengan cepas puras, puesto que

podría ser posible evidenciar otros componentes, distintos de los identificados, haciendo un estudio más minucioso con un mayor número de modelos transgénicos.

La presencia de múltiples componentes en los aislados priónicos no es una novedad, ya que se ha descrito con frecuencia en casos naturales de scrapie (Beck *et al.*, 2012; Thackray *et al.*, 2012; Vulin *et al.*, 2012; Yokoyama *et al.*, 2010) y en otras EET. El caso más llamativo es la presencia de pequeñas cantidades del agente responsable de la sCJD en el cerebro de pacientes de vCJD (Yull *et al.*, 2006).

A pesar de estas observaciones, nuestro estudio no aborda la cuestión sobre los mecanismos que permiten a cada modelo murino transgénico amplificar selectivamente cada una de las subcepas. A este respecto, existen dos diferencias fundamentales entre las líneas TgShp XI y Tg338. La primera es la secuencia de la PrP^C que expresan (ARQ vs. VRQ); el modelo de selección conformacional explica perfectamente cómo la secuencia primaria determina el rango de cepas a las que un individuo o especie son susceptibles (Collinge & Clarke, 2007). La segunda son los niveles de expresión de la PrP^C (4-8x vs. 8-10x). Un estudio de reciente publicación (Le Dur *et al.*, 2017) reveló como el nivel de expresión es capaz de afectar a la capacidad de amplificación de confórmeros específicos, supuestamente debido a una competición cinética durante la formación de las fibras de PrP^{Sc}. Es posible que la línea Tg338, con sus elevados niveles de expresión, sea capaz de amplificar las pequeñas cantidades del componente “21k-Tg338” presentes en algunos de los aislados testados. Asimismo, como ya proponen los autores del citado estudio, este mecanismo podría explicar la acumulación de subcepas diferentes en el óbex y los linfonodos mesentéricos de las ovejas, puesto que se sabe que el tejido nervioso y el linfoide poseen distintos niveles de expresión de la PrP^C.

En esta misma línea, otro de los factores que son capaces de afectar a la amplificación selectiva de cepas priónicas es la glicosilación, tanto a nivel de bioensayo (Tuzi *et al.*, 2008; Wiseman *et al.*, 2015) como en propagaciones experimentales *in vitro* (Camacho *et al.*, 2019; Makarava *et al.*, 2013; Nishina *et al.*, 2006). Dado que se han descrito diferencias en la glicosilación de la PrP^C entre tejidos, como por ejemplo entre el tejido nervioso y el sistema linforreticular (Katorcha *et al.*, 2014), se podría sugerir que estas diferencias podrían ser responsables de la acumulación selectiva de ciertas cepas en SLR, por ejemplo en linfonodo mesentérico, como hemos observado. Los distintos mecanismos propuestos para explicar las observaciones del primer estudio de la tesis no son mutuamente excluyentes y podrían estar trabajando a la vez.

El papel de la glicosilación en estos eventos ha sido explorado en mayor profundidad en el segundo estudio de esta tesis. Como se ha dicho, la glicosilación afecta de manera importante a las barreras de transmisión y la selección de cepas. Algunos autores proponen que esto se debe a una compatibilidad estérica entre PrP^C y PrP^{Sc},

que bien permite o dificulta la incorporación de nuevos monómeros a la fibra creciente de amiloide de PrP^{Sc}.

En concreto, nuestro estudio pretende analizar el efecto de la glicosilación en la propagación selectiva de cepas de naturaleza atípica, y concretamente de las procedentes de pacientes humanos. Para ello, se emplearon dos aproximaciones: una *in vitro*, mediante PMCA y otra *in vivo*, mediante bioensayo. En ambos casos, se hizo uso del modelo TgNN6h, que expresa una variante mutada de la PrP^C humana en la que los residuos de asparagina donde se unen los glicanos son sustituidos, de forma que se bloquea la glicosilación normal de la proteína.

Al no existir moléculas de PrP^C glicosilada en el sustrato de la reacción de PMCA, se consiguieron propagar de forma relativamente eficiente varias cepas humanas con características atípicas, incluyendo GSS A117V y VPSPr, lo que, según nuestro conocimiento, constituye una de las primeras descripciones de amplificación *in vitro* de estas cepas. Sin embargo, la eficiencia de propagación siguió siendo superior para las cepas clásicas sCJDMM1, sCJDMM2 y sFl. Parece que, a pesar de la falta de glicosilación, sigue manteniéndose un fenómeno de “barrera de cepa”, que dificulta en cierta medida la propagación de priones atípicos. La PMCA ha sido utilizada de forma escasa para la amplificación de cepas atípicas, por lo que existe un número limitado de estudios con los que poder comparar nuestros datos (Peden *et al.*, 2014; Wang, Z. *et al.*, 2019).

En lo referente al bioensayo, se debe señalar que la mayoría de los intentos previos de transmitir cepas humanas atípicas a modelos murinos se basaron en introducir las mutaciones causales en la PrP^C del ratón, o bien expresar transgénicamente la propia PrP^C humana mutada, con el fin de abolir la barrera de secuencia y facilitar la transmisión. Estas aproximaciones tuvieron un éxito limitado, especialmente en el caso del GSS provocado por la mutación A117V, cuya eficiencia de transmisión continuó siendo baja, tal como indican las bajas tasas de ataque y los prolongados periodos de incubación (>600 dpi) de los animales muertos con signos clínicos (Asante *et al.*, 2013).

En nuestro estudio, en contraste, hemos conseguido transmitir esta cepa atípica a ratones TgNN6h mediante su adaptación previa al sustrato humano no glicosilado mediante PMCA. Los ratones TgNN6h mostraron periodos de incubación sensiblemente más cortos que los observados con los mencionados modelos previos (Asante *et al.*, 2013), lo que parece indicar una mayor susceptibilidad de la línea TgNN6h a esta y, posiblemente, otras cepas atípicas.

En concordancia con esta hipótesis, la VPSPr-129V/V, considerada el prototipo de los priones atípicos espontáneos en humanos, se transmitió con periodos de incubación razonablemente cortos (378 dpi) a ratones TgNN6h tras una inoculación directa,

mientras que la infección experimental de un modelo humano normalmente glicosilado (ratones Tg340) no provocó enfermedad ni a nivel clínico ni a nivel subclínico. La interpretación más razonable de estas observaciones es que la ausencia de glicanos en la PrP^C del modelo TgNN6h es la responsable de esta susceptibilidad incrementada.

Adicionalmente, cuando se trató de infectar ratones Tg340 con las cepas GSS A117V y VPSPr-129V/V adaptadas previamente al modelo TgNN6h por PMCA, éstos no desarrollaron una enfermedad priónica en más de 700 dpi, ni se hallaron rastros de acúmulo de PrP^{Sc} en estos animales. Existe la posibilidad de que esa observación se deba a que las diferencias entre las secuencias de la PrP^C de TgNN6h y Tg340 introducen una barrera genotípica que impide unidireccionalmente esta infección. Sin embargo, es tentador sugerir que la reintroducción de los glicanos en la PrP^C sea la auténtica responsable de impedir la propagación de una cepa atípica que ya estaría estabilizada al modelo no glicosilado.

En este mismo trabajo, se analizaron los patrones de transmisión de un aislado denominado GSS 6OPRI. Los casos de enfermedad priónica causados por mutaciones de inserción en la zona de repetición del octapeptido (OPRI) cursan a veces con fenotipos clásicos similares a los del CJD, y otras con manifestaciones atípicas características del GSS (Collinge *et al.*, 1992). Esto lleva a suponer que al menos algunos de estos aislados pueden contener mezclas de componentes clásicos y atípicos. Como ya se ha mencionado más arriba en relación con el primer estudio de esta tesis, la coexistencia de confórmeros o subcepas en los aislados priónicos es un fenómeno recurrente que ha sido descrito en numerosas ocasiones (Beck *et al.*, 2012; Thackray *et al.*, 2012; Vulin *et al.*, 2012; Yokoyama *et al.*, 2010; Yull *et al.*, 2006).

Nuestro aislado de GSS 6OPRI se pudo transmitir tanto a ratones Tg340 como a ratones TgNN6h; sin embargo, el fenotipo manifestado por cada línea murina tras la infección fue claramente distinto, fundamentalmente a nivel de las características neuropatológicas. Ésta se asemejaba fuertemente a la del sCJDMM1 en Tg340, con depósitos de tipo sináptico en corteza cerebral y área septal fundamentalmente. Por el contrario, en TgNN6h fue similar a la del resto de cepas atípicas transmitidas y se caracterizaba por la presencia de acúmulos coalescentes y *plaque-like*, que en algunas localizaciones llegaban a formar placas de amiloide auténticas, y por una severa vacuolización del tejido nervioso, especialmente a nivel del hipocampo.

Los datos sugieren, por lo tanto, que el aislado original de GSS 6OPRI utilizado en nuestro estudio contenía una cepa mayoritaria de naturaleza clásica, similar a la responsable del sCJD, y una baja proporción de un componente atípico, que recibió una ventaja selectiva en el modelo TgNN6h, posiblemente debido a la falta de glicosilación de su PrP^C. Estas observaciones, conjuntamente con los resultados globales del primer estudio de la tesis, refuerzan la noción de que algunos aislados

priónicos contienen mezclas de subcepas o componentes que pueden ser separados y selectivamente amplificados mediante metodologías apropiadas, ya sean *in vitro*, como la PMCA, o *in vivo*, como el bioensayo en líneas murinas transgénicas expresando distintas formas de la proteína prión celular.

No obstante, hay que señalar que las características neuropatológicas observadas en los ratones TgNN6h infectados con cualquiera de las tres cepas atípicas (VPSPr-129V/V, GSS A117V y GSS 6OPRI) presentaban similitudes notorias, fundamentalmente por la presencia de gran cantidad de placas de amiloide. Esto podría indicar que este fenotipo es un artefacto consecuencia de la ausencia de glicosilación de la PrP^C en este modelo, ya que se sabe que ésta se asocia con la formación de placas de amiloide en localización atípicas (Chesebro *et al.*, 2005; Tuzi *et al.*, 2008). No obstante, se apreció que cada una de estas tres cepas poseía características neuropatológicas distintivas: VPSPr-129V/V afectó intensamente al cerebelo, GSS A117V provocó una afección severa de la corteza cerebral y el hipocampo con presencia de grandes placas amorfas, y GSS 6OPRI dio lugar a una distribución más restringida de las placas y a un cambio espongiiforme con características diferenciales. Podemos asegurar, por lo tanto, que el hospedador no es, al menos, el único determinante de este fenotipo. El éxito en la transmisión de una cepa prototípicamente clásica, como el sCJDMM1, a ratones TgNN6h, y la manifestación por parte de estos de características neuropatológicas clásicas, permitirían descartar completamente que estas observaciones sean artefactuales; hay que resaltar que este experimento está actualmente en marcha.

La presencia de muerte neuronal es un hallazgo neuropatológico frecuente en los casos de enfermedad priónica (Budka *et al.*, 1995; Budka, 2003). Sin embargo, los mecanismos responsables de este fenómeno no se han aclarado por completo. Las neurotrofinas son un grupo de factores de crecimiento que ejercen sus funciones específicamente en el sistema nervioso y que parecen ser clave en varios procesos de la homeostasis y el desarrollo del tejido nervioso, tanto durante las fases embrionarias como durante la etapa adulta (Bibel & Barde, 2000). Sin embargo, también han sido vinculadas a varios tipos de procesos neurodegenerativos y otros procesos que cursan con daño neuronal (Dawbarn & Allen, 2003; Shu *et al.*, 2015). Entre los receptores de membrana que median la respuesta biológica de las neurotrofinas, el receptor p75^{NTR}, perteneciente a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), se posiciona en la encrucijada entre las vías que desencadenan la muerte celular por apoptosis y las que median la supervivencia neuronal (Meeker & Williams, 2015). Además, varios estudios han demostrado la existencia de una relación en el receptor p75^{NTR} y la patogenia de las EET: por una parte, se ha visto que la estimulación de p75^{NTR} con el péptido sintético PrP106-126 induce neurotoxicidad en un modelo celular (Bai *et al.*, 2008; Della-Bianca *et al.*, 2001); por otra, la espongiosis, los acúmulos de PrP^{Sc} y la gliosis se correlacionaron topográficamente con la sobreexpresión de p75^{NTR} en un modelo murino de la BSE (Marco-Salazar *et al.*, 2014).

En el tercer estudio de esta tesis, se ha estudiado el papel de p75^{NTR} en las enfermedades priónicas utilizando dos modelos distintos: en primer lugar, el modelo natural ovino (ovejas afectadas naturalmente por scrapie en estadios terminal y preclínico, así como ovejas control), y en segundo lugar, un modelo murino transgénico que expresa la PrP^C ovina (línea Tg338) infectado experimentalmente con scrapie.

Nuestros resultados sugieren una cierta participación del receptor p75^{NTR} en la patogenia de la neurodegeneración en las EET. En el modelo Tg338, se observó un aumento del número de células gliales positivas a p75^{NTR}, cuya morfología y localización recordaban a las de los astrocitos, en individuos infectados tanto en estadio terminal como preclínico, con respecto a los individuos control. Este incremento presentó una correlación positiva clara con otros hallazgos neuropatológicos característicos de las enfermedades priónicas, como el cambio esponjiforme, los depósitos de PrP^{Sc} y la astrogliosis, en concordancia con los estudios previamente mencionados (Marco-Salazar *et al.*, 2014). Adicionalmente, la aplicación de técnicas de microscopia confocal demostró una colocalización entre p75^{NTR} y el marcador de astrocitos GFAP. En conjunto, estas observaciones sugieren una asociación biológicamente relevante entre el receptor p75^{NTR} y la patogenia de las EET.

Este inmunomarcaje astrocítico para p75^{NTR} no fue descrito, sin embargo, en el modelo ovino. La literatura académica sobre el tema recoge testimonios de otros modelos animales de enfermedad priónica en los que tampoco se describió la aparición de este receptor en la glía (Wang, T. T. *et al.*, 2016). A pesar de ello, la expresión de este y otros receptores de neurotrofinas ha sido descrita ampliamente en astrocitos y otras células gliales en ratones y otras especies. Algunos estudios han demostrado que los astrocitos son capaces tanto de secretar neurotrofinas (Domeniconi *et al.*, 2007; Furukawa *et al.*, 1986) como de responder a ellas mediante la expresión en su membrana plasmática de los receptores específicos, entre ellos el receptor p75^{NTR} (Becker *et al.*, 2018; Cragolini & Friedman, 2008). Asimismo, p75^{NTR} parece jugar papeles importantes en la biología de este tipo glial, tanto en condiciones de homeostasis (Cragolini *et al.*, 2009; Cragolini *et al.*, 2012; Ishii *et al.*, 2018) como en la patogenia de varios trastornos (Kust *et al.*, 2003; Pehar *et al.*, 2004; Shephard *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2015). Otras células gliales también expresan este receptor, incluyendo oligodendrocitos, microglía (Dowling *et al.*, 1999), células de Schwann y aldinoglia (Taniuchi *et al.*, 1986; You *et al.*, 1997).

En nuestro estudio, además de aplicar una metodología de valoración semicuantitativa para evaluar tanto el marcaje glial de p75^{NTR} como la esponjiosis, los depósitos de PrP^{Sc} y la gliosis, cuantificamos la tinción global debida a p75^{NTR} empleando una aproximación computarizada, basada en el análisis de imagen de microfotografías tomadas de muestras de encéfalo sometidas a inmunohistoquímica. Esta metodología,

aunque no permitió identificar diferencias entre los grupos de ratones, sí evidenció diferencias significativas de los individuos preclínicos de la especie ovina, con respecto a los individuos controles, a nivel de varios núcleos y áreas encefálicas, como la médula oblongada y el puente del tronco del encéfalo. Este resultado sugiere la existencia de una sobreexpresión del receptor p75^{NTR} en las fases tempranas de la neurodegeneración causada por priones, al menos en ciertas áreas encefálicas, en concordancia con otros estudios que encontraron resultados similares en otras enfermedades neurodegenerativas (Mufson & Kordower, 1992). Por el contrario, los ovinos en estadio terminal no mostraron habitualmente diferencias significativas con respecto a los controles; esta observación se podría explicar a través de la pérdida neuronal que ocurre en las fases más avanzadas de la enfermedad. Esta interpretación está en línea con algunos estudios en los que se observó una pérdida de marcaje neuronal para p75^{NTR} atribuible a la pérdida neuronal asociada a la enfermedad (Gerhauser *et al.*, 2012; Spitzbarth *et al.*, 2015; Weis *et al.*, 2001).

El diagnóstico de las enfermedades priónicas tanto en animales como en seres humanos es complicado por el hecho de que el único marcador que actualmente puede vincularse indiscutiblemente con una EET es la presencia de la proteína prion patológica o PrP^{Sc} en el tejido nervioso. Este hecho dificulta el diagnóstico *ante-mortem* de la enfermedad, así como la identificación de individuos en estadio preclínico, reduciendo las posibilidades de éxito del tratamiento incluso en el caso de que éste estuviera disponible. Por estas razones, en el cuarto estudio de esta tesis realizamos la evaluación de varios biomarcadores empleados rutinariamente en los protocolos diagnósticos de los casos de EET humanas, en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) obtenidas de ovejas en las fases preclínica y terminal de la enfermedad de scrapie; en la medida de lo posible, se trató de emplear los mismos animales del estudio nº 3. La razón para utilizar un modelo animal, en este caso, obedece al hecho de que la identificación de ovinos preclínicos es relativamente sencilla, debido a la patogenia propia de esta patología infecciosa. En el scrapie clásico, aun dependiendo en gran medida de la cepa infectante y el genotipo del gen *Prnp* del animal (Andreoletti *et al.*, 2000; Jeffrey *et al.*, 2002; van Keulen *et al.*, 1996), el agente infeccioso se acumula en el tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (GALT) antes de que se produzca la neuroinvasión (Madec *et al.*, 2000). Esto permite la detección de animales preclínicos mediante biopsia de tejido rectal (Dennis *et al.*, 2009; Gonzalez *et al.*, 2005), aunque ésta técnica no presenta una sensibilidad del 100% en ningún caso.

Entre los marcadores analizados en el LCR, las proteínas 14-3-3 y tau total, marcadores subrogados de daño neuronal (Otto *et al.*, 2002; Sanchez-Juan *et al.*, 2006; Schmitz *et al.*, 2016; Zerr *et al.*, 1998), se encontraron significativamente aumentados exclusivamente en individuos en la fase terminal de la patología. Sin embargo, los niveles de PrP total, que se analizan rutinariamente en humanos al saberse que se

hayan reducidos en casos de enfermedad priónica (Dorey *et al.*, 2015; Meyne *et al.*, 2009), se vieron también significativamente disminuidos en los ovinos preclínicos, indicando que podrían ser un buen biomarcador para casos tempranos de EET. Por último, la medida de la “seeding activity” mediante la técnica ultrasensible RT-QuIC (Atarashi *et al.*, 2011; Cramm *et al.*, 2016) permitió identificar el 78% de los casos de scrapie terminal, pero también el 62% de los preclínicos, lo que sugiere un cierto potencial para la detección de casos tempranos, aunque se hace precisa una puesta a punto de la técnica para aumentar su sensibilidad hasta niveles suficientes para su uso rutinario.

En su conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis refuerzan la noción de que los fenómenos de cepas y barrera de transmisión, entendidos como la manifestación de la natural adaptabilidad de los aislados priónicos mediante procesos de selección conformacional, son una pieza central para entender el complejo comportamiento biológico de estos agentes. Comprenderlos es ser capaces de prever las posibilidades de emergencia de nuevas variantes priónicas a partir de los agentes ya conocidos presentes en las poblaciones naturales. Sólo de esta manera seremos capaces de reaccionar con eficacia y contundencia para proteger la sanidad animal y la salud pública. Asimismo, ahondar en el conocimiento de los mecanismos implicados en la patogenia de las enfermedades priónicas, así como optimizar las técnicas diagnósticas disponibles actualmente y hallar otras nuevas, serán puntos clave para lograr algún día una aproximación terapéutica a estas devastadoras enfermedades.



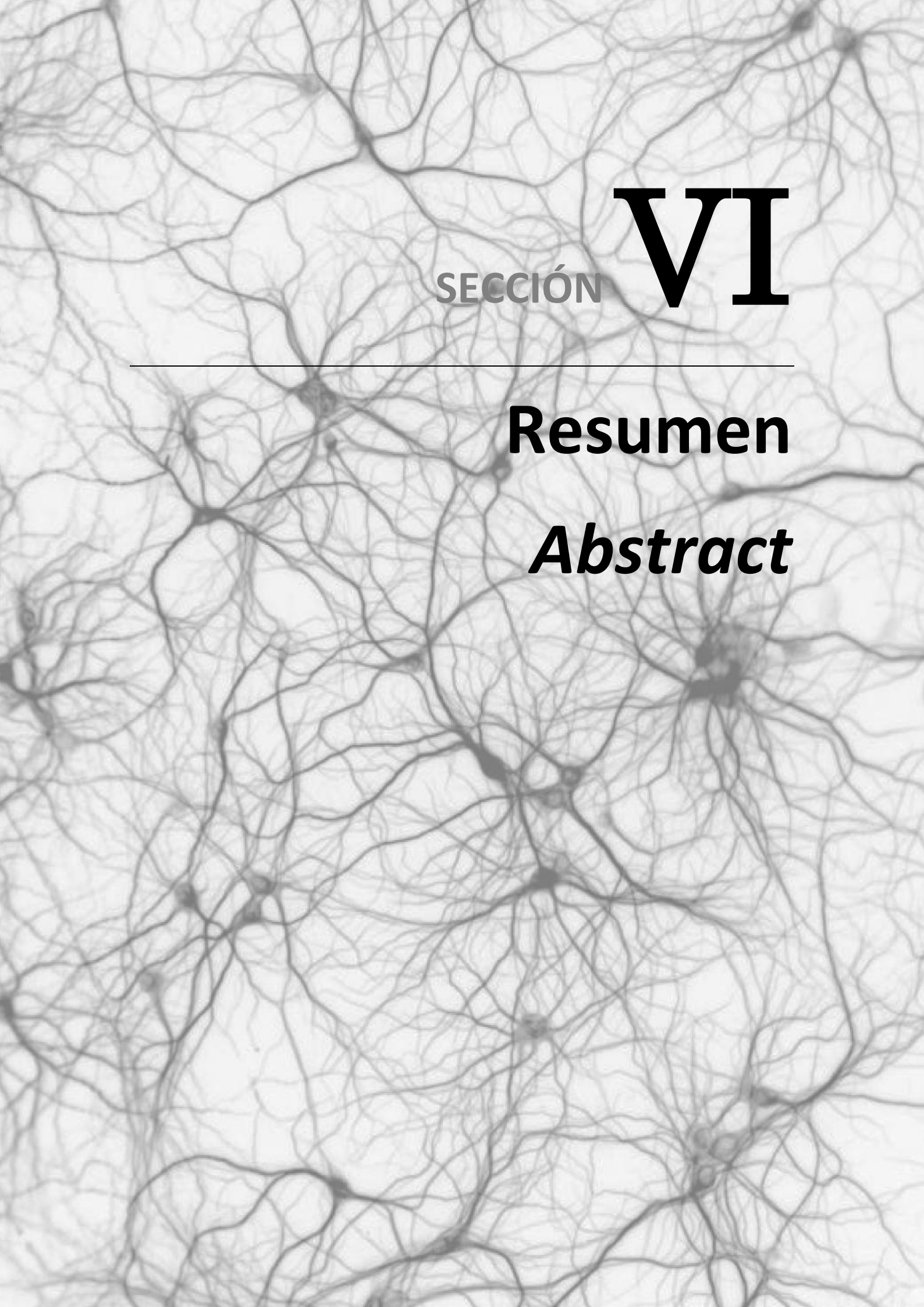
SECCIÓN **V**

Conclusiones

Conclusions

1. Los ovinos estudiados estaban infectados con mezclas de subcepas de scrapie, que fueron detectadas y selectivamente amplificadas mediante el uso de modelos murinos transgénicos que expresan PrP^C ovina con diferentes secuencias aminoacídicas y distintos niveles de expresión.
2. La subcepa identificada como “21k-Tg338” se detectó sólo en muestras ovinas de origen linfoide y poseía la capacidad de interferir con la propagación del componente mayoritario en ratones Tg338, alargando los tiempos de supervivencia de los animales y restringiendo el desarrollo de la lesión neuropatológica. Esta interferencia podría estar mediada por su mayor capacidad amiloidogénica.
3. La coinfección de los individuos de la especie ovina con más de una subcepa priónica, que podían estar presentes en distintos órganos o bien coexistir en el mismo tejido, fue más frecuente que la infección con una sola cepa pura.
4. El bloqueo de la glicosilación de la PrP^C humana mediante mutaciones puntuales de los residuos de asparagina 181 y 197 facilitó que se produjera la infección con cepas priónicas humanas de características atípicas, como la responsable del VPSP_r, tras su inoculación directa en modelos murinos.
5. El uso de PrP^C humana no glicosilada como sustrato en la reacción de PMCA permitió la propagación *bona fide* de la cepa humana responsable del GSS A117V, cuya inoculación subsiguiente en ratones que expresaban esta misma PrP^C no glicosilada (TgNN6h) provocó una enfermedad con características neuropatológicas atípicas similares a las de la patología original en humanos.
6. Algunos aislados priónicos procedentes de pacientes humanos con la mutación 6OPRI podrían haber contenido una mezcla de componentes clásicos y atípicos, que se propagaron respectivamente en modelos murinos transgénicos para la PrP^C humana glicosilada (Tg340) y no glicosilada (TgNN6h).
7. La presencia de astrocitos que expresan el receptor p75^{NTR} en el sistema nervioso se encontró incrementada en las fases preclínica y terminal del scrapie experimental en ratones Tg338, en correlación con la presencia de espongiosis, depósito de PrP^{Sc} y gliosis reactiva. Sin embargo, los niveles globales de p75^{NTR} en el encéfalo de estos ratones no se vieron afectados por la progresión de la enfermedad.
8. Se observó un aumento estadísticamente significativo de los niveles globales de p75^{NTR} en algunas áreas encefálicas en ovinos afectados por scrapie natural en estadio preclínico, mientras que este aumento no se apreció en estadios terminales.
9. La cuantificación de los niveles de proteína 14-3-3 y tau total, biomarcadores subrogados de daño neuronal, en líquido cefalorraquídeo puede utilizarse para el diagnóstico del scrapie ovino en estadio terminal.
10. Las medidas de la “seeding activity” por RT-QuIC y de los niveles totales de PrP en líquido cefalorraquídeo podrían ser herramientas útiles para la detección de casos preclínicos de enfermedad priónica en ovinos y, potencialmente, también en humanos.

1. The analyzed sheep were infected with mixtures of scrapie substrains, which were detected and selectively amplified by using transgenic murine models expressing ovine PrP^C with different amino acid sequences and distinct expression levels.
2. The substrain referred to as “21k-Tg338” was only detected in lymphoid ovine samples and was able to interfere with the propagation of the major component in Tg338 mice, protracting survival times in the animals and limiting the development of the neuropathological lesion. This interference might be mediated by an increased amyloidogenic capacity.
3. The coinfection of ovine individuals with more than one prion substrain, either present in distinct organs or coexisting in the same tissue, was more frequent than the infection with a single pure strain.
4. The abolishment of human PrP^C glycosylation through point mutations in asparagine residues 181 and 197 facilitated the infection with human prion strains with atypical features, such as the one responsible for VPSPr, following direct inoculation in murine models.
5. The use of non-glycosylated human PrP^C as the substrate for PMCA reaction allowed the *bona fide* propagation of the human strain responsible for GSS A117V, whose subsequent inoculation in mice expressing the same non-glycosylated PrP^C (TgNN6h) caused a disease with atypical neuropathological characteristics resembling those of the original disorder in humans.
6. A number of prion isolates sourced from human patients with the 6OPRI mutation may have contained a mixture of classical and atypical components, which were respectively propagated in transgenic murine models for human glycosylated (Tg340) and non-glycosylated PrP^C (TgNN6h).
7. The presence of p75^{NTR}-expressing astrocytes in the nervous tissue was found increased in preclinical and terminal stages of experimental scrapie in Tg338 mice, in correlation with the presence of spongiosis, PrP^{Sc} deposition and reactive gliosis. However, global p75^{NTR} levels in the brain of these mice were not affected by the progression of the disease.
8. A statistically significant increase of the global p75^{NTR} levels was observed in certain brain areas in naturally scrapie-affected sheep in the preclinical stage, whereas this increase was not noticed in the terminal stage.
9. The quantification of protein 14-3-3 and total tau levels, surrogate biomarkers of neuronal damage, in cerebrospinal fluid can be used for the diagnosis of ovine scrapie in terminal stages.
10. The measurements of the seeding activity by RT-QuIC and of total PrP levels in cerebrospinal fluid could be useful tools for the detection of preclinical cases of prion disease in sheep and, potentially, also in humans.



SECCIÓN **VI**

Resumen

Abstract

La existencia de cepas en las enfermedades priónicas ha sido objeto de controversia debido a la naturaleza del agente causal de estas patologías, que, según la hipótesis más ampliamente aceptada, carece de cualquier ácido nucleico cuyos polimorfismos pudieran explicar la variabilidad de los fenotipos observados. Las evidencias experimentales reunidas hasta la fecha, no obstante, indican que las cepas existen y que sus propiedades están codificadas en la conformación de las moléculas de PrP^{Sc}. Los modelos más actuales consideran que los aislados priónicos constituyen una “nube” de diversos componentes, “subcepas” o “cuasi-especies”, que coexisten en un equilibrio inestable y de los cuales uno predomina y determina el fenotipo. Asimismo, estos modelos interpretan las cepas y las barreras de transmisión como dos manifestaciones del mismo fenómeno fundamental: la naturaleza conformacional de los procesos de selección y propagación de los priones.

El fenómeno de cepas de priones y la capacidad natural de los estos agentes para adaptarse a nuevos hospedadores dificultan la monitorización y el control de la enfermedad de scrapie, lo que conlleva el riesgo de una aparición inadvertida de nuevas variantes con potencial zoonótico. Resulta por lo tanto crucial caracterizar la variabilidad de cepas presentes en los rebaños ovinos europeos, así como profundizar en la comprensión de los fenómenos de selección y adaptación de los priones.

Por ello, en el **estudio nº 1** se realiza un análisis exhaustivo de varios aislados de scrapie natural de la zona fronteriza transpirenaica mediante bioensayo en las líneas transgénicas ovinas TgShp XI y Tg338. A pesar de que el análisis bioquímico de los aislados originales ovinos mostró resultados bastante homogéneos (con la excepción del inóculo 8L, todos contenían PrP^{res} de 19 kDa), algunos de estos aislados produjeron acumulación de PrP^{res} de 21 kDa en el tejido nervioso de los ratones TgShp XI, aunque sus periodos de supervivencia y características neuropatológicas no fueron diferentes de las del resto de inóculos. Otro grupo de aislados provocó periodos de supervivencia muy largos con bajas tasas de ataque y acumulación de PrP^{res} de 21 kDa en ratones Tg338. Estos animales también presentaban una neuropatología menos severa, con una distribución de las lesiones espongiiformes más limitada y la presencia ocasional de placas de amiloide en el encéfalo.

Estos resultados sugieren que algunos de los aislados estudiados contienen mezclas de varios componentes, que pueden ser diferenciados y selectivamente amplificados empleando distintos modelos transgénicos. Se identificaron al menos tres subcepas diferentes: una isoforma mayoritaria de 19 kDa, presente en todos los aislados, y dos componentes de 21 kDa, uno que sólo se replica en ratones TgShp XI y otro que aparentemente es capaz de interferir con la propagación de la subcepa dominante en ratones Tg338, restringiendo las lesiones neuropatológicas y prolongando los periodos de supervivencia; es posible que esta interferencia esté mediada por su capacidad amiloidogénica.

En contra de la posibilidad de que las subcepas de 21 kDa surgieran *de novo* por mutación del componente mayoritario de 19 kDa, el hecho de que sólo una proporción de los inóculos provocara este fenotipo hace suponer que dichas subcepas estaban presentes en los inóculos originales en una baja concentración. Sin embargo, la razón por la que cada línea transgénica fue capaz de propagar sólo uno de estos componentes minoritarios se desconoce. Factores como la secuencia de la PrP^C ovina que expresan, e incluso los niveles de expresión de PrP^C, son capaces de alterar la susceptibilidad selectiva a distintas cepas.

En cualquier caso, los resultados de este trabajo sugieren que la coinfección de los animales con más de una cepa de scrapie es más frecuente que la infección con una sola cepa, y que distintos tejidos y órganos pueden acumular cepas diferentes.

Las barreras de transmisión están fundamentalmente moduladas por el grado de correspondencia entre las secuencias primarias de la PrP^{Sc} entrante y la PrP^C del hospedador. Sin embargo, existen otros factores que influyen, como el grado de glicosilación de la PrP^C, que se sabe que es capaz de modificar la susceptibilidad de los ratones a la infección con diversas cepas priónicas, así como la eficiencia de propagación *in vitro*. El empleo de sustratos de PrP^C no glicosilada en PMCA ha permitido la amplificación de algunas cepas de priones difíciles de transmitir a modelos murinos. En el **estudio nº 2** se explora el efecto que tiene la eliminación de los glicanos sobre la capacidad de propagación *in vitro* y de transmisión *in vivo* de los priones responsables de varios tipos de enfermedades priónicas humanas con características atípicas. Para ello se empleó la línea transgénica TgNN6h, que expresa una PrP^C humana con mutaciones en los residuos de asparagina 181 y 197, lo que impide su glicosilación. Este tipo de sustrato permitió la amplificación por PMCA de varias cepas priónicas clásicas y atípicas, entre ellas la cepa GSS A117V. La inoculación de esta cepa, previamente adaptada *in vitro*, en ratones TgNN6h causó el desarrollo de una enfermedad con características neuropatológicas que se correspondían con las de los pacientes humanos, lo que demuestra el mantenimiento de las propiedades de cepa. Por otra parte, el aislado de GSS 6OPRI parecía contener una mezcla de subcepas clásica y atípica, que se manifestaban respectivamente al realizar el bioensayo en un modelo normalmente glicosilada (Tg340) o en el modelo TgNN6h. Finalmente, la inoculación de cualquiera de las cepas atípicas, previamente adaptadas al sustrato no glicosilado por PMCA, no causaba enfermedad en ratones Tg340. En conjunto, estos resultados sugieren que la eliminación de los glicanos facilita la amplificación selectiva de priones con características atípicas, mientras que la presencia de los mismos impide su propagación.

En la patogenia de enfermedades priónicas juega un papel clave la muerte neuronal. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a este proceso se desconocen. Varios estudios han sugerido la implicación de un grupo de factores de crecimiento

específicos del sistema nervioso denominados neurotrofinas. De entre los receptores a través de los cuales actúan, p75^{NTR} es el más interesante, ya que se ha visto que es capaz de mediar respuestas tanto de supervivencia como de muerte celular en función de varios factores. En el **estudio nº 3** se analiza la distribución de esta proteína y su correlación con otros marcadores neuropatológicos de enfermedad priónica en el encéfalo de animales natural y experimentalmente infectados. En ratones Tg338, p75^{NTR} mostró un marcaje glial astrocítico, que era más abundante en individuos infectados en estadio terminal y que se correlacionaba con la espongiosis, el depósito de PrP^{Sc} y la gliosis, sugiriendo una implicación de los astrocitos en la patogenia de la neurodegeneración. Por otra parte, los ovinos infectados en estadio preclínico mostraban mayores niveles de inmunomarcaje que los individuos terminales y que los controles, lo que sugiere una sobreexpresión de p75^{NTR} en los estadios tempranos del proceso neurodegenerativo en ovinos, que posteriormente se vería contrarrestada por la pérdida neuronal.

Las técnicas diagnósticas de enfermedad priónica actuales poseen una efectividad limitada. El único biomarcador patognomónico de la enfermedad es la presencia de PrP^{Sc} en el sistema nervioso, lo que sólo puede demostrarse *post-mortem*. En consecuencia, se hace precisa la identificación de nuevos biomarcadores, que sean mensurables en tejidos y fluidos fácilmente obtenibles, como la sangre o el líquido cefalorraquídeo (LCR), y que permitan el diagnóstico de los individuos en el estadio preclínico de la enfermedad. Sin embargo, las muestras de pacientes humanos con estas características son escasas y difíciles de conseguir, por lo que es necesario el empleo de modelos alternativos válidos dónde buscar nuevos biomarcadores y testar los ya existentes. En el scrapie clásico, la identificación de animales preclínicos puede realizarse fácilmente mediante la detección inmunohistoquímica de PrP^{Sc} en muestras obtenidas por biopsia rectal, aunque la sensibilidad de esta técnica no es la deseable, ya que existen genotipos de *Prnp* ovino en los que la PrP^{Sc} no se disemina por tejido linfoide asociado a mucosa rectal. En el **estudio nº 4**, se emplearon muestras de LCR de ovinos infectados en estadios terminal y preclínico para validar varios biomarcadores empleados en el diagnóstico rutinario de EET humanas. Los marcadores subrogados de daño neuronal proteína 14-3-3 y tau total se encontraron aumentados exclusivamente en LCR de individuos terminales. Sin embargo, los niveles de PrP total en LCR se encontraron disminuidos también en estadio preclínico. Por su parte, la medida de la "seeding activity" por RT-QuIC en LCR demostró una sensibilidad del 78% en casos terminales y del 62% en preclínicos, mientras que la especificidad fue del 100%. Estos resultados son coherentes con lo visto en pacientes humanos y demuestran la eficacia de estas técnicas para detectar animales positivos de la especie ovina.

The existence of strains in prion diseases has been subjected to controversy given the nature of their causal agent, which, according to the most widely accepted hypothesis, lacks any nucleic acid whose polymorphisms could explain the variability in the observed phenotypes. Experimental evidence gathered so far, however, indicates that strains exist and that their properties are encoded in the conformation of PrP^{Sc} molecules. Current models consider that prion isolates consist of a “cloud” of several components, “substrains” or “quasi-species”, which coexist in an unstable equilibrium and among which there is one that predominates and determines the phenotype. Moreover, these models interpret strains and transmission barriers as two manifestations of the same fundamental phenomenon: the conformational nature of prion selection and propagation processes.

The prion strain phenomenon and the natural adaptability of these agents complicate the monitoring and control of scrapie, which entails the risk of an unnoticed emergence of new variants with zoonotic potential. It is thus crucial to characterize the strain variability within European sheep flocks, as well as to delve into the understanding of prion selection and adaptation phenomena.

Hence, in **study number 1** we accomplished a thorough analysis of several natural scrapie isolates from the Pyrenean transboundary region by means of bioassay in the ovine transgenic lines TgShp XI and Tg338. Although biochemical analyses of original isolates revealed quite homogeneous results (except inoculum 8L, all of them contained 19-kDa PrP^{res}), a number of these isolates produced 21-kDa PrP^{res} accumulation in nervous tissue of TgShp XI mice, even though survival periods and neuropathological features were not different from those of other inocula. Another group of isolates caused very long survival periods with low attack rates and 21-kDa PrP^{res} accumulation in Tg338 mice. These animals also showed a less severe neuropathology, with a limited distribution of spongiform lesions and occasional presence of amyloid plaques in the brain.

These results suggest that some of the studied isolates contained a mixture of various components that could be differentiated and selectively amplified using distinct transgenic models. At least three different substrains were identified: a major 19-kDa isoform, present in all isolates, and two 21-kDa components, one that replicates only in TgShp XI mice and one that is apparently able to interfere with the propagation of the dominant substrain in Tg338 mice, restricting neuropathological lesions and protracting survival periods; it is possible that this interference be mediated by its amyloidogenic capacity.

In opposition to the possibility that 21-kDa substrains emerged *de novo* through a mutation of the major 19-kDa components, the fact that only a proportion of inocula caused this phenotype suggests that these substrains preexisted in the original inocula at low concentrations. However, the reason why each transgenic line was able to

propagate only one of these minor components is unknown. Factors such as the sequence of the ovine PrP^C being expressed, and even PrP^C expression levels, are able to alter the selective susceptibility to distinct strains.

Nevertheless, the results of this work suggest that coinfection of animals with more than one strain is more frequent than the infection with a single strain, and that different tissues and organs can accumulate distinct strains.

Transmission barriers are fundamentally modulated by the degree of correspondence between primary sequences of incoming PrP^{Sc} and host PrP^C. However, other factors have an influence on this, such as the degree of PrP^C glycosylation, which is known to modify mouse susceptibility to infection with several prion strains, as well as *in vitro* propagation efficiency. The use of non-glycosylated PrP^C substrates on PMCA has allowed the amplification of some prion strains hardly transmissible to murine models. In **study number 2**, we explore the effect of glycan removal on the *in vitro* propagation capacity and the *in vivo* transmissibility of prions responsible for various types of human prion disease with atypical features. For that, the transgenic line TgNN6h line, which expresses a human PrP^C with mutations at asparagine residues 181 and 197 that impede glycosylation, was used. This substrate allowed PMCA amplification of several classical and atypical human strains, including GSS A117V. The inoculation of this strain, previously adapted *in vitro*, to TgNN6h mice caused the development of a disease with neuropathological hallmarks corresponding to those of human patients, which demonstrates the maintenance of strain properties. On the other hand, the GSS 6OPRI isolate seemed to contain a mixture of classical and atypical substrains, which manifested respectively upon bioassay in a normally glycosylated model (Tg340) and the TgNN6h model. Finally, the inoculation of any of the atypical strains previously adapted to non-glycosylated substrate on PMCA caused no disease in Tg340 mice. Altogether, these results suggest that the removal of glycans facilitates the selective amplification of prions with atypical characteristics, while their presence impedes this propagation.

In prion disease pathogenesis, neuronal death plays a key role. However, the mechanisms underlying this process are unknown. Several studies suggest the involvement of a group of growth factors specific to the nervous system termed neurotrophins. Among the receptors through which they act, p75^{NTR} is the most interesting one, since it has been found to trigger both survival and cell death responses, depending on various factors. In **study number 3**, we analyze the distribution of this protein and its correlation with other neuropathological markers of prion disease in the brain of naturally and experimentally infected animals. In Tg338 mice, p75^{NTR} showed an astrocytic glial labeling that was more abundant in terminal-stage infected individuals and correlated with spongiosis, PrP^{Sc} deposition and gliosis, suggesting astrocytes involvement in the pathogenesis of neurodegeneration. On the

other hand, infected sheep at the preclinical stage showed higher immunostaining levels than terminal and control individuals, suggesting an overexpression of p75^{NTR} in early stages of the neurodegenerative process in sheep, which would be later counteracted by neuron loss.

Current diagnostic techniques for prion disease have a limited effectivity. The only pathognomonic biomarker for prion disease is the presence of PrP^{Sc} in nervous system, which can only be proved *post-mortem*. Consequently, the identification of new biomarkers, measurable in easily obtainable tissues and fluids, such as blood or cerebrospinal fluid (CSF), and allowing the diagnosis of preclinical-stage individuals, is mandatory. However, samples from human patients with these characteristics are scarce and hard to obtain, and thus the use of alternative valid models is needed to search for new markers and test the ones already available. In classical scrapie, the identification of preclinical animals can be easily performed through immunohistochemical detection of PrP^{Sc} in samples from rectal biopsy, although the sensitivity of this technique is not ideal, since there are ovine *Prnp* genotypes in which PrP^{Sc} do not spread to rectal mucosa-associated lymphoid tissue. In **study number 4**, we used CSF samples from infected sheep at the terminal and preclinical stages to validate several biomarkers used for the routine diagnosis of human TSEs. Neuron death surrogate markers protein 14-3-3 and total tau were increased exclusively in CSF from terminal individuals. However, CSF total PrP levels were found reduced also at the preclinical stage. The measurement of the seeding activity by RT-QuIC in CSF disclosed 78% sensitivity for terminal cases and 62% for preclinical cases, while showing 100% specificity. These results are in agreement with those of human patients and prove the effectiveness of these techniques to detect positive individuals of the ovine species.



SECCIÓN **VII**

Anexos

Anexo 1. Preparación de inóculos para bioensayo

1. Homogenizar los tejido (médula oblongada de oveja, linfonodo mesentérico de oveja o médula espinal de ratón) en suero salino fisiológico al 10% (0,1 g por cada ml de suero), empleando tubos de 1,5 ml con microcuentas de cerámicas y el homogenizados de tejidos TeSeE PRECESS 48 (Bio-Rad).
2. Filtrar el homogenizado a través de una gasa estéril empleando una jeringuilla.
3. Añadir 1 μ l del antibiótico ESPES Inyect (CASIER) por cada 2 ml de inóculo. Agitar para mezclar bien.
4. Realizar un cultivo de los inóculos en placas de agar sangre para asegurar su esterilidad. Incubar las placas a 37°C durante una noche.
5. Alicuotar inóculos y conservar congelados a -80°C.

Anexo 2. Protocolo de Western blot de muestras ovinas y murinas

Preparación de los homogenizados

1. Preparar homogenizados al 10% en tubos de 1,5 ml con microcuentas de cerámica (Bio-Rad) empleando el homogenizados de tejidos TeSeE PRECESS 48 (Bio-Rad).

Digestión y extracción de proteínas (adaptado del protocolo del kit TeSeE Western Blot (Bio-Rad))

2. Transferir 200 μ l de los homogenizado a eppendorfs de 1ml.
3. Preparar solución de digestión: 1 ml solución A + 20 μ l de PK (kit).
4. Añadir 200 μ l de solución de digestión. Homogenizar con vórtex.
5. Incubar a 37°C durante 10 m.
6. Añadir 200 μ l de solución B (kit). Homogenizar por inversión 6-10 veces.
7. Centrifugar a 15000 x g durante 7 m a 4°C. Descartar sobrenadante.
8. Dejar secar el pellet durante 5 m.
9. Añadir 20-25 μ l de buffer de carga Laemmli. Incubar 5 m.
10. Resuspender pellet en Laemli.
11. Incubar a 100°C durante 4 m. Homogenizar con vórtex.
12. Centrifugar a 15000 x g durante 15 m a 4°C. Recuperar sobrenadante y descartar pellet.
13. Incubar a 100°C durante 4 m.

Electroforesis (SDS-PAGE)

14. Preparar tampón de migración (50 ml tampón MES + 950 ml H₂O destilada).
15. Cargar 20-25 μ l de muestra en los pocillos del gel (Criterion XT 12% Bis-Tris Precast Gel).

16. Realizar la electroforesis a 80 V durante 30 m, y luego a 150 V durante 90 m.

Transferencia

17. Preparar tampón de transferencia (1875 ml H₂O destilada + 250 ml Tris CAPS 10 X + 375 ml etanol puro).

18. Preparar membrana.

- 0,2 um de porosidad
- Tamaño según número de geles que pongas por membrana y según número de pocillos usados (para un solo gel con todos los pocillos usados: aprox. 14x7 cm).

a. Equilibrar membrana (Immuno-Blot PVDF Membrane): 15 s en etanol puro, 5 m en H₂O destilada y 5 m en tampón de transferencia.

19. Sacar gel con cuidado y dejarlo en tampón de transferencia durante 5 m.

20. Preparar "sándwich" y colocarlo en la cubeta de transferencia. Colocar y activar sistema de control de temperatura y ajustar a 10°C.

21. Realizar la transferencia a 115 V durante 1 h 15 m.

Fijación de proteínas

22. Recuperar membrana y ponerla en agitación suave en PBS durante 5-10 s, luego en etanol puro durante 5-10 s. Pasar a H₂O destilada durante 5 m.

Immunodetección

23. Bloquear la membrana: incubar durante 30 m en una solución de seroalbúmina bovina (BSA) al 2% en PBS + Tween 1% (PBST).

24. Lavar con PBST.

25. Incubar membrana con el anticuerpo primario correspondiente diluido a la concentración adecuada (Sha31 1:8000, 3F4 1:10000) en PBST, durante 1 h.

26. Lavar con PBST (2 veces).

27. Incubar membrana con el anticuerpo secundario conjugado a HRP correspondiente diluido a la concentración adecuada en PBST, durante 1 h.

28. Lavar con PBST (3 veces).

Revelado

29. Incubar membrana con la solución de revelado SuperSignal West Pico (Thermofisher), durante ± 2 m.

30. Realizar el revelado con el analizador de imagen BioSpectrum.

Anexo 3. Protocolo de tinción hematoxilina-eosina

1. Realizar corte de 4 μm de grosor con el micrótopo y recuperarlas en portaobjetos.
2. Sacar durante al menos 24 horas en la estufa a 37°C.
3. Desparafinado y rehidratado:
 - Xilol: 4 m
 - Xilol: 4 m
 - Alcohol 100°: 4 m
 - Alcohol 100°: 4 m
 - Alcohol 96°: 1 m
 - Alcohol 70°: 1 m
 - Agua corriente: 1 m
4. Incubar en hematoxilina durante 5 m.
5. Agua corriente: 1 m
6. Incubar en alcohol ácido (ácido acético al 1% en alcohol 70°) durante 2 m.
7. Incubar en eosina durante 2 m.
8. Deshidratación y montaje:
 - Alcohol 100°: 1 m
 - Alcohol 100°: 1 m
 - Xilol: 1 m
 - Xilol: mínimo 5 m
 - Montaje en dibutylphtalate poliestireno xileno (DPX).

Anexo 4: Protocolo de tinción Rojo Congo*Elaboración de las soluciones de trabajo*

- a) Solución Madre I (de preincubación): 100 ml de alcohol 80° + 3 g de NaCl, y dejar reposar 24 h.
- b) Solución de trabajo de preincubación: 100 ml de solución Madre I + 1 ml de una solución al 1% de NaOH.
- c) Solución Madre II (de tinción): 100 ml de alcohol 80° + 3 g de NaCl + 0.5 g de Rojo Congo, y dejar reposar 24.
- d) Solución de trabajo de tinción: 100 ml de solución Madre II + 1 ml de una solución al 1% de NaOH.

Tinción

1. Realizar corte de 4 μm de grosor con el micrótopo y recuperarlas en portaobjetos.
2. Sacar durante al menos 24 horas en la estufa a 37°C.

3. Desparafinado y rehidratado:
 - Xilol: 4 m
 - Xilol: 4 m
 - Alcohol 100º: 4 m
 - Alcohol 100º: 4 m
 - Alcohol 96º: 1 m
 - Alcohol 70º: 1 m
 - Agua corriente: 1 m
4. Incubar en hematoxilina durante 20 m.
5. Agua corriente: 10 m
6. Incubar en la solución de trabajo de preincubación durante 20 m.
7. Incubar en la solución de trabajo de tinción durante 20 m.
9. Deshidratación y montaje:
 - Alcohol 100º: 1 m
 - Alcohol 100º: 1 m
 - Xilol: 1 m
 - Xilol: mínimo 5 m
 - Montaje en dibutylphtalate poliestireno xileno (DPX).

Anexo 5: Protocolo de paraffin-embedded tissue blot (PET-blot).

1. Realizar corte de 4 μm de grosor con el micrótopo y recuperarlas en membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm de tamaño de poro.
2. Sacar durante al menos 24 horas en la estufa a 56ºC.
3. Desparafinado y rehidratado de las membranas:
 - 2 x 5 m en Tolueno
 - 2 x 5 m en isopropanol (2-Propanol)
 - 2 x 5 m en Alcohol 96º
 - 2 x 5 m en Alcohol 80º (preparar a partir de Alcohol 99º o 96º)
 - 1 x 5 m en agua corriente
 - 1 x 5 m en Wash buffer
 - 1 x 10 m en TBST
4. Digestión: incubar membranas con 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteinasa K diluida en TBS + Brij 35P al 0,1% durante 2 h al baño María (55-56ºC).
5. Lavar con TBST.
6. Desnaturalización de proteínas: incubar membranas con tiocianato de guanidinio 3M en TBS durante 10 m.
7. Lavar con TBST + 1% leche (3 veces).
8. Saturación de membranas: incubar membranas con TBST + BSA al 0,2% durante 30 m.

9. Incubar membranas con el anticuerpo primario Sha31 (1:8000 en tampón de saturación) durante 1 h.
10. Lavar con TBST + 1% leche (3 veces).
11. Incubar con el anticuerpo secundario Polyclonal Goat anti-Mouse Inmunoglobulin/AP (1:500 en tampón de saturación) durante 1 h.
12. Lavar con TBST + 1% leche (5 veces).
13. Revelado: incubar las membranas con NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium chloride / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) durante 45 m.
14. Parar la reacción con agua corriente y dejar secar las membranas a Tª ambiente protegidas de la oscuridad.

Anexo 6: Protocolo de la técnica inmunohistoquímica para la detección de PrP^{Sc} en tejidos ovinos y murinos

1. Realizar corte de 4 µm de grosor con el micrótopo y recuperarlas en portaobjetos.
2. Sacar durante al menos 24 horas en la estufa a 37°C.

Desparafinado y rehidratado

- Xilol: 5 m
- Xilol: 5 m
- Alcohol 100º: 5 m
- Alcohol 100º: 5 m
- Alcohol 96º: 3 m
- Alcohol 70º: 3 m
- Pasar las secciones a H₂O destilada

Desenmascaramiento de epítomos

3. Sumergir las secciones en ácido fórmico (98%) durante 15 m.
4. Lavar con agua del grifo durante 10 m y pasar a H₂O destilada.
5. Incubar las secciones en una solución de proteinasa K a 4 µg/ml (en buffer PK) durante 15 m a 37°C.
6. Incubar las secciones en buffer citrato pH 6, durante 20 m a 96°C, usando el equipo PTLINK.
7. Pasar las preparaciones a Wash Buffer.

Inmunodetección

8. Bloqueo de la peroxidasa endógena: cubrir la muestra con Peroxidase blocking solution (Dako Agilent) durante 5 m.
9. Lavar con Wash buffer.
10. Incubar con anticuerpo primario diluido a la concentración adecuada (L42 1:500, SAF84 1:10000, 3F4: 1:10000) durante 30 m.

11. Lavar con Wash buffer
12. Incubar con el polímero conjugado con HRP EnVision+ anti-Mouse (Dako Agilent) durante 30 m.
13. Lavar con Wash buffer.

Revelado

14. Cubrir la muestra con la solución de DAB+ (3,3'-diaminobenzidina) durante 5 m
15. Lavar con agua destilada

Contratinción con hematoxina

16. Incubar en hematoxilina durante 5 m
17. Lavar con agua destilada

Deshidratación y montaje

- Alcohol 70º: inmersión (x 3)
- Alcohol 96º: inmersión (x 3)
- Alcohol 100º: inmersión (x 3)
- Alcohol 100º: inmersión (x 3)
- Xilol: inmersión (x 3)
- Xilol: 5 m
- Montaje en dibutylphtalate poliestireno xileno (DPX)

Anexo 7: Protocolo de la técnica inmunohistoquímica para la detección de GFAP en tejidos ovinos y murinos

18. Realizar corte de 4 µm de grosor con el micrótopo y recuperarlas en portaobjetos.
19. Sacar durante al menos 24 horas en la estufa a 37ºC.

Desparafinado y rehidratado

- Xilol: 5 m
- Xilol: 5 m
- Alcohol 100º: 5 m
- Alcohol 100º: 5 m
- Alcohol 96º: 3 m
- Alcohol 70º: 3 m
- Pasar las secciones a H₂O destilada

Inmunodetección

20. Bloqueo de la peroxidasa endógena: cubrir la muestra con Peroxidase blocking solution (Dako Agilent) durante 5 m.
21. Lavar con Wash buffer.
22. Incubar con anticuerpo primario anti-GFAP diluido 1:500 durante 30 m.

23. Lavar con Wash buffer
24. Incubar con el polímero conjugado con HRP EnVision+ anti-rabbit (Dako Agilent) durante 30 m.
25. Lavar con Wash buffer.

Revelado

26. Cubrir la muestra con la solución de DAB+ (3,3'-diaminobenzidina) durante 5 m
27. Lavar con agua destilada

Contratinción con hematoxina

28. Incubar en hematoxilina durante 5 m
29. Lavar con agua destilada

Deshidratación y montaje

- Alcohol 70º: inmersión (x 3)
- Alcohol 96º: inmersión (x 3)
- Alcohol 100º: inmersión (x 3)
- Alcohol 100º: inmersión (x 3)
- Xilol: inmersión (x 3)
- Xilol: 5 m
- Montaje en dibutylphtalate poliestireno xileno (DPX)

Anexo 8: Protocolo de la técnica inmunohistoquímica para la detección del receptor p75^{NTR} en tejido nervioso ovino y murino

1. Realizar corte de 4 µm de grosor con el micrótopo y recuperarlas en portaobjetos.
2. Sacar durante al menos 24 horas en la estufa a 37ºC.
3. Desparafinado y rehidratado
 - Xilol: 5 m
 - Xilol: 5 m
 - Alcohol 100º: 5 m
 - Alcohol 100º: 5 m
 - Alcohol 96º: 3 m
 - Alcohol 70º: 3 m
 - Pasar las secciones a H₂O destilada
2. Desenmascaramiento de epítomos por calor: incubar en PTLINK a 96ºC durante 20 m en buffer citrato + enfriamiento durante 30 m mínimo en Wash buffer.
3. Montaje vertical y lavado con Wash buffer (3 veces).
4. Bloquear la peroxidasa endógena con Peroxidase Blocking Solution durante 5 m.
5. Lavar con Wash buffer (3 veces).

6. Bloqueo de las uniones inespecíficas: incubación con suero normal de cabra (SNC) al 30% en PBS durante 1 h.
7. Incubar con el anticuerpo primario anti-p75^{NTR} diluido (para oveja 1:200, para ratón 1:500) en SNC al 10%, toda la noche a 4°C.
8. Lavar con Wash buffer (3 veces).
9. Incubar con el polímero conjugado con HRP EnVision+ anti-Rabbit durante 30 m.
10. Lavar con Wash buffer (3 veces).
11. Desmontar y pasar a cubeta con WB.
12. Revelado: incubar con DAB+ durante 5 m máximo .
13. Parar revelado con agua destilada y pasar a cubeta con agua de grifo + 10 min agua corriente.
14. Contraintinción con hematoxilina durante 5 m.
15. Deshidratación y montaje
 - Alcohol 70º: inmersión (x 3)
 - Alcohol 96º: inmersión (x 3)
 - Alcohol 100º: inmersión (x 3)
 - Alcohol 100º: inmersión (x 3)
 - Xilol: inmersión (x 3)
 - Xilol: 5 m
 - Montaje en dibutylphtalate poliestireno xileno (DPX)

Anexo 9: Protocolo de microscopia confocal

1. Realizar corte de 4 µm de grosor con el micrótopo y recuperarlas en portaobjetos.
2. Sacar durante al menos 24 horas en la estufa a 37°C.
3. Desparafinado y rehidratado
 - Xilol: 7 m (3 veces)
 - Alcohol 100º: 5 m (3 veces)
 - Alcohol 96º: 5 m (3 veces)
 - Alcohol 70º: 5 m
 - Alcohol 50º: 5 m
 - Pasar las secciones a H₂O destilada
4. Hervir las preparaciones en tampón citrato durante 20 minutos
5. Sumergir las preparaciones en una solución de etanol al 70%.
6. Bloqueo de la fluorescencia de fondo debida a la parafina: sumergir las preparaciones en la solución Sudán black B (SBB) durante 10 minutos en oscuridad.
7. Lavar las preparaciones con etanol al 70% y dejar reposar en H₂O destilada.

8. Lavar con PBS (3 veces).
9. Montaje vertical.
10. Bloqueo enzimático: incubar las preparaciones con fetal bovine serum (FBS) al 10% en PBSE durante 1 h.
11. Incubar las preparaciones con una mezcla de los dos anticuerpos primarios (p75^{NTR} (anti-rabbit) y anti-PrP L42 ó anti-GFAP (mouse)) diluidos en PBS, toda la noche a 4°C.
12. Lavar con PBS (3 veces)
13. Incubar con una mezcla de los anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos Alexa Fluor 488 (donkey anti-rabbit) y Alexa Fluor 594 (goat anti-mouse), diluidos 1:400 en PBS, durante 1 h.
14. Lavar con PBS (3 veces)
15. Montar en Fluoromount Aquous y dejar secar 4 h mínimo.



SECCIÓN **VIII**

**Referencias
bibliográficas**

Acin, C., Martin-Burriel, I., Goldmann, W., Lyahyai, J., Monzon, M., Bolea, R., Smith, A., Rodellar, C., Badiola, J. J., and Zaragoza, P. (2004). Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected spanish sheep. *The Journal of General Virology*, 85(Pt 7), 2103-2110. doi:10.1099/vir.0.80047-0 [doi]

Acin, C., Martin-Burriel, I., Monleon, E., Lyahyai, J., Pitarch, J. L., Serrano, C., Monzon, M., Zaragoza, P., and Badiola, J. J. (2013). Prion protein gene variability in spanish goats. inference through susceptibility to classical scrapie strains and pathogenic distribution of peripheral PrP(sc.). *PloS One*, 8(4), e61118. doi:10.1371/journal.pone.0061118 [doi]

Acin, C., Martin-Burriel, I., Monleon, E., Rodellar, C., Badiola, J. J., and Zaragoza, P. (2004). PrP polymorphisms in spanish sheep affected with natural scrapie. *The Veterinary Record*, 155(12), 370-372. doi:10.1136/vr.155.12.370 [doi]

Acutis, P. L., Sbaiz, L., Verburg, F., Riina, M. V., Ru, G., Moda, G., Caramelli, M., and Bossers, A. (2004). Low frequency of the scrapie resistance-associated allele and presence of lysine-171 allele of the prion protein gene in italian biellese ovine breed. *The Journal of General Virology*, 85(Pt 10), 3165-3172. doi:10.1099/vir.0.80053-0 [doi]

Adle-Biassette, H., Verney, C., Peoc'h, K., Dauge, M. C., Razavi, F., Choudat, L., Gressens, P., Budka, H., and Henin, D. (2006). Immunohistochemical expression of prion protein (PrP^C) in the human forebrain during development. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65(7), 698-706. doi:10.1097/01.jnen.0000228137.10531.72 [doi]

Aguzzi, A., and Calella, A. M. (2009). Prions: Protein aggregation and infectious diseases. *Physiological Reviews*, 89(4), 1105-1152. doi:10.1152/physrev.00006.2009 [doi]

Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A., and Clarke, M. C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, 214(5090), 764-766. doi:10.1038/214764a0 [doi]

Alper, T., Haig, D. A., and Clarke, M. C. (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 22(3), 278-284. doi:0006-291X(66)90478-5 [pii]

Andreoletti, O., Berthon, P., Marc, D., Sarradin, P., Grosclaude, J., van Keulen, L., Schelcher, F., Elsen, J. M., and Lantier, F. (2000). Early accumulation of PrP(sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a romanov flock with natural scrapie. *The Journal of General Virology*, 81(Pt 12), 3115-3126. doi:10.1099/0022-1317-81-12-3115 [doi]

Andreoletti, O., Lacroux, C., Chabert, A., Monnereau, L., Tabouret, G., Lantier, F., Berthon, P., Eychenne, F., Lafond-Benestad, S., Elsen, J. M., and Schelcher, F. (2002). PrP(sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: Influence of

foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *The Journal of General Virology*, 83(Pt 10), 2607-2616. doi:10.1099/0022-1317-83-10-2607 [doi]

Andreoletti, O., Simon, S., Lacroux, C., Morel, N., Tabouret, G., Chabert, A., Lugan, S., Corbiere, F., Ferre, P., Foucras, G., Laude, H., Eychenne, F., Grassi, J., and Schelcher, F. (2004). PrPSc accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nature Medicine*, 10(6), 591-593. doi:10.1038/nm1055 [doi]

Asante, E. A., Linehan, J. M., Desbruslais, M., Joiner, S., Gowland, I., Wood, A. L., Welch, J., Hill, A. F., Lloyd, S. E., Wadsworth, J. D., and Collinge, J. (2002). BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *The EMBO Journal*, 21(23), 6358-6366.

Asante, E. A., Linehan, J. M., Smidak, M., Tomlinson, A., Grimshaw, A., Jeelani, A., Jakubcova, T., Hamdan, S., Powell, C., Brandner, S., Wadsworth, J. D., and Collinge, J. (2013). Inherited prion disease A117V is not simply a proteinopathy but produces prions transmissible to transgenic mice expressing homologous prion protein. *PLoS Pathogens*, 9(9), e1003643. doi:10.1371/journal.ppat.1003643 [doi]

Asher, D. M., and Gregori, L. (2018). Human transmissible spongiform encephalopathies: Historic view. *Handbook of Clinical Neurology*, 153, 1-17. doi:B978-0-444-63945-5.00001-5 [pii]

Atarashi, R., Satoh, K., Sano, K., Fuse, T., Yamaguchi, N., Ishibashi, D., Matsubara, T., Nakagaki, T., Yamanaka, H., Shirabe, S., Yamada, M., Mizusawa, H., Kitamoto, T., Klug, G., McGlade, A., Collins, S. J., and Nishida, N. (2011). Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nature Medicine*, 17(2), 175-178. doi:10.1038/nm.2294 [doi]

Atarashi, R., Wilham, J. M., Christensen, L., Hughson, A. G., Moore, R. A., Johnson, L. M., Onwubiko, H. A., Priola, S. A., and Caughey, B. (2008). Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nature Methods*, 5(3), 211-212. doi:10.1038/nmeth0308-211 [doi]

Babelhadj, B., Di Bari, M. A., Pirisinu, L., Chiappini, B., Gaouar, S. B. S., Riccardi, G., Marcon, S., Agrimi, U., Nonno, R., and Vaccari, G. (2018). Prion disease in dromedary camels, algeria. *Emerging Infectious Diseases*, 24(6), 1029-1036. doi:10.3201/eid2406.172007 [doi]

Bai, Y., Li, Q., Yang, J., Zhou, X., Yin, X., and Zhao, D. (2008). p75(NTR) activation of NF-kappa B is involved in PrP106-126-induced apoptosis in mouse neuroblastoma cells. *Neuroscience Research*, 62(1), 9-14. doi:10.1016/j.neures.2008.05.004

Baker, H. F., Duchon, L. W., Jacobs, J. M., and Ridley, R. M. (1990). Spongiform encephalopathy transmitted experimentally from creutzfeldt-jakob and familial gerstmann-straussler-scheinker diseases. *Brain*, 113 (Pt 6)(Pt 6), 1891-1909. doi:10.1093/brain/113.6.1891 [doi]

- Bamji, S. X., Majdan, M., Pozniak, C. D., Belliveau, D. J., Aloyz, R., Kohn, J., Causing, C. G., and Miller, F. D. (1998). The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *The Journal of Cell Biology*, *140*(4), 911-923. doi:10.1083/jcb.140.4.911 [doi]
- Barbacid, M. (1994). The trk family of neurotrophin receptors. *Journal of Neurobiology*, *25*(11), 1386-1403. doi:10.1002/neu.480251107 [doi]
- Baron, T., and Biacabe, A. G. (2007). Molecular behaviors of "CH1641-like" sheep scrapie isolates in ovine transgenic mice (TgOvPrP4). *Journal of Virology*, *81*(13), 7230-7237. doi:JVI.02475-06 [pii]
- Baron, T., Vulin, J., Biacabe, A. G., Lakhdar, L., Verchere, J., Torres, J. M., and Bencsik, A. (2011). Emergence of classical BSE strain properties during serial passages of H-BSE in wild-type mice. *PloS One*, *6*(1), e15839. doi:10.1371/journal.pone.0015839 [doi]
- Bartz, J. C., Bessen, R. A., McKenzie, D., Marsh, R. F., and Aiken, J. M. (2000). Adaptation and selection of prion protein strain conformations following interspecies transmission of transmissible mink encephalopathy. *Journal of Virology*, *74*(12), 5542-5547. doi:10.1128/jvi.74.12.5542-5547.2000 [doi]
- Bartz, J. C., McKenzie, D. I., Bessen, R. A., Marsh, R. F., and Aiken, J. M. (1994). Transmissible mink encephalopathy species barrier effect between ferret and mink: PrP gene and protein analysis. *The Journal of General Virology*, *75* (Pt 11)(Pt 11), 2947-2953. doi:10.1099/0022-1317-75-11-2947 [doi]
- Baskakov, I. V. (2014). The many shades of prion strain adaptation. *Prion*, *8*(2), 10.4161/pri.27836. Epub 2014 Feb 11. doi:27836 [pii]
- 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*(3), 417-428. doi:0092-8674(86)90662-8 [pii]
- Beck, J. A., Poulter, M., Campbell, T. A., Adamson, G., Uphill, J. B., Guerreiro, R., Jackson, G. S., Stevens, J. C., Manji, H., Collinge, J., and Mead, S. (2010). PRNP allelic series from 19 years of prion protein gene sequencing at the MRC prion unit. *Human Mutation*, *31*(7), E1551-63. doi:10.1002/humu.21281 [doi]
- Beck, K. E., Sallis, R. E., Lockey, R., Vickery, C. M., Beringue, V., Laude, H., Holder, T. M., Thorne, L., Terry, L. A., Tout, A. C., Jayasena, D., Griffiths, P. C., Cawthraw, S., Ellis, R., Balkema-Buschmann, A., Groschup, M. H., Simmons, M. M., and Spiropoulos, J. (2012). Use of murine bioassay to resolve ovine transmissible spongiform encephalopathy cases showing a bovine spongiform encephalopathy molecular profile. *Brain Pathology*, *22*(3), 265-279. doi:10.1111/j.1750-3639.2011.00526.x [doi]

Becker, K., Cana, A., Baumgartner, W., and Spitzbarth, I. (2018). p75 neurotrophin receptor: A double-edged sword in pathology and regeneration of the central nervous system. *Veterinary Pathology*, 55(6), 786-801. doi:10.1177/0300985818781930 [doi]

Beekes, M., and McBride, P. A. (2000). Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neuroscience Letters*, 278(3), 181-184. doi:S0304394099009349 [pii]

Beekes, M., McBride, P. A., and Baldauf, E. (1998). Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *The Journal of General Virology*, 79 (Pt 3)(Pt 3), 601-607. doi:10.1099/0022-1317-79-3-601 [doi]

Belt, P. B., Muileman, I. H., Schreuder, B. E., Bos-de Ruijter, J., Gielkens, A. L., and Smits, M. A. (1995). Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *The Journal of General Virology*, 76 (Pt 3)(Pt 3), 509-517. doi:10.1099/0022-1317-76-3-509 [doi]

Bencsik, A., Leboire, M., Debeer, S., Aufauvre, C., and Baron, T. (2013). Unique properties of the classical bovine spongiform encephalopathy strain and its emergence from H-type bovine spongiform encephalopathy substantiated by VM transmission studies. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 72(3), 211-218. doi:10.1097/NEN.0b013e318285c7f9 [doi]

Bencsik, A., Philippe, S., Debeer, S., Crozet, C., Calavas, D., and Baron, T. (2007). Scrapie strain transmission studies in ovine PrP transgenic mice reveal dissimilar susceptibility. *Histochemistry and Cell Biology*, 127(5), 531-539. doi:10.1007/s00418-007-0276-8 [doi]

Bendheim, P. E., Brown, H. R., Rudelli, R. D., Scala, L. J., Goller, N. L., Wen, G. Y., Kascsak, R. J., Cashman, N. R., and Bolton, D. C. (1992). Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology*, 42(1), 149-156. doi:10.1212/wnl.42.1.149 [doi]

Benestad, S. L., Arsaç, J. N., Goldmann, W., and Noremark, M. (2008). Atypical/Nor98 scrapie: Properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Veterinary Research*, 39(4), 19. doi:10.1051/vetres:2007056 [doi]

Benestad, S. L., Sarradin, P., Thu, B., Schonheit, J., Tranulis, M. A., and Bratberg, B. (2003). Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *The Veterinary Record*, 153(7), 202-208. doi:10.1136/vr.153.7.202 [doi]

Beringue, V., Androletti, O., Le Dur, A., Essalmani, R., Vilotte, J. L., Lacroux, C., Reine, F., Herzog, L., Biacabe, A. G., Baron, T., Caramelli, M., Casalone, C., and Laude, H. (2007). A bovine prion acquires an epidemic bovine spongiform encephalopathy strain-like phenotype on interspecies transmission. *The Journal of Neuroscience*, 27(26), 6965-6971. doi:27/26/6965 [pii]

Beringue, V., Le Dur, A., Tixador, P., Reine, F., Lepourry, L., Perret-Liaudet, A., Haik, S., Vilotte, J. L., Fontes, M., and Laude, H. (2008). Prominent and persistent extraneural

infection in human PrP transgenic mice infected with variant CJD. *PLoS One*, 3(1), e1419. doi:10.1371/journal.pone.0001419 [doi]

Beringue, V., Mallinson, G., Kaisar, M., Tayebi, M., Sattar, Z., Jackson, G., Anstee, D., Collinge, J., and Hawke, S. (2003). Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain. *Brain*, 126(Pt 9), 2065-2073. doi:10.1093/brain/awg205 [doi]

Beringue, V., Vilotte, J. L., and Laude, H. (2008). Prion agent diversity and species barrier. *Veterinary Research*, 39(4), 47. doi:10.1051/vetres:2008024 [doi]

Bessen, R. A., and Marsh, R. F. (1992a). Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *Journal of Virology*, 66(4), 2096-2101.

Bessen, R. A., and Marsh, R. F. (1992b). Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *The Journal of General Virology*, 73 (Pt 2)(Pt 2), 329-334. doi:10.1099/0022-1317-73-2-329 [doi]

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

Betmouni, S., Perry, V. H., and Gordon, J. L. (1996). Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie. *Neuroscience*, 74(1), 1-5. doi:0306-4522(96)00212-6 [pii]

Biacabe, A. G., Laplanche, J. L., Ryder, S., and Baron, T. (2004). Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Reports*, 5(1), 110-115. doi:10.1038/sj.embor.7400054 [doi]

Bian, J., Khaychuk, V., Angers, R. C., Fernandez-Borges, N., Vidal, E., Meyerett-Reid, C., Kim, S., Calvi, C. L., Bartz, J. C., Hoover, E. A., Agrimi, U., Richt, J. A., Castilla, J., and Telling, G. C. (2017). Prion replication without host adaptation during interspecies transmissions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, doi:201611891 [pii]

Bibel, M., and Barde, Y. A. (2000). Neurotrophins: Key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes & Development*, 14(23), 2919-2937. doi:10.1101/gad.841400 [doi]

Bibel, M., Hoppe, E., and Barde, Y. A. (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *The EMBO Journal*, 18(3), 616-622. doi:10.1093/emboj/18.3.616 [doi]

Blennow, K., Diaz-Lucena, D., Zetterberg, H., Villar-Pique, A., Karch, A., Vidal, E., Hermann, P., Schmitz, M., Ferrer Abizanda, I., Zerr, I., and Llorens, F. (2019). CSF neurogranin as a neuronal damage marker in CJD: A comparative study with AD.

Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, 90(8), 846-853. doi:10.1136/jnnp-2018-320155 [doi]

Bolea, R., Hedman, C., Lopez-Perez, O., Marin, B., Vidal, E., Pumarola, M., Corbiere, F., Romero, A., Moreno, B., Martin-Burriel, I., Andreoletti, O., and Badiola, J. J. (2017). Experimental transmission to a calf of an isolate of spanish classical scrapie. *The Journal of General Virology*, doi:10.1099/jgv.0.000906 [doi]

Bolton, D. C., McKinley, M. P., and Prusiner, S. B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, 218(4579), 1309-1311. doi:10.1126/science.6815801 [doi]

Bonda, D. J., Manjila, S., Mehndiratta, P., Khan, F., Miller, B. R., Onwuzulike, K., Puoti, G., Cohen, M. L., Schonberger, L. B., and Cali, I. (2016). Human prion diseases: Surgical lessons learned from iatrogenic prion transmission. *Neurosurgical Focus*, 41(1), E10. doi:10.3171/2016.5.FOCUS15126 [doi]

Bounhar, Y., Zhang, Y., Goodyer, C. G., and LeBlanc, A. (2001). Prion protein protects human neurons against bax-mediated apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 39145-39149. doi:10.1074/jbc.C100443200 [doi]

Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C., and Aguzzi, A. (1996). Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature*, 379(6563), 339-343. doi:10.1038/379339a0 [doi]

Brown, D. R. (2005). Neurodegeneration and oxidative stress: Prion disease results from loss of antioxidant defence. *Folia Neuropathologica*, 43(4), 229-243. doi:5367 [pii]

Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., and Kretschmar, H. (1997). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, 390(6661), 684-687. doi:10.1038/37783 [doi]

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. *The Biochemical Journal*, 344 Pt 1, 1-5.

Brown, P., Cervenakova, L., and Diringer, H. (2001). Blood infectivity and the prospects for a diagnostic screening test in creutzfeldt-jakob disease. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 137(1), 5-13. doi:S0022-2143(01)29163-X [pii]

Bruce, M., Chree, A., McConnell, I., Foster, J., Pearson, G., and Fraser, H. (1994). Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: Strain variation and the species barrier. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 343(1306), 405-411. doi:10.1098/rstb.1994.0036 [doi]

Bruce, M. E. (1993). Scrapie strain variation and mutation. *British Medical Bulletin*, 49(4), 822-838.

Bruce, M. E., Boyle, A., Cousens, S., McConnell, I., Foster, J., Goldmann, W., and Fraser, H. (2002). Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *Journal of General Virology*, 83, 695-704.

Bruce, M. E., and Dickinson, A. G. (1987). Biological evidence that scrapie agent has an independent genome. *The Journal of General Virology*, 68 (Pt 1)(Pt 1), 79-89. doi:10.1099/0022-1317-68-1-79 [doi]

Bruce, M. E., McConnell, I., Fraser, H., and Dickinson, A. G. (1991). The disease characteristics of different strains of scrapie in sinc congenic mouse lines: Implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. *The Journal of General Virology*, 72 (Pt 3)(Pt 3), 595-603. doi:10.1099/0022-1317-72-3-595 [doi]

Bruce, M. E., McConnell, I., Will, R. G., and Ironside, J. W. (2001). Detection of variant creutzfeldt-jakob disease infectivity in extraneural tissues. *Lancet*, 358(9277), 208-209. doi:S0140673601054113 [pii]

Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., and Bostock, C. J. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 389(6650), 498-501. doi:10.1038/39057 [doi]

Budka, H. (2003). Neuropathology of prion diseases. *British Medical Bulletin*, 66, 121-130. doi:10.1093/bmb/66.1.121 [doi]

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

Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., and Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, 73(7), 1339-1347. doi:0092-8674(93)90360-3 [pii]

Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M., and Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, 356(6370), 577-582. doi:10.1038/356577a0 [doi]

Camacho, M. V., Telling, G., Kong, Q., Gambetti, P., and Notari, S. (2019). Role of prion protein glycosylation in replication of human prions by protein misfolding cyclic amplification. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, doi:10.1038/s41374-019-0282-1 [doi]

Cancellotti, E., Wiseman, F., Tuzi, N. L., Baybutt, H., Monaghan, P., Aitchison, L., Simpson, J., and Manson, J. C. (2005). Altered glycosylated PrP proteins can have different neuronal trafficking in brain but do not acquire scrapie-like properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(52), 42909-42918. doi:M509557200 [pii]

Capellari, S., Vital, C., Parchi, P., Petersen, R. B., Ferrer, X., Jarnier, D., Pegoraro, E., Gambetti, P., and Julien, J. (1997). Familial prion disease with a novel 144-bp insertion in the prion protein gene in a basque family. *Neurology*, 49(1), 133-141.

Capobianco, R., Casalone, C., Suardi, S., Mangieri, M., Miccolo, C., Limido, L., Catania, M., Rossi, G., Di Fede, G., Giaccone, G., Bruzzone, M. G., Minati, L., Corona, C., Acutis, P., Gelmetti, D., Lombardi, G., Groschup, M. H., Buschmann, A., Zanusso, G., Monaco, S., Caramelli, M., and Tagliavini, F. (2007). Conversion of the BASE prion strain into the BSE strain: The origin of BSE? *PLoS Pathogens*, 3(3), e31. doi:06-PLPA-RA-0424R2 [pii]

Carroll, J. A., Race, B., Williams, K., Striebel, J., and Chesebro, B. (2018). Microglia are critical in host defense against prion disease. *Journal of Virology*, 92(15), 10.1128/JVI.00549-18. Print 2018 Aug 1. doi:e00549-18 [pii]

Casalone, C., Corona, C., Crescio, M. I., Martucci, F., Mazza, M., Ru, G., Bozzetta, E., Acutis, P. L., and Caramelli, M. (2005). Pathological prion protein in the tongues of sheep infected with naturally occurring scrapie. *Journal of Virology*, 79(9), 5847-5849. doi:79/9/5847 [pii]

Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., Monaco, S., and Caramelli, M. (2004). Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic creutzfeldt-jakob disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 3065-3070. doi:10.1073/pnas.0305777101 [doi]

Cassard, H., Torres, J. M., Lacroux, C., Douet, J. Y., Benestad, S. L., Lantier, F., Lugan, S., Lantier, I., Costes, P., Aron, N., Reine, F., Herzog, L., Espinosa, J. C., Beringue, V., and Andreoletti, O. (2014). Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. *Nature Communications*, 5, 5821. doi:10.1038/ncomms6821 [doi]

Castilla, J., Hetz, C., and Soto, C. (2004). Molecular mechanisms of neurotoxicity of pathological prion protein. *Current Molecular Medicine*, 4(4), 397-403.

Castilla, J., Saá, P., Hetz, C., and Soto, C. (2005). In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*, 121(2), 195-206. doi:S0092-8674(05)00156-X [pii]

Castilla, J., Saá, P., Morales, R., Abid, K., Maundrell, K., and Soto, C. (2006). Protein misfolding cyclic amplification for diagnosis and prion propagation studies. *Methods in Enzymology*, 412, 3-21. doi:S0076-6879(06)12001-7 [pii]

Castilla, J., Saá, P., and Soto, C. (2005). Detection of prions in blood. *Nature Medicine*, 11(9), 982-985. doi:nm1286 [pii]

- Caughey, B., Race, R. E., Ernst, D., Buchmeier, M. J., and Chesebro, B. (1989). Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *Journal of Virology*, *63*(1), 175-181.
- Clark, A. M., and Moar, J. A. (1992). Scrapie: A clinical assessment. *The Veterinary Record*, *130*(17), 377-378. doi:10.1136/vr.130.17.377 [doi]
- Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (1998). Pathologic conformations of prion proteins. *Annual Review of Biochemistry*, *67*, 793-819. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.793 [doi]
- Coitinho, A. S., Freitas, A. R., Lopes, M. H., Hajj, G. N., Roesler, R., Walz, R., Rossato, J. I., Cammarota, M., Izquierdo, I., Martins, V. R., and Brentani, R. R. (2006). The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. *The European Journal of Neuroscience*, *24*(11), 3255-3264. doi:EJN5156 [pii]
- Coitinho, A. S., Lopes, M. H., Hajj, G. N., Rossato, J. I., Freitas, A. R., Castro, C. C., Cammarota, M., Brentani, R. R., Izquierdo, I., and Martins, V. R. (2007). Short-term memory formation and long-term memory consolidation are enhanced by cellular prion association to stress-inducible protein 1. *Neurobiology of Disease*, *26*(1), 282-290. doi:S0969-9961(07)00024-1 [pii]
- Colby, D. W., Zhang, Q., Wang, S., Groth, D., Legname, G., Riesner, D., and Prusiner, S. B. (2007). Prion detection by an amyloid seeding assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(52), 20914-20919. doi:0710152105 [pii]
- Collinge, J. (1999). Variant creutzfeldt-jakob disease. *Lancet*, *354*(9175), 317-323. doi:S0140-6736(99)05128-4 [pii]
- Collinge, J. (2001). Prion diseases of humans and animals: Their causes and molecular basis. *Annual Review of Neuroscience*, *24*, 519-550. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.519 [doi]
- Collinge, J. (2010). Medicine. prion strain mutation and selection. *Science*, *328*(5982), 1111-1112. doi:10.1126/science.1190815 [doi]
- Collinge, J., Brown, J., Hardy, J., Mullan, M., Rossor, M. N., Baker, H., Crow, T. J., Lofthouse, R., Poulter, M., and Ridley, R. (1992). Inherited prion disease with 144 base pair gene insertion. 2. clinical and pathological features. *Brain*, *115* (Pt 3)(Pt 3), 687-710.
- Collinge, J., and Clarke, A. R. (2007). A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science*, *318*(5852), 930-936. doi:318/5852/930 [pii]
- Collinge, J., Palmer, M. S., and Dryden, A. J. (1991). Genetic predisposition to iatrogenic creutzfeldt-jakob disease. *Lancet*, *337*(8755), 1441-1442. doi:0140-6736(91)93128-V [pii]

Collinge, J., Palmer, M. S., Sidle, K. C., Hill, A. F., Gowland, I., Meads, J., Asante, E., Bradley, R., Doey, L. J., and Lantos, P. L. (1995). Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. *Nature*, *378*(6559), 779-783. doi:10.1038/378779a0 [doi]

Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J., and Hill, A. F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, *383*(6602), 685-690. doi:10.1038/383685a0 [doi]

Cosseddu, G. M., Agrimi, U., Pinto, J., and Schudel, A. A. (2007). Advances in scrapie research. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, *26*(3), 657-668.

Cragolini, A. B., and Friedman, W. J. (2008). The function of p75^{NTR} in glia. *Trends in Neurosciences*, *31*(2), 99-104. doi:10.1016/j.tins.2007.11.005 [doi]

Cragolini, A. B., Huang, Y., Gokina, P., and Friedman, W. J. (2009). Nerve growth factor attenuates proliferation of astrocytes via the p75 neurotrophin receptor. *Glia*, *57*(13), 1386-1392. doi:10.1002/glia.20857 [doi]

Cragolini, A. B., Volosin, M., Huang, Y., and Friedman, W. J. (2012). Nerve growth factor induces cell cycle arrest of astrocytes. *Developmental Neurobiology*, *72*(6), 766-776. doi:10.1002/dneu.20981 [doi]

Cramm, M., Schmitz, M., Karch, A., Mitrova, E., Kuhn, F., Schroeder, B., Raeber, A., Vargas, D., Kim, Y. S., Satoh, K., Collins, S., and Zerr, I. (2016). Stability and reproducibility underscore utility of RT-QuIC for diagnosis of creutzfeldt-jakob disease. *Molecular Neurobiology*, *53*(3), 1896-1904. doi:10.1007/s12035-015-9133-2 [doi]

Chandler, R. L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet*, *1*(7191), 1378-1379. doi:10.1016/s0140-6736(61)92008-6 [doi]

Chandler, R. L., and Fisher, J. (1963). Experimental transmission of scrapie to rats. *Lancet*, *2*(7318), 1165. doi:S0140-6736(63)90820-1 [pii]

Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., and Keith, J. M. (1985). Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*, *315*(6017), 331-333. doi:10.1038/315331a0 [doi]

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

Chianini, F., Fernandez-Borges, N., Vidal, E., Gibbard, L., Pintado, B., de Castro, J., Priola, S. A., Hamilton, S., Eaton, S. L., Finlayson, J., Pang, Y., Steele, P., Reid, H. W., Dagleish, M. P., and Castilla, J. (2012). Rabbits are not resistant to prion infection.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(13), 5080-5085. doi:10.1073/pnas.1120076109 [doi]

Chohan, G., Pennington, C., Mackenzie, J. M., Andrews, M., Everington, D., Will, R. G., Knight, R. S., and Green, A. J. (2010). The role of cerebrospinal fluid 14-3-3 and other proteins in the diagnosis of sporadic creutzfeldt-jakob disease in the UK: A 10-year review. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 81(11), 1243-1248. doi:10.1136/jnnp.2009.197962 [doi]

Dawbarn, D., and Allen, S. J. (2003). Neurotrophins and neurodegeneration. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 29(3), 211-230. doi:487 [pii]

Dawson, M., Hoinville, L. J., Hosie, B. D., and Hunter, N. (1998). Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. scrapie information group. *The Veterinary Record*, 142(23), 623-625.

DeArmond, S. J., Mobley, W. C., DeMott, D. L., Barry, R. A., Beckstead, J. H., and Prusiner, S. B. (1987). Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection. *Neurology*, 37(8), 1271-1280. doi:10.1212/wnl.37.8.1271 [doi]

Dearmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1993). The neurochemistry of prion diseases. *Journal of Neurochemistry*, 61(5), 1589-1601. doi:10.1111/j.1471-4159.1993.tb09792.x

DeArmond, S. J., Qiu, Y., Sanchez, H., Spilman, P. R., Ninchak-Casey, A., Alonso, D., and Daggett, V. (1999). PrP^C glycoform heterogeneity as a function of brain region: Implications for selective targeting of neurons by prion strains. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58(9), 1000-1009.

DeArmond, S. J., Sanchez, H., Yehiely, F., Qiu, Y., Ninchak-Casey, A., Daggett, V., Camerino, A. P., Cayetano, J., Rogers, M., Groth, D., Torchia, M., Tremblay, P., Scott, M. R., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (1997). Selective neuronal targeting in prion disease. *Neuron*, 19(6), 1337-1348. doi:S0896-6273(00)80424-9 [pii]

Della-Bianca, V., Rossi, F., Armato, U., Dal-Pra, I., Costantini, C., Perini, G., Politi, V., and Della Valle, G. (2001). Neurotrophin p75 receptor is involved in neuronal damage by prion peptide-(106-126). *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38929-38933. doi:10.1074/jbc.M107454200

Dennis, M. M., Thomsen, B. V., Marshall, K. L., Hall, S. M., Wagner, B. A., Salman, M. D., Norden, D. K., Gaiser, C., and Sutton, D. L. (2009). Evaluation of immunohistochemical detection of prion protein in rectoanal mucosa-associated lymphoid tissue for diagnosis of scrapie in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, 70(1), 63-72. doi:10.2460/ajvr.70.1.63 [doi]

Deslys, J. P., Marce, D., and Dormont, D. (1994). Similar genetic susceptibility in iatrogenic and sporadic creutzfeldt-jakob disease. *The Journal of General Virology*, 75 (Pt 1)(Pt 1), 23-27. doi:10.1099/0022-1317-75-1-23 [doi]

Detwiler, L. A., and Baylis, M. (2003). The epidemiology of scrapie. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, 22(1), 121-143.

Di Bari, M. A., Chianini, F., Vaccari, G., Esposito, E., Conte, M., Eaton, S. L., Hamilton, S., Finlayson, J., Steele, P. J., Dagleish, M. P., Reid, H. W., Bruce, M., Jeffrey, M., Agrimi, U., and Nonno, R. (2008). The bank vole (*Myodes glareolus*) as a sensitive bioassay for sheep scrapie. *The Journal of General Virology*, 89(Pt 12), 2975-2985. doi:10.1099/vir.0.2008/005520-0 [doi]

Diaz-Espinoza, R., and Soto, C. (2012). High-resolution structure of infectious prion protein: The final frontier. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(4), 370-377. doi:10.1038/nsmb.2266 [doi]

Dickinson, A. G., Fraser, H., Meikle, V. M., and Outram, G. W. (1972). Competition between different scrapie agents in mice. *Nature: New Biology*, 237(77), 244-245.

Dickinson, A. G., and Meikle, V. M. (1969). A comparison of some biological characteristics of the mouse-passaged scrapie agents, 22A and ME7. *Genetical Research*, 13(2), 213-225.

Dickinson, A. G., and Meikle, V. M. (1971). Host-genotype and agent effects in scrapie incubation: Change in allelic interaction with different strains of agent. *Molecular & General Genetics : MGG*, 112(1), 73-79.

Dickinson, A. G., Meikle, V. M., and Fraser, H. (1968). Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *Journal of Comparative Pathology*, 78(3), 293-299. doi:0021-9975(68)90005-4 [pii]

Domeniconi, M., Hempstead, B. L., and Chao, M. V. (2007). Pro-NGF secreted by astrocytes promotes motor neuron cell death. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 34(2), 271-279. doi:S1044-7431(06)00257-0 [pii]

Dorandeu, A., Wingertsmann, L., Chretien, F., Delisle, M. B., Vital, C., Parchi, P., Montagna, P., Lugaresi, E., Ironside, J. W., Budka, H., Gambetti, P., and Gray, F. (1998). Neuronal apoptosis in fatal familial insomnia. *Brain Pathology*, 8(3), 531-537.

Dorey, A., Tholance, Y., Vighetto, A., Perret-Liaudet, A., Lachman, I., Krolak-Salmon, P., Wagner, U., Struyfs, H., De Deyn, P. P., El-Moualij, B., Zorzi, W., Meyronet, D., Streichenberger, N., Engelborghs, S., Kovacs, G. G., and Quadrio, I. (2015). Association of cerebrospinal fluid prion protein levels and the distinction between Alzheimer disease and Creutzfeldt-Jakob disease. *JAMA Neurology*, 72(3), 267-275. doi:10.1001/jamaneurol.2014.4068 [doi]

Dowling, P., Ming, X., Raval, S., Husar, W., Casaccia-Bonofil, P., Chao, M., Cook, S., and Blumberg, B. (1999). Up-regulated p75^{NTR} neurotrophin receptor on glial cells in MS plaques. *Neurology*, 53(8), 1676-1682. doi:10.1212/wnl.53.8.1676 [doi]

Duffy, P., Wolf, J., Collins, G., DeVoe, A. G., Streeten, B., and Cowen, D. (1974). Letter: Possible person-to-person transmission of creutzfeldt-jakob disease. *The New England Journal of Medicine*, 290(12), 692-693.

Elezgarai, S. R., Fernandez-Borges, N., Erana, H., Sevillano, A. M., Charco, J. M., Harrathi, C., Saá, P., Gil, D., Kong, Q., Requena, J. R., Andreoletti, O., and Castilla, J. (2017). Generation of a new infectious recombinant prion: A model to understand gerstmann-straussler-scheinker syndrome. *Scientific Reports*, 7(1), 9584-017-09489-3. doi:10.1038/s41598-017-09489-3 [doi]

Eloit, M., Adjou, K., Couplier, M., Fontaine, J. J., Hamel, R., Lilin, T., Messiaen, S., Andreoletti, O., Baron, T., Bencsik, A., Biacabe, A. G., Beringue, V., Laude, H., Le Dur, A., Vilotte, J. L., Comoy, E., Deslys, J. P., Grassi, J., Simon, S., Lantier, F., and Sarradin, P. (2005). BSE agent signatures in a goat. *The Veterinary Record*, 156(16), 523-524. doi:156/16/523-b [pii]

Erana, H. (2019). The prion 2018 round tables (II): Abeta, tau, alpha-synuclein... are they prions, prion-like proteins, or what? *Prion*, 13(1), 41-45. doi:10.1080/19336896.2019.1569451 [doi]

Erana, H., Fernandez-Borges, N., Elezgarai, S. R., Harrathi, C., Charco, J. M., Chianini, F., Dagleish, M. P., Ortega, G., Millet, O., and Castilla, J. (2017). In vitro approach to identify key amino acids in low susceptibility of rabbit prion protein to misfolding. *Journal of Virology*, 91(24), 10.1128/JVI.01543-17. Print 2017 Dec 15. doi:e01543-17 [pii]

Everest, S. J., Ramsay, A. M., Chaplin, M. J., Everitt, S., Stack, M. J., Neale, M. H., Jeffrey, M., Moore, S. J., Bellworthy, S. J., and Terry, L. A. (2011). Detection and localisation of PrP(sc) in the liver of sheep infected with scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *PloS One*, 6(5), e19737. doi:10.1371/journal.pone.0019737 [doi]

Fernandez-Borges, N., Di Bari, M. A., Erana, H., Sanchez-Martin, M., Pirisinu, L., Parra, B., Elezgarai, S. R., Vanni, I., Lopez-Moreno, R., Vaccari, G., Venegas, V., Charco, J. M., Gil, D., Harrathi, C., D'Agostino, C., Agrimi, U., Mayoral, T., Requena, J. R., Nonno, R., and Castilla, J. (2018). Cofactors influence the biological properties of infectious recombinant prions. *Acta Neuropathologica*, 135(2), 179-199. doi:10.1007/s00401-017-1782-y [doi]

Fernandez-Borges, N., Erana, H., Elezgarai, S. R., Harrathi, C., Venegas, V., and Castilla, J. (2017). A quick method to evaluate the effect of the amino acid sequence in the misfolding proneness of the prion protein. *Methods in Molecular Biology*, 1658, 205-216. doi:10.1007/978-1-4939-7244-9_15 [doi]

Ferrer, I. (1999). Nuclear DNA fragmentation in creutzfeldt-jakob disease: Does a mere positive in situ nuclear end-labeling indicate apoptosis? *Acta Neuropathologica*, 97(1), 5-12.

Foster, J. D., and Dickinson, A. G. (1988). The unusual properties of CH1641, a sheep-passaged isolate of scrapie. *The Veterinary Record*, 123(1), 5-8.

Foster, J. D., Goldmann, W., and Hunter, N. (2013). Evidence in sheep for pre-natal transmission of scrapie to lambs from infected mothers. *PLoS One*, 8(11), e79433. doi:10.1371/journal.pone.0079433 [doi]

Foster, J. D., Wilson, M., and Hunter, N. (1996). Immunolocalisation of the prion protein (PrP) in the brains of sheep with scrapie. *The Veterinary Record*, 139(21), 512-515. doi:10.1136/vr.139.21.512 [doi]

Fraser, H. (1982). Neuronal spread of scrapie agent and targeting of lesions within the retino-tectal pathway. *Nature*, 295(5845), 149-150. doi:10.1038/295149a0 [doi]

Fraser, H., Bruce, M. E., Chree, A., McConnell, I., and Wells, G. A. (1992). Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice. *The Journal of General Virology*, 73 (Pt 8)(Pt 8), 1891-1897. doi:10.1099/0022-1317-73-8-1891 [doi]

Fraser, H., and Dickinson, A. G. (1968). The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *Journal of Comparative Pathology*, 78(3), 301-311.

Fraser, H., and Dickinson, A. G. (1973). Scrapie in mice. agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *Journal of Comparative Pathology*, 83(1), 29-40. doi:0021-9975(73)90024-8 [pii]

Fraser, H., McConnell, I., Wells, G. A., and Dawson, M. (1988). Transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice. *The Veterinary Record*, 123(18), 472. doi:10.1136/vr.123.18.472 [doi]

Fry, E. J., Ho, C., and David, S. (2007). A role for nogo receptor in macrophage clearance from injured peripheral nerve. *Neuron*, 53(5), 649-662. doi:S0896-6273(07)00108-0 [pii]

Furukawa, S., Furukawa, Y., Satoyoshi, E., and Hayashi, K. (1986). Synthesis and secretion of nerve growth factor by mouse astroglial cells in culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 136(1), 57-63. doi:0006-291X(86)90876-4 [pii]

Gambetti, P., Dong, Z., Yuan, J., Xiao, X., Zheng, M., Alshekhlee, A., Castellani, R., Cohen, M., Barria, M. A., Gonzalez-Romero, D., Belay, E. D., Schonberger, L. B., Marder, K., Harris, C., Burke, J. R., Montine, T., Wisniewski, T., Dickson, D. W., Soto, C., Hulette, C. M., Mastrianni, J. A., Kong, Q., and Zou, W. Q. (2008). A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Annals of Neurology*, 63(6), 697-708. doi:10.1002/ana.21420 [doi]

Gambetti, P., Kong, Q., Zou, W., Parchi, P., and Chen, S. G. (2003). Sporadic and familial CJD: Classification and characterisation. *British Medical Bulletin*, 66, 213-239. doi:10.1093/bmb/66.1.213 [doi]

Garza, M. C., Fernandez-Borges, N., Bolea, R., Badiola, J. J., Castilla, J., and Monleon, E. (2011). Detection of PrPres in genetically susceptible fetuses from sheep with natural scrapie. *PLoS One*, *6*(12), e27525. doi:10.1371/journal.pone.0027525 [doi]

Garza, M. C., Monzon, M., Marin, B., Badiola, J. J., and Monleon, E. (2014). Distribution of peripheral PrP(sc) in sheep with naturally acquired scrapie. *PLoS One*, *9*(5), e97768. doi:10.1371/journal.pone.0097768 [doi]

Gerhauser, I., Hahn, K., Baumgartner, W., and Wewetzer, K. (2012). Culturing adult canine sensory neurons to optimise neural repair. *The Veterinary Record*, *170*(4), 102. doi:10.1136/vr.100255 [doi]

Gibbons, R. A., and Hunter, G. D. (1967). Nature of the scrapie agent. *Nature*, *215*(5105), 1041-1043. doi:10.1038/2151041a0 [doi]

Gibbs, C. J., Jr, Gajdusek, D. C., Asher, D. M., Alpers, M. P., Beck, E., Daniel, P. M., and Matthews, W. B. (1968). Creutzfeldt-jakob disease (spongiform encephalopathy): Transmission to the chimpanzee. *Science*, *161*(3839), 388-389. doi:10.1126/science.161.3839.388 [doi]

Giese, A., Groschup, M. H., Hess, B., and Kretzschmar, H. A. (1995). Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathology*, *5*(3), 213-221.

Goldmann, W., Hunter, N., Smith, G., Foster, J., and Hope, J. (1994). PrP genotype and agent effects in scrapie: Change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *The Journal of General Virology*, *75* (Pt 5)(Pt 5), 989-995. doi:10.1099/0022-1317-75-5-989 [doi]

Goldmann, W., Ryan, K., Stewart, P., Parnham, D., Xicohtencatl, R., Fernandez, N., Saunders, G., Windl, O., Gonzalez, L., Bossers, A., and Foster, J. (2011). Caprine prion gene polymorphisms are associated with decreased incidence of classical scrapie in goat herds in the united kingdom. *Veterinary Research*, *42*, 110-9716-42-110. doi:10.1186/1297-9716-42-110 [doi]

Gonzalez, L., Jeffrey, M., Siso, S., Martin, S., Bellworthy, S. J., Stack, M. J., Chaplin, M. J., Davis, L., Dagleish, M. P., and Reid, H. W. (2005). Diagnosis of preclinical scrapie in samples of rectal mucosa. *The Veterinary Record*, *156*(26), 846-847. doi:156/26/846-b [pii]

Gonzalez, L., Martin, S., Begara-McGorum, I., Hunter, N., Houston, F., Simmons, M., and Jeffrey, M. (2002). Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *Journal of Comparative Pathology*, *126*(1), 17-29. doi:10.1053/jcpa.2001.0516 [doi]

Gonzalez, L., Martin, S., and Jeffrey, M. (2003). Distinct profiles of PrP(d) immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE-infected sheep: Implications for differential cell targeting and PrP processing. *The Journal of General Virology*, *84*(Pt 5), 1339-1350.

Gough, K. C., Baker, C. A., Rees, H. C., Terry, L. A., Spiropoulos, J., Thorne, L., and Maddison, B. C. (2012). The oral secretion of infectious scrapie prions occurs in preclinical sheep with a range of PRNP genotypes. *Journal of Virology*, *86*(1), 566-571. doi:10.1128/JVI.05579-11 [doi]

Gretzschel, A., Buschmann, A., Eiden, M., Ziegler, U., Luhken, G., Erhardt, G., and Groschup, M. H. (2005). Strain typing of german transmissible spongiform encephalopathies field cases in small ruminants by biochemical methods. *Journal of Veterinary Medicine, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, *52*(2), 55-63. doi:JV827 [pii]

Griffith, J. S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature*, *215*(5105), 1043-1044. doi:10.1038/2151043a0 [doi]

Griffiths, P. C., Spiropoulos, J., Lockey, R., Tout, A. C., Jayasena, D., Plater, J. M., Chave, A., Green, R. B., Simonini, S., Thorne, L., Dexter, I., Balkema-Buschmann, A., Groschup, M. H., Beringue, V., Le Dur, A., Laude, H., and Hope, J. (2010). Characterization of atypical scrapie cases from great britain in transgenic ovine PrP mice. *The Journal of General Virology*, *91*(Pt 8), 2132-2138. doi:10.1099/vir.0.018986-0 [doi]

Groschup, M. H., Lacroux, C., Buschmann, A., Luhken, G., Mathey, J., Eiden, M., Lugan, S., Hoffmann, C., Espinosa, J. C., Baron, T., Torres, J. M., Erhardt, G., and Androletti, O. (2007). Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in germany and france. *Emerging Infectious Diseases*, *13*(8), 1201-1207. doi:10.3201/eid1308.070077 [doi]

Groveman, B. R., Dolan, M. A., Taubner, L. M., Kraus, A., Wickner, R. B., and Caughey, B. (2014). Parallel in-register intermolecular beta-sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(35), 24129-24142. doi:10.1074/jbc.M114.578344 [doi]

Haass, C., and Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature Reviews.Molecular Cell Biology*, *8*(2), 101-112. doi:nrm2101 [pii]

Hachiya, N. S., Watanabe, K., Sakasegawa, Y., and Kaneko, K. (2004). Microtubules-associated intracellular localization of the NH2-terminal cellular prion protein fragment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *313*(3), 818-823. doi:S0006291X03025592 [pii]

Hannaoui, S., Schatzl, H. M., and Gilch, S. (2017). Chronic wasting disease: Emerging prions and their potential risk. *PLoS Pathogens*, *13*(11), e1006619. doi:10.1371/journal.ppat.1006619 [doi]

Haraguchi, T., Fisher, S., Olofsson, S., Endo, T., Groth, D., Tarentino, A., Borchelt, D. R., Teplow, D., Hood, L., and Burlingame, A. (1989). Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *274*(1), 1-13. doi:0003-9861(89)90409-8 [pii]

- Healy, A. M., Weavers, E., McElroy, M., Gomez-Parada, M., Collins, J. D., O'Doherty, E., Sweeney, T., and Doherty, M. L. (2003). The clinical neurology of scrapie in irish sheep. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(6), 908-916. doi:10.1111/j.1939-1676.2003.tb02532.x [doi]
- Hedman, C., Lyahyai, J., Filali, H., Marin, B., Serrano, C., Monleon, E., Moreno, B., Zaragoza, P., Badiola, J. J., Martin-Burriel, I., and Bolea, R. (2012). Differential gene expression and apoptosis markers in presymptomatic scrapie affected sheep. *Veterinary Microbiology*, 159(1-2), 23-32. doi:10.1016/j.vetmic.2012.03.020 [doi]
- Heggebo, R., Gonzalez, L., Press, C. M., Gunnes, G., Espenes, A., and Jeffrey, M. (2003). Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected suffolk sheep. *The Journal of General Virology*, 84(Pt 5), 1327-1338. doi:10.1099/vir.0.18874-0 [doi]
- Heggebo, R., Press, C. M., Gunnes, G., Lie, K. I., Tranulis, M. A., Ulvund, M., Groschup, M. H., and Landsverk, T. (2000). Distribution of prion protein in the ileal peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *The Journal of General Virology*, 81(Pt 9), 2327-2337. doi:10.1099/0022-1317-81-9-2327 [doi]
- Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D. R., Parada, L. F., and Chao, M. V. (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature*, 350(6320), 678-683. doi:10.1038/350678a0 [doi]
- Henry, R., and Murphy, F. A. (2017). Etymologia: Creutzfeldt-jakob disease. *Emerging Infectious Diseases*, 23(6), 956. doi:ET-2306 [pii]
- Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Maundrell, K., Castilla, J., and Soto, C. (2003). Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *The EMBO Journal*, 22(20), 5435-5445. doi:10.1093/emboj/cdg537 [doi]
- Hilton, D. A., Fathers, E., Edwards, P., Ironside, J. W., and Zajicek, J. (1998). Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant creutzfeldt-jakob disease. *Lancet*, 352(9129), 703-704. doi:S0140-6736(98)24035-9 [pii]
- Hill, A. F., Butterworth, R. J., Joiner, S., Jackson, G., Rossor, M. N., Thomas, D. J., Frosh, A., Tolley, N., Bell, J. E., Spencer, M., King, A., Al-Sarraj, S., Ironside, J. W., Lantos, P. L., and Collinge, J. (1999). Investigation of variant creutzfeldt-jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet*, 353(9148), 183-189. doi:S0140673698120755 [pii]
- Hill, A. F., and Collinge, J. (2003). Subclinical prion infection. *Trends in Microbiology*, 11(12), 578-584. doi:S0966842X03002877 [pii]
- Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J., and Lantos, P. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 389(6650), 448-50, 526. doi:10.1038/38925 [doi]

- Hill, A. F., Joiner, S., Linehan, J., Desbruslais, M., Lantos, P. L., and Collinge, J. (2000). Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(18), 10248-10253. doi:97/18/10248 [pii]
- Hill, A. F., Joiner, S., Wadsworth, J. D., Sidle, K. C., Bell, J. E., Budka, H., Ironside, J. W., and Collinge, J. (2003). Molecular classification of sporadic creutzfeldt-jakob disease. *Brain*, *126*(Pt 6), 1333-1346.
- Hoinville, L. J. (1996). A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, *15*(3), 827-852.
- Hope, J., Wood, S. C., Birkett, C. R., Chong, A., Bruce, M. E., Cairns, D., Goldmann, W., Hunter, N., and Bostock, C. J. (1999). Molecular analysis of ovine prion protein identifies similarities between BSE and an experimental isolate of natural scrapie, CH1641. *The Journal of General Virology*, *80* (Pt 1)(Pt 1), 1-4. doi:10.1099/0022-1317-80-1-1 [doi]
- Horiuchi, M., Priola, S. A., Chabry, J., and Caughey, B. (2000). Interactions between heterologous forms of prion protein: Binding, inhibition of conversion, and species barriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(11), 5836-5841. doi:10.1073/pnas.110523897 [doi]
- Horiuchi, M., Yamazaki, N., Ikeda, T., Ishiguro, N., and Shinagawa, M. (1995). A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *The Journal of General Virology*, *76* (Pt 10)(Pt 10), 2583-2587. doi:10.1099/0022-1317-76-10-2583 [doi]
- Houston, F., McCutcheon, S., Goldmann, W., Chong, A., Foster, J., Siso, S., Gonzalez, L., Jeffrey, M., and Hunter, N. (2008). Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood*, *112*(12), 4739-4745. doi:10.1182/blood-2008-04-152520 [doi]
- Hsiao, K., and Prusiner, S. B. (1990). Inherited human prion diseases. *Neurology*, *40*(12), 1820-1827.
- Hunter, N., Dann, J. C., Bennett, A. D., Somerville, R. A., McConnell, I., and Hope, J. (1992). Are sinc and the PrP gene congruent? evidence from PrP gene analysis in sinc congenic mice. *The Journal of General Virology*, *73* (Pt 10)(Pt 10), 2751-2755. doi:10.1099/0022-1317-73-10-2751 [doi]
- Hunter, N., Foster, J., Chong, A., McCutcheon, S., Parnham, D., Eaton, S., MacKenzie, C., and Houston, F. (2002). Transmission of prion diseases by blood transfusion. *The Journal of General Virology*, *83*(Pt 11), 2897-2905. doi:10.1099/0022-1317-83-11-2897 [doi]

- Hunter, N., Foster, J. D., Dickinson, A. G., and Hope, J. (1989). Linkage of the gene for the scrapie-associated fibril protein (PrP) to the sip gene in cheviot sheep. *The Veterinary Record*, *124*(14), 364-366. doi:10.1136/vr.124.14.364 [doi]
- Ishii, T., Warabi, E., and Mann, G. E. (2018). Circadian control of p75 neurotrophin receptor leads to alternate activation of Nrf2 and c-rel to reset energy metabolism in astrocytes via brain-derived neurotrophic factor. *Free Radical Biology & Medicine*, *119*, 34-44. doi:S0891-5849(18)30036-4 [pii]
- Jamieson, E., Jeffrey, M., Ironside, J. W., and Fraser, J. R. (2001). Apoptosis and dendritic dysfunction precede prion protein accumulation in 87V scrapie. *Neuroreport*, *12*(10), 2147-2153. doi:10.1097/00001756-200107200-00021 [doi]
- Jarrett, J. T., and Lansbury, P. T., Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, *73*(6), 1055-1058. doi:0092-8674(93)90635-4 [pii]
- Jeffrey, M., Begara-McGorum, I., Clark, S., Martin, S., Clark, J., Chaplin, M., and Gonzalez, L. (2002). Occurrence and distribution of infection-specific PrP in tissues of clinical scrapie cases and cull sheep from scrapie-affected farms in Shetland. *Journal of Comparative Pathology*, *127*(4), 264-273. doi:S002199750290592X [pii]
- Jeffrey, M., and Gonzalez, L. (2007). Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: Pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *33*(4), 373-394. doi:NAN868 [pii]
- Jeffrey, M., Goodsir, C. M., Holliman, A., Higgins, R. J., Bruce, M. E., McBride, P. A., and Fraser, J. R. (1998). Determination of the frequency and distribution of vascular and parenchymal amyloid with polyclonal and N-terminal-specific PrP antibodies in scrapie-affected sheep and mice. *The Veterinary Record*, *142*(20), 534-537. doi:10.1136/vr.142.20.534 [doi]
- Jeffrey, M., Martin, S., Thomson, J. R., Dingwall, W. S., Begara-McGorum, I., and Gonzalez, L. (2001). Onset and distribution of tissue prp accumulation in scrapie-affected Suffolk sheep as demonstrated by sequential necropsies and tonsillar biopsies. *Journal of Comparative Pathology*, *125*(1), 48-57. doi:10.1053/jcpa.2001.0476 [doi]
- Jesionek-Kupnicka, D., Buczynski, J., Kordek, R., and Liberski, P. P. (1999). Neuronal loss and apoptosis in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *Folia Neuropathologica*, *37*(4), 283-286.
- Jesionek-Kupnicka, D., Kordek, R., Buczynski, J., and Liberski, P. P. (2001). Apoptosis in relation to neuronal loss in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, *61*(1), 13-19.
- Johnson, R. T., and Gibbs, C. J., Jr. (1998). Creutzfeldt-Jakob disease and related transmissible spongiform encephalopathies. *The New England Journal of Medicine*, *339*(27), 1994-2004. doi:10.1056/NEJM199812313392707 [doi]

Jones, E. M., and Surewicz, W. K. (2005). Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids. *Cell*, *121*(1), 63-72. doi:S0092-8674(05)00108-X [pii]

Kasai, T., Tokuda, T., Ishii, R., Ishigami, N., Tsuboi, Y., Nakagawa, M., Mizuno, T., and El-Agnaf, O. M. (2014). Increased alpha-synuclein levels in the cerebrospinal fluid of patients with creutzfeldt-jakob disease. *Journal of Neurology*, *261*(6), 1203-1209. doi:10.1007/s00415-014-7334-7 [doi]

Katorcha, E., Makarava, N., Savtchenko, R., D'Azzo, A., and Baskakov, I. V. (2014). Sialylation of prion protein controls the rate of prion amplification, the cross-species barrier, the ratio of PrPSc glycoform and prion infectivity. *PLoS Pathogens*, *10*(9), e1004366. doi:10.1371/journal.ppat.1004366 [doi]

Katz, J. B., Pedersen, J. C., Jenny, A. L., and Taylor, W. D. (1992). Assessment of western immunoblotting for the confirmatory diagnosis of ovine scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *4*(4), 447-449. doi:10.1177/104063879200400414 [doi]

Kercher, L., Favara, C., Striebel, J. F., LaCasse, R., and Chesebro, B. (2007). Prion protein expression differences in microglia and astroglia influence scrapie-induced neurodegeneration in the retina and brain of transgenic mice. *Journal of Virology*, *81*(19), 10340-10351. doi:JVI.00865-07 [pii]

Kim, J. I., Cali, I., Surewicz, K., Kong, Q., Raymond, G. J., Atarashi, R., Race, B., Qing, L., Gambetti, P., Caughey, B., and Surewicz, W. K. (2010). Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(19), 14083-14087. doi:10.1074/jbc.C110.113464 [doi]

Kimberlin, R. H., Cole, S., and Walker, C. A. (1986). Transmissible mink encephalopathy (TME) in chinese hamsters: Identification of two strains of TME and comparisons with scrapie. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *12*(2), 197-206.

Kimberlin, R. H., and Walker, C. A. (1980). Pathogenesis of mouse scrapie: Evidence for neural spread of infection to the CNS. *The Journal of General Virology*, *51*(Pt 1), 183-187. doi:10.1099/0022-1317-51-1-183 [doi]

King, A., Doey, L., Rossor, M., Mead, S., Collinge, J., and Lantos, P. (2003). Phenotypic variability in the brains of a family with a prion disease characterized by a 144-base pair insertion in the prion protein gene. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *29*(2), 98-105. doi:423 [pii]

Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. A., Chesebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P. T., and Caughey, B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature*, *370*(6489), 471-474. doi:10.1038/370471a0 [doi]

- Konold, T., Moore, S. J., Bellworthy, S. J., Terry, L. A., Thorne, L., Ramsay, A., Salguero, F. J., Simmons, M. M., and Simmons, H. A. (2013). Evidence of effective scrapie transmission via colostrum and milk in sheep. *BMC Veterinary Research*, *9*, 99-6148-99. doi:10.1186/1746-6148-9-99 [doi]
- Korth, C., Kaneko, K., and Prusiner, S. B. (2000). Expression of unglycosylated mutated prion protein facilitates PrP(sc) formation in neuroblastoma cells infected with different prion strains. *The Journal of General Virology*, *81*(Pt 10), 2555-2563.
- Krasnianski, A., Meissner, B., Heinemann, U., and Zerr, I. (2004). Clinical findings and diagnostic tests in creutzfeldt-jakob disease and variant creutzfeldt-jakob disease. *Folia Neuropathologica*, *42 Suppl B*, 24-38.
- Kretzschmar, H. A., Neumann, M., and Stavrou, D. (1995). Codon 178 mutation of the human prion protein gene in a german family (backer family): Sequencing data from 72-year-old celloidin-embedded brain tissue. *Acta Neuropathologica*, *89*(1), 96-98.
- Kust, B. M., Brouwer, N., Mantingh, I. J., Boddeke, H. W., and Copray, J. C. (2003). Reduced p75NTR expression delays disease onset only in female mice of a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders : Official Publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases*, *4*(2), 100-105.
- Lacroux, C., Corbiere, F., Tabouret, G., Lugan, S., Costes, P., Mathey, J., Delmas, J. M., Weisbecker, J. L., Foucras, G., Cassard, H., Elsen, J. M., Schelcher, F., and Andreoletti, O. (2007). Dynamics and genetics of PrPSc placental accumulation in sheep. *The Journal of General Virology*, *88*(Pt 3), 1056-1061. doi:88/3/1056 [pii]
- Lacroux, C., Simon, S., Benestad, S. L., Maillet, S., Mathey, J., Lugan, S., Corbiere, F., Cassard, H., Costes, P., Bergonier, D., Weisbecker, J. L., Moldal, T., Simmons, H., Lantier, F., Feraudet-Tarisse, C., Morel, N., Schelcher, F., Grassi, J., and Andreoletti, O. (2008). Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. *PLoS Pathogens*, *4*(12), e1000238. doi:10.1371/journal.ppat.1000238 [doi]
- Lacroux, C., Vilette, D., Fernandez-Borges, N., Litaize, C., Lugan, S., Morel, N., Corbiere, F., Simon, S., Simmons, H., Costes, P., Weisbecker, J. L., Lantier, I., Lantier, F., Schelcher, F., Grassi, J., Castilla, J., and Andreoletti, O. (2012). Prionemia and leukocyte-platelet-associated infectivity in sheep transmissible spongiform encephalopathy models. *Journal of Virology*, *86*(4), 2056-2066. doi:10.1128/JVI.06532-11 [doi]
- Langeveld, J. P., Jacobs, J. G., Erkens, J. H., Bossers, A., van Zijderveld, F. G., and van Keulen, L. J. (2006). Rapid and discriminatory diagnosis of scrapie and BSE in retropharyngeal lymph nodes of sheep. *BMC Veterinary Research*, *2*, 19-6148-2-19. doi:1746-6148-2-19 [pii]
- Le Dur, A., Lai, T. L., Stinnakre, M. G., Laisne, A., Chenais, N., Rakotobe, S., Passet, B., Reine, F., Soulier, S., Herzog, L., Tilly, G., Rezaei, H., Beringue, V., Vilotte, J. L., and

- Laude, H. (2017). Divergent prion strain evolution driven by PrP(C) expression level in transgenic mice. *Nature Communications*, *8*, 14170. doi:10.1038/ncomms14170 [doi]
- Liberski, P. P. (2012). Historical overview of prion diseases: A view from afar. *Folia Neuropathologica*, *50*(1), 1-12. doi:18385 [pii]
- Liberski, P. P., and Brown, P. (2004). Astrocytes in transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases). *Folia Neuropathologica*, *42 Suppl B*, 71-88.
- Liberski, P. P., Sikorska, B., Bratosiewicz-Wasik, J., Gajdusek, D. C., and Brown, P. (2004). Neuronal cell death in transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases) revisited: From apoptosis to autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *36*(12), 2473-2490. doi:10.1016/j.biocel.2004.04.016 [doi]
- Liepinsh, E., Ilag, L. L., Otting, G., and Ibanez, C. F. (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *The EMBO Journal*, *16*(16), 4999-5005. doi:10.1093/emboj/16.16.4999 [doi]
- Ligios, C., Cancedda, G. M., Margalith, I., Santucci, C., Madau, L., Maestrone, C., Basagni, M., Saba, M., and Heikenwalder, M. (2007). Intraepithelial and interstitial deposition of pathological prion protein in kidneys of scrapie-affected sheep. *PLoS One*, *2*(9), e859. doi:10.1371/journal.pone.0000859 [doi]
- Ligios, C., Cancedda, M. G., Carta, A., Santucci, C., Maestrone, C., Demontis, F., Saba, M., Patta, C., DeMartini, J. C., Aguzzi, A., and Sigurdson, C. J. (2011). Sheep with scrapie and mastitis transmit infectious prions through the milk. *Journal of Virology*, *85*(2), 1136-1139. doi:10.1128/JVI.02022-10 [doi]
- Ligios, C., Jeffrey, M., Ryder, S. J., Bellworthy, S. J., and Simmons, M. M. (2002). Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *Journal of Comparative Pathology*, *127*(1), 45-57. doi:S002199750290589X [pii]
- Ligios, C., Sigurdson, C. J., Santucci, C., Carcassola, G., Manco, G., Basagni, M., Maestrone, C., Cancedda, M. G., Madau, L., and Aguzzi, A. (2005a). PrP^{Sc} in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. *Nature Medicine*, *11*(11), 1137-1138. doi:nm1105-1137 [pii]
- Ligios, C., Sigurdson, C. J., Santucci, C., Carcassola, G., Manco, G., Basagni, M., Maestrone, C., Cancedda, M. G., Madau, L., and Aguzzi, A. (2005b). PrP^{Sc} in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. *Nature Medicine*, *11*(11), 1137-1138. doi:nm1105-1137 [pii]
- Linsell, L., Cousens, S. N., Smith, P. G., Knight, R. S., Zeidler, M., Stewart, G., de Silva, R., Esmonde, T. F., Ward, H. J., and Will, R. G. (2004). A case-control study of sporadic creutzfeldt-jakob disease in the united kingdom: Analysis of clustering. *Neurology*, *63*(11), 2077-2083. doi:63/11/2077 [pii]

Locht, C., Chesebro, B., Race, R., and Keith, J. M. (1986). Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(17), 6372-6376.

Longo, F. M., and Massa, S. M. (2013). Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: A strategy for the treatment of neurological disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(7), 507-525.

Lu, B., Pang, P. T., and Woo, N. H. (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(8), 603-614. doi:nrn1726 [pii]

Lucassen, P. J., Williams, A., Chung, W. C., and Fraser, H. (1995). Detection of apoptosis in murine scrapie. *Neuroscience Letters*, 198(3), 185-188. doi:0304394095119959 [pii]

Lyahyai, J., Bolea, R., Serrano, C., Monleon, E., Moreno, C., Osta, R., Zaragoza, P., Badiola, J. J., and Martin-Burriel, I. (2006). Correlation between bax overexpression and prion deposition in medulla oblongata from natural scrapie without evidence of apoptosis. *Acta Neuropathologica*, 112(4), 451-460. doi:10.1007/s00401-006-0094-4 [doi]

Lyahyai, J., Bolea, R., Serrano, C., Vidal, E., Pumarola, M., Badiola, J. J., Zaragoza, P., and Martin-Burriel, I. (2007). Differential expression and protein distribution of bax in natural scrapie. *Brain Research*, 1180, 111-120. doi:S0006-8993(07)02129-4 [pii]

Llewelyn, C. A., Hewitt, P. E., Knight, R. S., Amar, K., Cousens, S., Mackenzie, J., and Will, R. G. (2004). Possible transmission of variant creutzfeldt-jakob disease by blood transfusion. *Lancet*, 363(9407), 417-421. doi:10.1016/S0140-6736(04)15486-X [doi]

Llorens, F., Kruse, N., Karch, A., Schmitz, M., Zafar, S., Gotzmann, N., Sun, T., Kochy, S., Knipper, T., Cramm, M., Golanska, E., Sikorska, B., Liberski, P. P., Sanchez-Valle, R., Fischer, A., Mollenhauer, B., and Zerr, I. (2018). Validation of alpha-synuclein as a CSF biomarker for sporadic creutzfeldt-jakob disease. *Molecular Neurobiology*, 55(3), 2249-2257. doi:10.1007/s12035-017-0479-5 [doi]

Lloyd, S. E., Linehan, J. M., Desbruslais, M., Joiner, S., Buckell, J., Brandner, S., Wadsworth, J. D., and Collinge, J. (2004). Characterization of two distinct prion strains derived from bovine spongiform encephalopathy transmissions to inbred mice. *The Journal of General Virology*, 85(Pt 8), 2471-2478. doi:10.1099/vir.0.79889-0 [doi]

Mabbott, N. A., and Bruce, M. E. (2001). The immunobiology of TSE diseases. *The Journal of General Virology*, 82(Pt 10), 2307-2318. doi:10.1099/0022-1317-82-10-2307 [doi]

Mabbott, N. A., and MacPherson, G. G. (2006). Prions and their lethal journey to the brain. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), 201-211. doi:nrmicro1346 [pii]

MacLea, K. S. (2017). What makes a prion: Infectious proteins from animals to yeast. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 329, 227-276. doi:S1937-6448(16)30081-8 [pii]

Maddison, B. C., Rees, H. C., Baker, C. A., Taema, M., Bellworthy, S. J., Thorne, L., Terry, L. A., and Gough, K. C. (2010). Prions are secreted into the oral cavity in sheep with preclinical scrapie. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(11), 1672-1676. doi:10.1086/652457 [doi]

Maddox, R. A., Belay, E. D., Curns, A. T., Zou, W. Q., Nowicki, S., Lembach, R. G., Geschwind, M. D., Haman, A., Shinozaki, N., Nakamura, Y., Borer, M. J., and Schonberger, L. B. (2008). Creutzfeldt-jakob disease in recipients of corneal transplants. *Cornea*, 27(7), 851-854. doi:10.1097/ICO.0b013e31816a628d [doi]

Madec, J. Y., Belli, P., Calavas, D., and Baron, T. (2000). Efficiency of western blotting for the specific immunodetection of proteinase K-resistant prion protein in BSE diagnosis in france. *The Veterinary Record*, 146(3), 74-76. doi:10.1136/vr.146.3.74 [doi]

Madec, J. Y., Groschup, M. H., Buschmann, A., Belli, P., Calavas, D., and Baron, T. (1998). Sensitivity of the western blot detection of prion protein PrPres in natural sheep scrapie. *Journal of Virological Methods*, 75(2), 169-177. doi:S016609349800113X [pii]

Madec, J. Y., Groschup, M. H., Calavas, D., Junghans, F., and Baron, T. (2000). Protease-resistant prion protein in brain and lymphoid organs of sheep within a naturally scrapie-infected flock. *Microbial Pathogenesis*, 28(6), 353-362. doi:10.1006/mpat.2000.0357 [doi]

Makarava, N., and Baskakov, I. V. (2013). The evolution of transmissible prions: The role of deformed templating. *PLoS Pathogens*, 9(12), e1003759. doi:10.1371/journal.ppat.1003759 [doi]

Makarava, N., Savtchenko, R., and Baskakov, I. V. (2013). Selective amplification of classical and atypical prions using modified protein misfolding cyclic amplification. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(1), 33-41. doi:10.1074/jbc.M112.419531 [doi]

Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klohn, P. C., Brandner, S., and Collinge, J. (2003). Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science*, 302(5646), 871-874. doi:10.1126/science.1090187 [doi]

Mallucci, G. R., Ratte, S., Asante, E. A., Linehan, J., Gowland, I., Jefferys, J. G., and Collinge, J. (2002). Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *The EMBO Journal*, 21(3), 202-210. doi:10.1093/emboj/21.3.202 [doi]

Mallucci, G. R., White, M. D., Farmer, M., Dickinson, A., Khatun, H., Powell, A. D., Brandner, S., Jefferys, J. G., and Collinge, J. (2007). Targeting cellular prion protein

reverses early cognitive deficits and neurophysiological dysfunction in prion-infected mice. *Neuron*, 53(3), 325-335. doi:S0896-6273(07)00008-6 [pii]

Manson, J. C., Jamieson, E., Baybutt, H., Tuzi, N. L., Barron, R., McConnell, I., Somerville, R., Ironside, J., Will, R., Sy, M. S., Melton, D. W., Hope, J., and Bostock, C. (1999). A single amino acid alteration (101L) introduced into murine PrP dramatically alters incubation time of transmissible spongiform encephalopathy. *The EMBO Journal*, 18(23), 6855-6864. doi:10.1093/emboj/18.23.6855 [doi]

Marco-Salazar, P., Marquez, M., Fondevila, D., Rabanal, R. M., Torres, J. M., Pumarola, M., and Vidal, E. (2014). Mapping of neurotrophins and their receptors in the adult mouse brain and their role in the pathogenesis of a transgenic murine model of bovine spongiform encephalopathy. *Journal of Comparative Pathology*, 150(4), 449-462. doi:10.1016/j.jcpa.2013.11.209

Marsh, R. F., Burger, D., Eckroade, R., Zu Rhein, G. M., and Hanson, R. P. (1969). A preliminary report on the experimental host range of the transmissible mink encephalopathy agent. *The Journal of Infectious Diseases*, 120(6), 713-719. doi:10.1093/infdis/120.6.713 [doi]

Mathiason, C. K. (2017). Scrapie, CWD, and transmissible mink encephalopathy. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 150, 267-292. doi:S1877-1173(17)30119-9 [pii]

Mays, C. E., and Soto, C. (2016). The stress of prion disease. *Brain Research*, 1648(Pt B), 553-560. doi:S0006-8993(16)30202-5 [pii]

McBride, P. A., and Beekes, M. (1999). Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie. *Neuroscience Letters*, 265(2), 135-138. doi:S0304-3940(99)00223-2 [pii]

McBride, P. A., Bruce, M. E., and Fraser, H. (1988). Immunostaining of scrapie cerebral amyloid plaques with antisera raised to scrapie-associated fibrils (SAF). *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 14(4), 325-336.

McGuire, L. I., Peden, A. H., Orru, C. D., Wilham, J. M., Appleford, N. E., Mallinson, G., Andrews, M., Head, M. W., Caughey, B., Will, R. G., Knight, R. S., and Green, A. J. (2012). Real time quaking-induced conversion analysis of cerebrospinal fluid in sporadic creutzfeldt-jakob disease. *Annals of Neurology*, 72(2), 278-285. doi:10.1002/ana.23589 [doi]

McKinley, M. P., Bolton, D. C., and Prusiner, S. B. (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell*, 35(1), 57-62. doi:0092-8674(83)90207-6 [pii]

Meeker, R. B., and Williams, K. S. (2015). The p75 neurotrophin receptor: At the crossroad of neural repair and death. *Neural Regeneration Research*, 10(5), 721-725. doi:10.4103/1673-5374.156967 [doi]

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

Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M., Manuelidis, L., and Manuelidis, E. E. (1983). Scrapie-associated fibrils in creutzfeldt-jakob disease. *Nature*, 306(5942), 474-476. doi:10.1038/306474a0 [doi]

Meydan, H., Yuceer, B., Degirmenci, R., Ozkan, M. M., and Yildiz, M. A. (2012). Prion protein gene polymorphism and genetic risk evaluation for scrapie in all turkish native sheep breeds. *Virus Genes*, 45(1), 169-175. doi:10.1007/s11262-012-0744-7 [doi]

Meyne, F., Gloeckner, S. F., Ciesielczyk, B., Heinemann, U., Krasnianski, A., Meissner, B., and Zerr, I. (2009). Total prion protein levels in the cerebrospinal fluid are reduced in patients with various neurological disorders. *Journal of Alzheimer's Disease*, 17(4), 863-873. doi:10.3233/JAD-2009-1110 [doi]

Migheli, A., Cavalla, P., Marino, S., and Schiffer, D. (1994). A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after in situ end-labeling of DNA strand breaks. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 53(6), 606-616. doi:10.1097/00005072-199411000-00008 [doi]

Miller, J. M., Jenny, A. L., Taylor, W. D., Marsh, R. F., Rubenstein, R., and Race, R. E. (1993). Immunohistochemical detection of prion protein in sheep with scrapie. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5(3), 309-316. doi:10.1177/104063879300500301 [doi]

Minikel, E. V., Vallabh, S. M., Lek, M., Estrada, K., Samocha, K. E., Sathirapongsasuti, J. F., McLean, C. Y., Tung, J. Y., Yu, L. P., Gambetti, P., Blevins, J., Zhang, S., Cohen, Y., Chen, W., Yamada, M., Hamaguchi, T., Sanjo, N., Mizusawa, H., Nakamura, Y., Kitamoto, T., Collins, S. J., Boyd, A., Will, R. G., Knight, R., Ponto, C., Zerr, I., Kraus, T. F., Eigenbrod, S., Giese, A., Calero, M., de Pedro-Cuesta, J., Haik, S., Laplanche, J. L., Bouaziz-Amar, E., Brandel, J. P., Capellari, S., Parchi, P., Pologgi, A., Ladogana, A., O'Donnell-Luria, A. H., Karczewski, K. J., Marshall, J. L., Boehnke, M., Laakso, M., Mohlke, K. L., Kahler, A., Chambert, K., McCarroll, S., Sullivan, P. F., Hultman, C. M., Purcell, S. M., Sklar, P., van der Lee, S. J., Rozemuller, A., Jansen, C., Hofman, A., Kraaij, R., van Rooij, J. G., Ikram, M. A., Uitterlinden, A. G., van Duijn, C. M., Exome Aggregation Consortium (ExAC), Daly, M. J., and MacArthur, D. G. (2016). Quantifying prion disease penetrance using large population control cohorts. *Science Translational Medicine*, 8(322), 322ra9. doi:10.1126/scitranslmed.aad5169 [doi]

Mironov, A., Jr, Latawiec, D., Wille, H., Bouzamondo-Bernstein, E., Legname, G., Williamson, R. A., Burton, D., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., and Peters, P. J. (2003). Cytosolic prion protein in neurons. *The Journal of Neuroscience*, 23(18), 7183-7193. doi:23/18/7183 [pii]

Mohan, J., Brown, K. L., Farquhar, C. F., Bruce, M. E., and Mabbott, N. A. (2004). Scrapie transmission following exposure through the skin is dependent on follicular

dendritic cells in lymphoid tissues. *Journal of Dermatological Science*, 35(2), 101-111. doi:10.1016/j.jdermsci.2004.05.005 [doi]

Mohri, S., Farquhar, C. F., Somerville, R. A., Jeffrey, M., Foster, J., and Hope, J. (1992). Immunodetection of a disease specific PrP fraction in scrapie-affected sheep and BSE-affected cattle. *The Veterinary Record*, 131(23), 537-539.

Mok, T., Jaunmuktane, Z., Joiner, S., Campbell, T., Morgan, C., Wakerley, B., Golestani, F., Rudge, P., Mead, S., Jager, H. R., Wadsworth, J. D., Brandner, S., and Collinge, J. (2017). Variant creutzfeldt-jakob disease in a patient with heterozygosity at PRNP codon 129. *The New England Journal of Medicine*, 376(3), 292-294. doi:10.1056/NEJMc1610003 [doi]

Monleon, E., Monzon, M., Hortells, P., Bolea, R., Acin, C., Vargas, F., and Badiola, J. J. (2005). Approaches to scrapie diagnosis by applying immunohistochemistry and rapid tests on central nervous and lymphoreticular systems. *Journal of Virological Methods*, 125(2), 165-171. doi:S0166-0934(05)00025-X [pii]

Moore, R. C., Hope, J., McBride, P. A., McConnell, I., Selfridge, J., Melton, D. W., and Manson, J. C. (1998). Mice with gene targeted prion protein alterations show that prnp, sinc and prni are congruent. *Nature Genetics*, 18(2), 118-125. doi:10.1038/ng0298-118 [doi]

Moser, M., Colello, R. J., Pott, U., and Oesch, B. (1995). Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron*, 14(3), 509-517. doi:0896-6273(95)90307-0 [pii]

Mufson, E. J., and Kordower, J. H. (1992). Cortical neurons express nerve growth factor receptors in advanced age and alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(2), 569-573. doi:10.1073/pnas.89.2.569 [doi]

Neuendorf, E., Weber, A., Saalmueller, A., Schatzl, H., Reifenberg, K., Pfaff, E., and Groschup, M. H. (2004). Glycosylation deficiency at either one of the two glycan attachment sites of cellular prion protein preserves susceptibility to bovine spongiform encephalopathy and scrapie infections. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(51), 53306-53316. doi:10.1074/jbc.M410796200 [doi]

Neutra, M. R., Frey, A., and Kraehenbuhl, J. P. (1996). Epithelial M cells: Gateways for mucosal infection and immunization. *Cell*, 86(3), 345-348. doi:S0092-8674(00)80106-3 [pii]

Nishina, K. A., Deleault, N. R., Mahal, S. P., Baskakov, I., Luhrs, T., Riek, R., and Supattapone, S. (2006). The stoichiometry of host PrPC glycoforms modulates the efficiency of PrPSc formation in vitro. *Biochemistry*, 45(47), 14129-14139. doi:10.1021/bi061526k [doi]

Notari, S., Xiao, X., Espinosa, J. C., Cohen, Y., Qing, L., Aguilar-Calvo, P., Kofskey, D., Cali, I., Cracco, L., Kong, Q., Torres, J. M., Zou, W., and Gambetti, P. (2014). Transmission characteristics of variably protease-sensitive prionopathy. *Emerging Infectious Diseases*, 20(12), 2006-2014. doi:10.3201/eid2012.140548 [doi]

Nykjaer, A., and Willnow, T. E. (2012). Sortilin: A receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends in Neurosciences*, 35(4), 261-270. doi:10.1016/j.tins.2012.01.003 [doi]

Oesch, B., Teplow, D. B., Stahl, N., Serban, D., Hood, L. E., and Prusiner, S. B. (1990). Identification of cellular proteins binding to the scrapie prion protein. *Biochemistry*, 29(24), 5848-5855. doi:10.1021/bi00476a029 [doi]

Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., and Hood, L. E. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 40(4), 735-746. doi:0092-8674(85)90333-2 [pii]

Otto, M., Wiltfang, J., Cepek, L., Neumann, M., Mollenhauer, B., Steinacker, P., Ciesielczyk, B., Schulz-Schaeffer, W., Kretzschmar, H. A., and Poser, S. (2002). Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of creutzfeldt-jakob disease. *Neurology*, 58(2), 192-197. doi:10.1212/wnl.58.2.192 [doi]

Owen, F., Poulter, M., Collinge, J., Leach, M., Lofthouse, R., Crow, T. J., and Harding, A. E. (1992). A dementing illness associated with a novel insertion in the prion protein gene. *Brain Research.Molecular Brain Research*, 13(1-2), 155-157.

Palmer, M. S., Dryden, A. J., Hughes, J. T., and Collinge, J. (1991). Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic creutzfeldt-jakob disease. *Nature*, 352(6333), 340-342. doi:10.1038/352340a0 [doi]

Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., and Cohen, F. E. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(23), 10962-10966. doi:10.1073/pnas.90.23.10962 [doi]

Parchi, P., de Boni, L., Saverioni, D., Cohen, M. L., Ferrer, I., Gambetti, P., Gelpi, E., Giaccone, G., Hauw, J. J., Hoftberger, R., Ironside, J. W., Jansen, C., Kovacs, G. G., Rozemuller, A., Seilhean, D., Tagliavini, F., Giese, A., and Kretzschmar, H. A. (2012). Consensus classification of human prion disease histotypes allows reliable identification of molecular subtypes: An inter-rater study among surveillance centres in europe and USA. *Acta Neuropathologica*, 124(4), 517-529. doi:10.1007/s00401-012-1002-8 [doi]

Parchi, P., Giese, A., Capellari, S., Brown, P., Schulz-Schaeffer, W., Windl, O., Zerr, I., Budka, H., Kopp, N., Piccardo, P., Poser, S., Rojiani, A., Streichemberger, N., Julien, J., Vital, C., Ghetti, B., Gambetti, P., and Kretzschmar, H. (1999). Classification of sporadic

creutzfeldt-jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Annals of Neurology*, 46(2), 224-233.

Pattison, I. H., Gordon, W. S., and Millson, G. C. (1959). Experimental production of scrapie in goats. *Journal of Comparative Pathology*, 69, 300-312.

Pattison, I. H., and Jones, K. M. (1967). The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *The Veterinary Record*, 80(1), 2-9. doi:10.1136/vr.80.1.2 [doi]

Pattison, I. H., and Millson, G. C. (1961). Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *Journal of Comparative Pathology*, 71, 101-109.

Peden, A. H., Head, M. W., Ritchie, D. L., Bell, J. E., and Ironside, J. W. (2004). Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet*, 364(9433), 527-529. doi:10.1016/S0140-6736(04)16811-6 [doi]

Peden, A. H., Sarode, D. P., Mulholland, C. R., Barria, M. A., Ritchie, D. L., Ironside, J. W., and Head, M. W. (2014). The prion protein protease sensitivity, stability and seeding activity in variably protease sensitive prionopathy brain tissue suggests molecular overlaps with sporadic creutzfeldt-jakob disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 2, 152-014-0152-4. doi:10.1186/s40478-014-0152-4 [doi]

Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M. R., Castellanos, R., Viera, L., Beckman, J. S., Estevez, A. G., and Barbeito, L. (2004). Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 89(2), 464-473. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02357.x [doi]

Perez, D. R., Damberger, F. F., and Wuthrich, K. (2010). Horse prion protein NMR structure and comparisons with related variants of the mouse prion protein. *Journal of Molecular Biology*, 400(2), 121-128. doi:10.1016/j.jmb.2010.04.066 [doi]

Peters, P. J., Mironov, A., Jr, Peretz, D., van Donselaar, E., Leclerc, E., Erpel, S., DeArmond, S. J., Burton, D. R., Williamson, R. A., Vey, M., and Prusiner, S. B. (2003). Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *The Journal of Cell Biology*, 162(4), 703-717. doi:10.1083/jcb.200304140 [doi]

Piccardo, P., Manson, J. C., King, D., Ghetti, B., and Barron, R. M. (2007). Accumulation of prion protein in the brain that is not associated with transmissible disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11), 4712-4717. doi:0609241104 [pii]

Pirisinu, L., Di Bari, M. A., D'Agostino, C., Marcon, S., Riccardi, G., Poleggi, A., Cohen, M. L., Appleby, B. S., Gambetti, P., Ghetti, B., Agrimi, U., and Nonno, R. (2016). Gerstmann-straussler-scheinker disease subtypes efficiently transmit in bank voles as genuine prion diseases. *Scientific Reports*, 6, 20443. doi:10.1038/srep20443 [doi]

Pirisinu, L., Nonno, R., Esposito, E., Benestad, S. L., Gambetti, P., Agrimi, U., and Zou, W. Q. (2013). Small ruminant nor98 prions share biochemical features with human gerstmann-straussler-scheinker disease and variably protease-sensitive prionopathy. *PLoS One*, 8(6), e66405. doi:10.1371/journal.pone.0066405 [doi]

Porter, D. D., Porter, H. G., and Cox, N. A. (1973). Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice. *Journal of Immunology*, 111(5), 1407-1410.

Prinz, M., Heikenwalder, M., Junt, T., Schwarz, P., Glatzel, M., Heppner, F. L., Fu, Y. X., Lipp, M., and Aguzzi, A. (2003). Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. *Nature*, 425(6961), 957-962. doi:10.1038/nature02072 [doi]

Priola, S. A. (1999). Prion protein and species barriers in the transmissible spongiform encephalopathies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 53(1), 27-33. doi:S0753332299800572 [pii]

Priola, S. A., and Lawson, V. A. (2001). Glycosylation influences cross-species formation of protease-resistant prion protein. *The EMBO Journal*, 20(23), 6692-6699. doi:10.1093/emboj/20.23.6692 [doi]

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

Prusiner, S. B. (1989). Scrapie prions. *Annual Review of Microbiology*, 43, 345-374. doi:10.1146/annurev.mi.43.100189.002021 [doi]

Prusiner, S. B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science*, 252(5012), 1515-1522.

Prusiner, S. B. (2013). Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annual Review of Genetics*, 47, 601-623. doi:10.1146/annurev-genet-110711-155524 [doi]

Prusiner, S. B., Bolton, D. C., Groth, D. F., Bowman, K. A., Cochran, S. P., and McKinley, M. P. (1982). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry*, 21(26), 6942-6950. doi:10.1021/bi00269a050 [doi]

Prusiner, S. B., Groth, D. F., Cochran, S. P., McKinley, M. P., and Masiarz, F. R. (1980). Gel electrophoresis and glass permeation chromatography of the hamster scrapie agent after enzymatic digestion and detergent extraction. *Biochemistry*, 19(21), 4892-4898. doi:10.1021/bi00562a029 [doi]

Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Bolton, D. C., Bendheim, P. E., Groth, D. F., and Glenner, G. G. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*, 35(2 Pt 1), 349-358. doi:0092-8674(83)90168-X [pii]

Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Groth, D. F., Bowman, K. A., Mock, N. I., Cochran, S. P., and Masiarz, F. R. (1981). Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(11), 6675-6679. doi:10.1073/pnas.78.11.6675 [doi]

Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D., and Carlson, G. A. (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, 63(4), 673-686. doi:0092-8674(90)90134-Z [pii]

Prusiner, S. B., and Scott, M. R. (1997). Genetics of prions. *Annual Review of Genetics*, 31, 139-175. doi:10.1146/annurev.genet.31.1.139

Race, R., Jenny, A., and Sutton, D. (1998). Scrapie infectivity and proteinase K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node: Implications for transmission and antemortem diagnosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 178(4), 949-953. doi:10.1086/515669 [doi]

Race, R., Oldstone, M., and Chesebro, B. (2000). Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: Role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *Journal of Virology*, 74(2), 828-833. doi:10.1128/jvi.74.2.828-833.2000 [doi]

Raeber, A. J., Race, R. E., Brandner, S., Priola, S. A., Sailer, A., Bessen, R. A., Mucke, L., Manson, J., Aguzzi, A., Oldstone, M. B., Weissmann, C., and Chesebro, B. (1997). Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP knockout mice susceptible to hamster scrapie. *The EMBO Journal*, 16(20), 6057-6065. doi:10.1093/emboj/16.20.6057 [doi]

Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R., and Wuthrich, K. (1997). NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Letters*, 413(2), 282-288. doi:S0014-5793(97)00920-4 [pii]

Robakis, N. K., Devine-Gage, E. A., Jenkins, E. C., Kascsak, R. J., Brown, W. T., Krawczun, M. S., and Silverman, W. P. (1986). Localization of a human gene homologous to the PrP gene on the p arm of chromosome 20 and detection of PrP-related antigens in normal human brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 140(2), 758-765. doi:0006-291X(86)90796-5 [pii]

Rogers, D. R. (1965). Screening for amyloid with the thioflavin-T fluorescent method. *American Journal of Clinical Pathology*, 44, 59-61. doi:10.1093/ajcp/44.1.59 [doi]

Roucou, X., Guo, Q., Zhang, Y., Goodyer, C. G., and LeBlanc, A. C. (2003). Cytosolic prion protein is not toxic and protects against bax-mediated cell death in human primary neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 40877-40881. doi:10.1074/jbc.M306177200 [doi]

Rubenstein, R., Chang, B., Gray, P., Piltch, M., Bulgin, M. S., Sorensen-Melson, S., and Miller, M. W. (2011). Prion disease detection, PMCA kinetics, and IgG in urine from sheep naturally/experimentally infected with scrapie and deer with preclinical/clinical chronic wasting disease. *Journal of Virology*, 85(17), 9031-9038. doi:10.1128/JVI.05111-11 [doi]

Rudd, P. M., Endo, T., Colominas, C., Groth, D., Wheeler, S. F., Harvey, D. J., Wormald, M. R., Serban, H., Prusiner, S. B., Kobata, A., and Dwek, R. A. (1999). Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(23), 13044-13049.

Ryan, A. M., and Womack, J. E. (1993). Somatic cell mapping of the bovine prion protein gene and restriction fragment length polymorphism studies in cattle and sheep. *Animal Genetics*, 24(1), 23-26.

Ryder, S. J., Dexter, G. E., Heasman, L., Warner, R., and Moore, S. J. (2009). Accumulation and dissemination of prion protein in experimental sheep scrapie in the natural host. *BMC Veterinary Research*, 5, 9-6148-5-9. doi:10.1186/1746-6148-5-9 [doi]

Ryder, S. J., Spencer, Y. I., Bellerby, P. J., and March, S. A. (2001). Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: The spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. *The Veterinary Record*, 148(1), 7-13. doi:10.1136/vr.148.1.7 [doi]

Saá, P., Castilla, J., and Soto, C. (2006a). Presymptomatic detection of prions in blood. *Science*, 313(5783), 92-94. doi:313/5783/92 [pii]

Saá, P., Castilla, J., and Soto, C. (2006b). Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(46), 35245-35252. doi:M603964200 [pii]

Saborio, G. P., Permanne, B., and Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, 411(6839), 810-813. doi:10.1038/35081095 [doi]

Safar, J. G. (2012). Molecular pathogenesis of sporadic prion diseases in man. *Prion*, 6(2), 108-115. doi:10.4161/pri.18666 [doi]

Safar, J. G., Lessard, P., Tamguney, G., Freyman, Y., Deering, C., Letessier, F., Dearmond, S. J., and Prusiner, S. B. (2008). Transmission and detection of prions in feces. *The Journal of Infectious Diseases*, 198(1), 81-89. doi:10.1086/588193 [doi]

Sailer, A., Bueler, H., Fischer, M., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1994). No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell*, 77(7), 967-968. doi:0092-8674(94)90436-7 [pii]

Salazar, E., Monleon, E., Bolea, R., Acin, C., Perez, M., Alvarez, N., Leginagoikoa, I., Juste, R., Minguíjon, E., Reina, R., Glaria, I., Berriatua, E., de Andres, D., Badiola, J. J., Amorena, B., and Lujan, L. (2010). Detection of PrPSc in lung and mammary gland is favored by the presence of visna/maedi virus lesions in naturally coinfecting sheep. *Veterinary Research*, *41*(5), 58. doi:10.1051/vetres/2010030 [doi]

Sanchez-Juan, P., Green, A., Ladogana, A., Cuadrado-Corrales, N., Saanchez-Valle, R., Mitrova, E., Stoeck, K., Sklaviadis, T., Kulczycki, J., Hess, K., Bodemer, M., Slivarichova, D., Saiz, A., Calero, M., Ingrosso, L., Knight, R., Janssens, A. C., van Duijn, C. M., and Zerr, I. (2006). CSF tests in the differential diagnosis of creutzfeldt-jakob disease. *Neurology*, *67*(4), 637-643. doi:67/4/637 [pii]

Sasaki, A., Hirato, J., and Nakazato, Y. (1993). Immunohistochemical study of microglia in the creutzfeldt-jakob diseased brain. *Acta Neuropathologica*, *86*(4), 337-344.

Scott, M., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., Walchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S. J., Westaway, D., and Prusiner, S. B. (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell*, *59*(5), 847-857. doi:0092-8674(89)90608-9 [pii]

Scott, M., Groth, D., Foster, D., Torchia, M., Yang, S. L., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1993). Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell*, *73*(5), 979-988. doi:0092-8674(93)90275-U [pii]

Scott, M. R., Groth, D., Tatzelt, J., Torchia, M., Tremblay, P., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1997). Propagation of prion strains through specific conformers of the prion protein. *Journal of Virology*, *71*(12), 9032-9044.

Scott, M. R., Peretz, D., Nguyen, H. O., Dearmond, S. J., and Prusiner, S. B. (2005). Transmission barriers for bovine, ovine, and human prions in transgenic mice. *Journal of Virology*, *79*(9), 5259-5271. doi:79/9/5259 [pii]

Scott, M. R., Will, R., Ironside, J., Nguyen, H. O., Tremblay, P., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1999). Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(26), 15137-15142. doi:10.1073/pnas.96.26.15137 [doi]

Schmitz, M., Ebert, E., Stoeck, K., Karch, A., Collins, S., Calero, M., Sklaviadis, T., Laplanche, J. L., Golanska, E., Baldeiras, I., Satoh, K., Sanchez-Valle, R., Ladogana, A., Skinningsrud, A., Hammarin, A. L., Mitrova, E., Llorens, F., Kim, Y. S., Green, A., and Zerr, I. (2016). Validation of 14-3-3 protein as a marker in sporadic creutzfeldt-jakob disease diagnostic. *Molecular Neurobiology*, *53*(4), 2189-2199. doi:10.1007/s12035-015-9167-5 [doi]

Segal, R. A. (2003). Selectivity in neurotrophin signaling: Theme and variations. *Annual Review of Neuroscience*, *26*, 299-330. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131421 [doi]

Serrano, C., Hammouchi, M., Benomar, A., Lyahyai, J., Ranera, B., Acin, C., el Hamidi, M., Monzon, M., Badiola, J. J., Tligui, N., Zaragoza, P., and Martin-Burriel, I. (2009). PRNP haplotype distribution in moroccan goats. *Animal Genetics*, 40(4), 565-568. doi:10.1111/j.1365-2052.2009.01873.x [doi]

Serrano, C., Martin-Burriel, I., Lyahyai, J., Monzon, M., El Hamidi, M., Acin, C., Badiola, J. J., Tligui, N., and Zaragoza, P. (2007). Polymorphisms of the PRNP gene in moroccan sheep breeds. *The Veterinary Record*, 161(15), 524-525. doi:161/15/524 [pii]

Sheleby-Elías, J. (2014). Caracterización de cepas priónicas de ovinos afectados por scrapie mediante bioensayos en roedores (tesis doctoral). *Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España*.

Shepherd, S. R., Chataway, T., Schultz, D. W., Rush, R. A., and Rogers, M. L. (2014). The extracellular domain of neurotrophin receptor p75 as a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *PloS One*, 9(1), e87398. doi:10.1371/journal.pone.0087398 [doi]

Shu, Y. H., Lu, X. M., Wei, J. X., Xiao, L., and Wang, Y. T. (2015). Update on the role of p75NTR in neurological disorders: A novel therapeutic target. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 76, 17-23. doi:10.1016/j.biopha.2015.10.010 [doi]

Sigurdson, C. J., Nilsson, K. P., Hornemann, S., Heikenwalder, M., Manco, G., Schwarz, P., Ott, D., Rulicke, T., Liberski, P. P., Julius, C., Falsig, J., Stitz, L., Wuthrich, K., and Aguzzi, A. (2009). De novo generation of a transmissible spongiform encephalopathy by mouse transgenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(1), 304-309. doi:10.1073/pnas.0810680105 [doi]

Silva, C. J., Vazquez-Fernandez, E., Onisko, B., and Requena, J. R. (2015). Proteinase K and the structure of PrPSc: The good, the bad and the ugly. *Virus Research*, 207, 120-126. doi:10.1016/j.virusres.2015.03.008 [doi]

Silveira, J. R., Raymond, G. J., Hughson, A. G., Race, R. E., Sim, V. L., Hayes, S. F., and Caughey, B. (2005). The most infectious prion protein particles. *Nature*, 437(7056), 257-261. doi:nature03989 [pii]

Siso, S., Gonzalez, L., and Jeffrey, M. (2010). Neuroinvasion in prion diseases: The roles of ascending neural infection and blood dissemination. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2010, 747892. doi:10.1155/2010/747892 [doi]

Siso, S., Jeffrey, M., and Gonzalez, L. (2009). Neuroinvasion in sheep transmissible spongiform encephalopathies: The role of the haematogenous route. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 35(3), 232-246. doi:10.1111/j.1365-2990.2008.00978.x [doi]

Siso, S., Jeffrey, M., Steele, P., McGovern, G., Martin, S., Finlayson, J., Chianini, F., and Gonzalez, L. (2008). Occurrence and cellular localization of PrPd in kidneys of scrapie-affected sheep in the absence of inflammation. *The Journal of Pathology*, 215(2), 126-134. doi:10.1002/path.2336 [doi]

- Smith, K. S., Rush, R. A., and Rogers, M. L. (2015). Characterization and changes in neurotrophin receptor p75-expressing motor neurons in SOD1(G93A) G1H mice [corrected]. *The Journal of Comparative Neurology*, 523(11), 1664-1682. doi:10.1002/cne.23763 [doi]
- Somerville, R. A., Birkett, C. R., Farquhar, C. F., Hunter, N., Goldmann, W., Dornan, J., Grover, D., Hennion, R. M., Percy, C., Foster, J., and Jeffrey, M. (1997). Immunodetection of PrPSc in spleens of some scrapie-infected sheep but not BSE-infected cows. *The Journal of General Virology*, 78 (Pt 9)(Pt 9), 2389-2396. doi:10.1099/0022-1317-78-9-2389 [doi]
- Somerville, R. A., Chong, A., Mulqueen, O. U., Birkett, C. R., Wood, S. C., and Hope, J. (1997). Biochemical typing of scrapie strains. *Nature*, 386(6625), 564. doi:10.1038/386564a0 [doi]
- Somerville, R. A., Hamilton, S., and Fernie, K. (2005). Transmissible spongiform encephalopathy strain, PrP genotype and brain region all affect the degree of glycosylation of PrPSc. *The Journal of General Virology*, 86(Pt 1), 241-246. doi:86/1/241 [pii]
- Soto, C. (2012). Transmissible proteins: Expanding the prion heresy. *Cell*, 149(5), 968-977. doi:10.1016/j.cell.2012.05.007 [doi]
- Spagnolli, G., Rigoli, M., Orioli, S., Sevillano, A. M., Faccioli, P., Wille, H., Biasini, E., and Requena, J. R. (2019). Full atomistic model of prion structure and conversion. *PLoS Pathogens*, 15(7), e1007864. doi:10.1371/journal.ppat.1007864 [doi]
- Sparkes, R. S., Simon, M., Cohn, V. H., Fournier, R. E., Lem, J., Klisak, I., Heinzmann, C., Blatt, C., Lucero, M., and Mohandas, T. (1986). Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(19), 7358-7362. doi:10.1073/pnas.83.19.7358 [doi]
- Spiropoulos, J., Lockey, R., Sallis, R. E., Terry, L. A., Thorne, L., Holder, T. M., Beck, K. E., and Simmons, M. M. (2011). Isolation of prion with BSE properties from farmed goat. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12), 2253-2261. doi:10.3201/eid1712.110333 [doi]
- Spitzbarth, I., Cana, A., Hahn, K., Hansmann, F., and Baumgartner, W. (2015). Associated occurrence of p75 neurotrophin receptor expressing aldynoglia and microglia/macrophages in long term organotypic murine brain slice cultures. *Brain Research*, 1595, 29-42. doi:10.1016/j.brainres.2014.11.027 [doi]
- Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K., and Prusiner, S. B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*, 51(2), 229-240. doi:0092-8674(87)90150-4 [pii]
- Supattapone, S., Bosque, P., Muramoto, T., Wille, H., Aagaard, C., Peretz, D., Nguyen, H. O., Heinrich, C., Torchia, M., Safar, J., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B.,

and Scott, M. (1999). Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell*, *96*(6), 869-878. doi:S0092-8674(00)80596-6 [pii]

Takada, L. T., Kim, M. O., Cleveland, R. W., Wong, K., Forner, S. A., Gala, I. I., Fong, J. C., and Geschwind, M. D. (2017). Genetic prion disease: Experience of a rapidly progressive dementia center in the united states and a review of the literature. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics*, *174*(1), 36-69. doi:10.1002/ajmg.b.32505 [doi]

Taniuchi, M., Clark, H. B., and Johnson, E. M., Jr. (1986). Induction of nerve growth factor receptor in schwann cells after axotomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(11), 4094-4098. doi:10.1073/pnas.83.11.4094 [doi]

Tateishi, J., Kitamoto, T., Hoque, M. Z., and Furukawa, H. (1996). Experimental transmission of creutzfeldt-jakob disease and related diseases to rodents. *Neurology*, *46*(2), 532-537.

Taylor, D. M., McConnell, I., and Fraser, H. (1996). Scrapie infection can be established readily through skin scarification in immunocompetent but not immunodeficient mice. *The Journal of General Virology*, *77* (Pt 7)(Pt 7), 1595-1599. doi:10.1099/0022-1317-77-7-1595 [doi]

Telling, G. C., Haga, T., Torchia, M., Tremblay, P., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1996). Interactions between wild-type and mutant prion proteins modulate neurodegeneration in transgenic mice. *Genes & Development*, *10*(14), 1736-1750.

Telling, G. C., Parchi, P., DeArmond, S. J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P., and Prusiner, S. B. (1996). Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science*, *274*(5295), 2079-2082.

Teng, K. K., Felice, S., Kim, T., and Hempstead, B. L. (2010). Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. *Developmental Neurobiology*, *70*(5), 350-359. doi:10.1002/dneu.20768 [doi]

Terry, L. A., Howells, L., Bishop, K., Baker, C. A., Everest, S., Thorne, L., Maddison, B. C., and Gough, K. C. (2011). Detection of prions in the faeces of sheep naturally infected with classical scrapie. *Veterinary Research*, *42*, 65-9716-42-65. doi:10.1186/1297-9716-42-65 [doi]

Terry, L. A., Howells, L., Hawthorn, J., Edwards, J. C., Moore, S. J., Bellworthy, S. J., Simmons, H., Lizano, S., Estey, L., Leathers, V., and Everest, S. J. (2009). Detection of PrPsc in blood from sheep infected with the scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *Journal of Virology*, *83*(23), 12552-12558. doi:10.1128/JVI.00311-09 [doi]

- Thackray, A. M., Hopkins, L., Lockey, R., Spiropoulos, J., and Bujdoso, R. (2011). Emergence of multiple prion strains from single isolates of ovine scrapie. *The Journal of General Virology*, 92(Pt 6), 1482-1491. doi:10.1099/vir.0.028886-0 [doi]
- Thackray, A. M., Hopkins, L., Lockey, R., Spiropoulos, J., and Bujdoso, R. (2012). Propagation of ovine prions from "poor" transmitter scrapie isolates in ovine PrP transgenic mice. *Experimental and Molecular Pathology*, 92(1), 167-174. doi:10.1016/j.yexmp.2011.11.004 [doi]
- Thackray, A. M., Hopkins, L., Spiropoulos, J., and Bujdoso, R. (2008). Molecular and transmission characteristics of primary-passaged ovine scrapie isolates in conventional and ovine PrP transgenic mice. *Journal of Virology*, 82(22), 11197-11207. doi:10.1128/JVI.01454-08 [doi]
- Thackray, A. M., Lockey, R., Beck, K. E., Spiropoulos, J., and Bujdoso, R. (2012). Evidence for co-infection of ovine prion strains in classical scrapie isolates. *Journal of Comparative Pathology*, 147(2-3), 316-329. doi:10.1016/j.jcpa.2012.01.009 [doi]
- Thadani, V., Penar, P. L., Partington, J., Kalb, R., Janssen, R., Schonberger, L. B., Rabkin, C. S., and Prichard, J. W. (1988). Creutzfeldt-jakob disease probably acquired from a cadaveric dura mater graft. case report. *Journal of Neurosurgery*, 69(5), 766-769. doi:10.3171/jns.1988.69.5.0766 [doi]
- Thompson, A. G. B., and Mead, S. H. (2019). Review: Fluid biomarkers in the human prion diseases. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 97, 81-92. doi:S1044-7431(18)30341-5 [pii]
- Thorne, L., and Terry, L. A. (2008). In vitro amplification of PrPSc derived from the brain and blood of sheep infected with scrapie. *The Journal of General Virology*, 89(Pt 12), 3177-3184. doi:10.1099/vir.0.2008/004226-0 [doi]
- Tixador, P., Herzog, L., Reine, F., Jaumain, E., Chapuis, J., Le Dur, A., Laude, H., and Beringue, V. (2010). The physical relationship between infectivity and prion protein aggregates is strain-dependent. *PLoS Pathogens*, 6(4), e1000859. doi:10.1371/journal.ppat.1000859 [doi]
- Torres, J. M., Andreoletti, O., Lacroux, C., Prieto, I., Lorenzo, P., Larska, M., Baron, T., and Espinosa, J. C. (2011). Classical bovine spongiform encephalopathy by transmission of H-type prion in homologous prion protein context. *Emerging Infectious Diseases*, 17(9), 1636-1644. doi:10.3201/eid1709.101403 [doi]
- Torres, J. M., Espinosa, J. C., Aguilar-Calvo, P., Herva, M. E., Relano-Gines, A., Villa-Diaz, A., Morales, M., Parra, B., Alamillo, E., Brun, A., Castilla, J., Molina, S., Hawkins, S. A., and Andreoletti, O. (2014). Elements modulating the prion species barrier and its passage consequences. *PloS One*, 9(3), e89722. doi:10.1371/journal.pone.0089722 [doi]

- Tuo, W., O'Rourke, K. I., Zhuang, D., Cheevers, W. P., Spraker, T. R., and Knowles, D. P. (2002). Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrP^{Sc} accumulation in placentomes of scrapie-infected sheep. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9), 6310-6315. doi:10.1073/pnas.072071199 [doi]
- Turk, E., Teplow, D. B., Hood, L. E., and Prusiner, S. B. (1988). Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *European Journal of Biochemistry*, 176(1), 21-30. doi:10.1111/j.1432-1033.1988.tb14246.x [doi]
- Tuzi, N. L., Cancellotti, E., Baybutt, H., Blackford, L., Bradford, B., Plinston, C., Coghill, A., Hart, P., Piccardo, P., Barron, R. M., and Manson, J. C. (2008). Host PrP glycosylation: A major factor determining the outcome of prion infection. *PLoS Biology*, 6(4), e100. doi:10.1371/journal.pbio.0060100 [doi]
- v Eitzen, U., Egensperger, R., Kosel, S., Grasbon-Frodl, E. M., Imai, Y., Bise, K., Kohsaka, S., Mehraein, P., and Graeber, M. B. (1998). Microglia and the development of spongiform change in creutzfeldt-jakob disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 57(3), 246-256. doi:10.1097/00005072-199803000-00006 [doi]
- Vaccari, G., Di Bari, M. A., Morelli, L., Nonno, R., Chiappini, B., Antonucci, G., Marcon, S., Esposito, E., Fazzi, P., Palazzini, N., Troiano, P., Petrella, A., Di Guardo, G., and Agrimi, U. (2006). Identification of an allelic variant of the goat PrP gene associated with resistance to scrapie. *The Journal of General Virology*, 87(Pt 5), 1395-1402. doi:87/5/1395 [pii]
- van Keulen, L. J., Schreuder, B. E., Meloen, R. H., Mooij-Harkes, G., Vromans, M. E., and Langeveld, J. P. (1996). Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5), 1228-1231.
- van Keulen, L. J., Schreuder, B. E., Vromans, M. E., Langeveld, J. P., and Smits, M. A. (1999). Scrapie-associated prion protein in the gastrointestinal tract of sheep with natural scrapie. *Journal of Comparative Pathology*, 121(1), 55-63. doi:10.1053/jcpa.1998.0300 [doi]
- van Keulen, L. J., Vromans, M. E., and van Zijderveld, F. G. (2002). Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica*, 110(1), 23-32.
- Vargas, F., Lujan, L., Bolea, R., Monleon, E., Martin-Burriel, I., Fernandez, A., De Blas, I., and Badiola, J. J. (2006). Detection and clinical evolution of scrapie in sheep by 3rd eyelid biopsy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(1), 187-193. doi:10.1892/0891-6640(2006)20[187:daceos]2.0.co;2 [doi]
- Vascellari, M., Nonno, R., Mutinelli, F., Bigolaro, M., Di Bari, M. A., Melchioni, E., Marcon, S., D'Agostino, C., Vaccari, G., Conte, M., De Grossi, L., Rosone, F., Giordani, F.,

- and Agrimi, U. (2007). PrPSc in salivary glands of scrapie-affected sheep. *Journal of Virology*, *81*(9), 4872-4876. doi:JV1.02148-06 [pii]
- Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S. J., Smart, E. J., Anderson, R. G., Taraboulos, A., and Prusiner, S. B. (1996). Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(25), 14945-14949.
- Vidal, E., Fernandez-Borges, N., Pintado, B., Erana, H., Ordonez, M., Marquez, M., Chianini, F., Fondevila, D., Sanchez-Martin, M. A., Andreoletti, O., Dagleish, M. P., Pumarola, M., and Castilla, J. (2015). Transgenic mouse bioassay: Evidence that rabbits are susceptible to a variety of prion isolates. *PLoS Pathogens*, *11*(8), e1004977. doi:10.1371/journal.ppat.1004977 [doi]
- Vidal, E., Fernandez-Borges, N., Pintado, B., Ordonez, M., Marquez, M., Fondevila, D., Torres, J. M., Pumarola, M., and Castilla, J. (2013). Bovine spongiform encephalopathy induces misfolding of alleged prion-resistant species cellular prion protein without altering its pathobiological features. *The Journal of Neuroscience*, *33*(18), 7778-7786. doi:10.1523/JNEUROSCI.0244-13.2013 [doi]
- Vilotte, J. L., Soulier, S., Essalmani, R., Stinnakre, M. G., Vaiman, D., Lepourry, L., Da Silva, J. C., Besnard, N., Dawson, M., Buschmann, A., Groschup, M., Petit, S., Madelaine, M. F., Rakatobe, S., Le Dur, A., Vilette, D., and Laude, H. (2001). Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *Journal of Virology*, *75*(13), 5977-5984. doi:10.1128/JVI.75.13.5977-5984.2001 [doi]
- Vital, C., Gray, F., Vital, A., Parchi, P., Capellari, S., Petersen, R. B., Ferrer, X., Jarnier, D., Julien, J., and Gambetti, P. (1998). Prion encephalopathy with insertion of octapeptide repeats: The number of repeats determines the type of cerebellar deposits. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *24*(2), 125-130.
- Vulin, J., Beck, K. E., Bencsik, A., Lakhdar, L., Spiropoulos, J., and Baron, T. (2012). Selection of distinct strain phenotypes in mice infected by ovine natural scrapie isolates similar to CH1641 experimental scrapie. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *71*(2), 140-147. doi:10.1097/NEN.0b013e3182439519 [doi]
- Wang, F., Wang, X., and Ma, J. (2011). Conversion of bacterially expressed recombinant prion protein. *Methods*, *53*(3), 208-213. doi:10.1016/j.ymeth.2010.12.013 [doi]
- Wang, F., Wang, X., Yuan, C. G., and Ma, J. (2010). Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science*, *327*(5969), 1132-1135. doi:10.1126/science.1183748 [doi]
- Wang, T. T., Tian, C., Sun, J., Wang, H., Zhang, B. Y., Chen, C., Wang, J., Xiao, K., Chen, L. N., Lv, Y., Gao, C., Shi, Q., Xin, Y., and Dong, X. P. (2016). Down-regulation of brain-derived neurotrophic factor and its signaling components in the brain tissues of scrapie

experimental animals. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *79*, 318-326. doi:S1357-2725(16)30250-3 [pii]

Wang, Z., Yuan, J., Shen, P., Abskharon, R., Lang, Y., Dang, J., Adornato, A., Xu, L., Chen, J., Feng, J., Moudjou, M., Kitamoto, T., Lee, H. G., Kim, Y. S., Langeveld, J., Appleby, B., Ma, J., Kong, Q., Petersen, R. B., Zou, W. Q., and Cui, L. (2019). In vitro seeding activity of glycoform-deficient prions from variably protease-sensitive prionopathy and familial CJD associated with PrP(V180I) mutation. *Molecular Neurobiology*, *56*(8), 5456-5469. doi:10.1007/s12035-018-1459-0 [doi]

Watts, J. C., Giles, K., Patel, S., Oehler, A., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (2014). Evidence that bank vole PrP is a universal acceptor for prions. *PLoS Pathogens*, *10*(4), e1003990. doi:10.1371/journal.ppat.1003990 [doi]

Weis, C., Marksteiner, J., and Humpel, C. (2001). Nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factor restore the cholinergic neuronal phenotype in organotypic brain slices of the basal nucleus of meynert. *Neuroscience*, *102*(1), 129-138. doi:S0306-4522(00)00452-8 [pii]

Weissmann, C., Bueler, H., Fischer, M., Sailer, A., Aguzzi, A., and Aguet, M. (1994). PrP-deficient mice are resistant to scrapie. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *724*, 235-240. doi:10.1111/j.1749-6632.1994.tb38913.x [doi]

Wells, G. A., Hancock, R. D., Cooley, W. A., Richards, M. S., Higgins, R. J., and David, G. P. (1989). Bovine spongiform encephalopathy: Diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata. *The Veterinary Record*, *125*(21), 521-524. doi:10.1136/vr.125.21.521 [doi]

Wells, G. A., and McGill, I. S. (1992). Recently described scrapie-like encephalopathies of animals: Case definitions. *Research in Veterinary Science*, *53*(1), 1-10. doi:0034-5288(92)90076-E [pii]

Wells, G. A., and Wilesmith, J. W. (1995). The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathology*, *5*(1), 91-103.

Westaway, D., Cooper, C., Turner, S., Da Costa, M., Carlson, G. A., and Prusiner, S. B. (1994). Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(14), 6418-6422. doi:10.1073/pnas.91.14.6418 [doi]

Westaway, D., Goodman, P. A., Mirenda, C. A., McKinley, M. P., Carlson, G. A., and Prusiner, S. B. (1987). Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell*, *51*(4), 651-662. doi:0092-8674(87)90134-6 [pii]

Will, R. G., Cousens, S. N., Farrington, C. P., Smith, P. G., Knight, R. S., and Ironside, J. W. (1999). Deaths from variant creutzfeldt-jakob disease. *Lancet*, *353*(9157), 979-6736(99)01160-5. doi:S0140673699011605 [pii]

- Williams, A., Lucassen, P. J., Ritchie, D., and Bruce, M. (1997). PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Experimental Neurology*, *144*(2), 433-438. doi:S0014-4886(97)96424-4 [pii]
- Williams, A., Van Dam, A. M., Ritchie, D., Eikelenboom, P., and Fraser, H. (1997). Immunocytochemical appearance of cytokines, prostaglandin E2 and lipocortin-1 in the CNS during the incubation period of murine scrapie correlates with progressive PrP accumulations. *Brain Research*, *754*(1-2), 171-180. doi:S0006-8993(97)00067-X [pii]
- Wiseman, F. K., Cancellotti, E., Piccardo, P., Iremonger, K., Boyle, A., Brown, D., Ironside, J. W., Manson, J. C., and Diack, A. B. (2015). The glycosylation status of PrPC is a key factor in determining transmissible spongiform encephalopathy transmission between species. *Journal of Virology*, *89*(9), 4738-4747. doi:10.1128/JVI.02296-14 [doi]
- Wood, J. L., McGill, I. S., Done, S. H., and Bradley, R. (1997). Neuropathology of scrapie: A study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *The Veterinary Record*, *140*(7), 167-174.
- Wroe, S. J., Pal, S., Siddique, D., Hyare, H., Macfarlane, R., Joiner, S., Linehan, J. M., Brandner, S., Wadsworth, J. D., Hewitt, P., and Collinge, J. (2006). Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant creutzfeldt-jakob disease associated with blood transfusion: A case report. *Lancet*, *368*(9552), 2061-2067. doi:S0140-6736(06)69835-8 [pii]
- Yokoyama, T., Masujin, K., Schmerr, M. J., Shu, Y., Okada, H., Iwamaru, Y., Imamura, M., Matsuura, Y., Murayama, Y., and Mohri, S. (2010). Intraspecies prion transmission results in selection of sheep scrapie strains. *PloS One*, *5*(11), e15450. doi:10.1371/journal.pone.0015450 [doi]
- Yoon, S. O., Casaccia-Bonofil, P., Carter, B., and Chao, M. V. (1998). Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *The Journal of Neuroscience*, *18*(9), 3273-3281.
- You, S., Petrov, T., Chung, P. H., and Gordon, T. (1997). The expression of the low affinity nerve growth factor receptor in long-term denervated schwann cells. *Glia*, *20*(2), 87-100. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199706)20:23.0.CO;2-1 [pii]
- Yu, S. L., Jin, L., Sy, M. S., Mei, F. H., Kang, S. L., Sun, G. H., Tien, P., Wang, F. S., and Xiao, G. F. (2004). Polymorphisms of the PRNP gene in chinese populations and the identification of a novel insertion mutation. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, *12*(10), 867-870. doi:10.1038/sj.ejhg.5201245 [doi]
- Yuan, J., Lipinski, M., and Degtarev, A. (2003). Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron*, *40*(2), 401-413. doi:S0896627303006019 [pii]
- Yull, H. M., Ritchie, D. L., Langeveld, J. P., van Zijderveld, F. G., Bruce, M. E., Ironside, J. W., and Head, M. W. (2006). Detection of type 1 prion protein in variant creutzfeldt-

jakob disease. *The American Journal of Pathology*, 168(1), 151-157. doi:S0002-9440(10)62078-0 [pii]

Zahn, R. (2003). The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site. *Journal of Molecular Biology*, 334(3), 477-488. doi:S0022283603012014 [pii]

Zerr, I., Bodemer, M., Gefeller, O., Otto, M., Poser, S., Wiltfang, J., Windl, O., Kretschmar, H. A., and Weber, T. (1998). Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of creutzfeldt-jakob disease. *Annals of Neurology*, 43(1), 32-40. doi:10.1002/ana.410430109 [doi]

Zhu, C., Herrmann, U. S., Falsig, J., Abakumova, I., Nuvolone, M., Schwarz, P., Frauenknecht, K., Rushing, E. J., and Aguzzi, A. (2016). A neuroprotective role for microglia in prion diseases. *The Journal of Experimental Medicine*, 213(6), 1047-1059. doi:10.1084/jem.20151000 [doi]

Zlotnik, I., and Rennie, J. C. (1962). The pathology of the brain of mice inoculated with tissues from scrapie sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 72, 360-365.

Zlotnik, I., and Rennie, J. C. (1963). Further observations on the experimental transmission of scrapie from sheep and goats to laboratory mice. *Journal of Comparative Pathology*, 73, 150-162.

Zlotnik, I., and Rennie, J. C. (1965). Experimental transmission of mouse passaged scrapie to goats, sheep, rats and hamsters. *Journal of Comparative Pathology*, 75, 147-157.

Zomosa-Signoret, V., Arnaud, J. D., Fontes, P., Alvarez-Martinez, M. T., and Liautard, J. P. (2008). Physiological role of the cellular prion protein. *Veterinary Research*, 39(4), 9. doi:10.1051/vetres:2007048 [doi]

Zou, W. Q., Puoti, G., Xiao, X., Yuan, J., Qing, L., Cali, I., Shimoji, M., Langeveld, J. P., Castellani, R., Notari, S., Crain, B., Schmidt, R. E., Geschwind, M., Dearmond, S. J., Cairns, N. J., Dickson, D., Honig, L., Torres, J. M., Mastrianni, J., Capellari, S., Giaccone, G., Belay, E. D., Schonberger, L. B., Cohen, M., Perry, G., Kong, Q., Parchi, P., Tagliavini, F., and Gambetti, P. (2010). Variably protease-sensitive prionopathy: A new sporadic disease of the prion protein. *Annals of Neurology*, 68(2), 162-172. doi:10.1002/ana.22094 [doi]