

Desarrollo de un nuevo sistema de cribado masivo basado en la propagación *in vitro* de priones recombinantes infecciosos para la detección de compuestos con actividad anti-priónica

**JORGE MORENO CHARCO
LEIOA, 2018**

Tesis Doctoral:

**Desarrollo de un nuevo sistema de cribado masivo
basado en la propagación *in vitro* de priones
recombinantes infecciosos para la detección de
compuestos con actividad anti-priónica**

**JORGE MORENO CHARCO
LEIOA, 2018**

DIRECTORES:

**Dr. Joaquín Castilla Castrillón
Dr. Joseba Garrido Urkullu**

TUTOR:

Dr. Carlos Matute Almu

RESUMEN

Actualmente no existe ningún tratamiento para las encefalopatías espongiformes transmisibles o enfermedades priónicas a pesar del esfuerzo continuado de la comunidad científica. Se han propuesto diversas estrategias para lidiar con estas devastadoras enfermedades caracterizadas por el malplegamiento de la proteína del prion celular (PrP^C) a una isoforma patológica denominada PrP^{Sc} y su acumulación en forma de fibras amiloides en el sistema nervioso central: 1) estimular la respuesta inmune, 2) reducir los niveles de expresión de PrP^C, 3) inhibir las vías metabólicas que conducen a la muerte neuronal, 4) incrementar la capacidad de eliminación de agregados proteicos e 5) introducir moléculas con la habilidad de impedir el malplegamiento de la PrP^C, entre otros. Sin embargo, la falta de conocimiento sobre mecanismos moleculares clave de la enfermedad, han hecho que la búsqueda mediante cribado masivo de compuestos inhibidores del malplegamiento y propagación de priones sea una de las alternativas más prometedoras. El cribado masivo de compuestos requiere de un sistema rápido, robusto y fácilmente implementable, características que las técnicas de propagación *in vitro* de priones podrían cumplir.

En este trabajo, con la idea de obtener un sistema de cribado masivo de compuestos con actividad anti-priónica, se ha desarrollado una nueva metodología de propagación de priones *in vitro*, basada en la PMCA (del inglés, Protein Misfolding Cyclic amplification), ampliamente conocida en el campo. El nuevo sistema que se presenta sustituye los ciclos de incubación/sonicación característicos de la PMCA por agitación como fuente de energía. Además, utiliza un sustrato de reacción con componentes definidos que incluyen PrP recombinante y un único cofactor, haciendo el sistema más robusto y fácilmente adaptable para el cribado masivo de compuestos. La composición del sustrato permite a su vez, visualizar los resultados mediante espectrometría, utilizando Tioflavina T y de forma automatizada. Por tanto, el menor coste asociado a los agitadores y las características del nuevo sistema permiten su escalabilidad y su implementación en cualquier laboratorio. Por último, el sistema se basa en la utilización de priones recombinantes infecciosos, permitiendo la detección de potenciales compuestos anti-priónicos en un proceso de propagación muy similar al que se da *in vivo*, a diferencia de otros sistemas basados en la fibrilización de PrP^C. Así, el nuevo sistema desarrollado permite el cribado de 50-100 compuestos por día con la posibilidad de observar inhibición directa de la propagación de priones *bona fide*.

Utilizando el método desarrollado, en este trabajo se presenta el cribado de una biblioteca de 2500 compuestos químicos de alta diversidad del que se obtuvieron 3 compuestos con actividad anti-priónica, demostrando la utilidad del sistema y abriendo las puertas al desarrollo de nuevas terapias contra las enfermedades priónicas.

SUMMARY

Currently, no treatment exists for the Transmissible Spongiform Encephalopathies or prionopathies despite the continuous efforts of the scientific community. Different strategies have been proposed to deal with these devastating disorders characterized by the misfolding of PrP^C into PrP^{Sc} and the accumulation of amyloid fibrils in the Central Nervous System: 1) boosting the immunological response, 2) reducing the expression of PrP^C, 3) inhibiting the pathway that leads to neuronal death, 4) increasing the capacity of protein aggregate elimination and 5) introducing distinct molecules with the ability to hinder the misfolding of PrP^C, among others. The lack of knowledge about the molecular mechanisms of these diseases makes the screening for compounds to inhibit prion propagation one of the most straightforward and promising approaches. Testing a significant number of compounds requires a fast, robust and easily implementable system. *In vitro* prion propagation techniques based on recombinant PrP fulfilling most of these requirements.

In order to establish a high-throughput screening (HTS) system for the detection of chemical compounds with anti-prion activity, we have developed a new methodology based on the well-known Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA). In the novel system presented herein, we changed the sonication/incubation cycles characteristic of PMCA for shaking as the source of energy. Moreover, a simplified substrate devoid of brain factors composed by full-length recPrP and a single cofactor is used, making the technique very robust and easily adaptable to a HTS format. This single cofactor-complemented substrate allows the measurement of the presence of bona fide misfolded proteins using Thioflavin T (ThT) in a plate reader. Since shaking devices are simpler and less costly than sonicators, the system is easily scalable and implementable in any laboratory. Another important feature of the new method is the possibility of working with faithful recombinant infectious prions obtained in vitro, what allows the detection of the possible anti-prion compounds in a real infectious prion formation process in contrast to other techniques based on recombinant PrP fibrillization. Altogether, this new HTS method allows us to test 50-100 compounds per day with the possibility to observe direct inhibition of bona fide prion propagation.

Here we present the HTS of a commercially available library of 2,500 small chemical compounds using this newly developed system. From the library tested, we obtained two promising hits as final result, L2.JM33 and L2.JM56, demonstrating the utility of the method for the high-throughput screening of big chemical compound libraries.

ABREVIATURAS/GLOSARIO

- µg: microgramo
- µl: microlitro
- µm: micrómetro
- nm: nanómetro
- ° C: grado centígrado
- 6D11: anticuerpo monoclonal anti-PrP denominado 6D11

A

- ARN: ácido ribonucleico
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero
- AFM: microscopía electrónica de fuerza atómica, del inglés, *atomic force microscopy*
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- APP: del inglés, *Amyloid Precursor Protein*

C

- CC: del inglés, *charged cluster*
- CD: del inglés, *Circular Dichroism*
- CPEB: del inglés, *cytoplasmic polyadenylation element binding protein*
- CMV: citomegalovirus

D

- Da: dalton
- DNAsa: deoxirribonucleasa
- dNTP: del inglés, *deoxynucleotide triphosphates*
- DO₆₀₀: densidad óptica a 600nm
- DMSO: DiMetilSulfÓxido
- D.p.i: Días post-inoculación
- D18: anticuerpo monoclonal anti-PrP denominado D18

E

- *E. coli*: *Escherichia coli*, bacteria gamnegativa de la familia de las enterobacterias utilizada extensivamente en la producción de proteínas recombinantes
- ECJ: enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
- ECJe: enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica
- ECJg: enfermedad de Creutzfeldt-Jakob genética
- ECJv: enfermedad de Creutzfeldt-Jakob variante
- EDC: enfermedad debilitante crónica en ciervos
- EDTA: etilendiaminotetraacético
- EEB: encefalopatía espongiiforme bovina
- EEF: encefalopatía espongiiforme felina

- EET: encefalopatía espongiforme transmisible
- ETV: encefalopatía transmisible de visión
- EUE: encefalopatía espongiforme de ungulados exóticos
- EV: del inglés, *Extracellular Vesicles*

F

- F: del inglés, *forward*
- FTIR: del inglés, *fourier transform infrared spectroscopy*

G

- *g*: fuerza centrífuga relativa
- GPI : del inglés, *glycosylphosphatidylinositol*
- GSS: Gerstmann-Sträussler-Scheinker
- GFAP: proteína ácida fibrilar glial, del inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*
- GndCl: hidrocloreuro de guanidinio

H

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

I

- IFF: insomnio fatal familiar
- IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiraósido
- IC50: del inglés, *half maximal inhibitory concentration*

K

- kDa: kilodalton
- Kd: Constante de afinidad

L

- LB: Luria Bertoni, medio de cultivo de bacterias
- LCPs: del inglés Luminiscent Conjugated Polythiophenes
- LD50: dosis letal para el 50%, del inglés, *lethal dose 50%*

M

- M: molar
- mA: mili amperios
- MD: del inglés, *Molecular Dynamics*
- mg: miligramo
- min: minuto
- ml: mililitro
- mm: milímetro

- mM: milimolar
- MAVS: del inglés, *mitochondrial antiviral signaling*
- ME: microscopía electrónica

N

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

O

- ORF: marco de lectura abierto, del inglés, *open reading frame*
- OR: octa repeticiones, del inglés, *octapeptide repeats*

P

- p/v: peso/volumen
- PBS: del inglés, *phosphate buffered saline*
- PCR: del inglés, *polymerase chain reaction*
- PK: proteinasa K
- PMCA: del inglés, *protein misfolding cyclic amplification*
- PMCAa: PMCA automatizada
- PMSA: del inglés, *Protein Misfolding Shaking Amplification*
- PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- *PRNP*: gen que codifica la proteína PrP
- *PRNP*^{-/-}: animal transgénico *knock out* para el gen que codifica la proteína PrP
- *PRNP*^{+/-}: animal transgénico hemicigoto para el gen que codifica la proteína PrP
- PrP: proteína del prion, del inglés, *Prion protein*
- PrP*: PrP en un estado conformacional transitorio, intermedio entre PrP^C y PrP^{Sc}
- PrP²⁷⁻³⁰: PrP resistente a PK de 27-30 kDa
- PrP^C: isoforma celular de PrP, del inglés, *cellular prion protein*
- PrP^{res}: PrP resistente a la digestión con PK
- PrP^{Sc}: isoforma patógena de PrP, del inglés, *Scrapie associated Prion Protein*
- PVDF: polifluoruro de vinilideno
- PSVPr: Prionopatía con Sensibilidad Variable a Proteasas

Q

- QUIC: del inglés, *quaking induced conversion*

R

- R: del inglés, *reverse*
- rec-PrP: PrP recombinante
- RML: cepa de prion ovino adaptado a ratón en el *Rocky Mountain Laboratory*
- rpm: revoluciones por minuto

- RE: retículo endoplásmico
- RMN: resonancia magnética nuclear
- RT-QulC: del inglés, *Real Time - Quaking Induced Conversion*

S

- s: segundo
- SNC: sistema nervioso central
- Sup35: gen de levadura que codifica un factor terminador de transcripción
- SDS-PAGE: del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

T

- Tris-HCl: tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreuro
- TEM: microscopía electrónica de transmisión, del inglés, *transmission electron microscopy*
- ThT: del inglés, *thioflavine T*
- TMPyP-Fe(III): del inglés, *Iron (III) meso-Tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphine*
- TNT: del inglés *Tunneling NanoTubes*

U

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

V

- v/v: volumen/volumen
- VPSPr: del inglés, *variably protease-sensitive prionopathy*

Tabla de los 20 aminoácidos junto con su abreviatura y código

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

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumen/Summary..... | 8 |
| Abreviaturas/Glosario..... | 10 |
| Índice..... | 14 |
| Introducción..... | 15 |
| 1. Encefalopatías espongiformes transmisibles y la naturaleza del agente causal..... | 16 |
| 1.1. Inicios en la descripción y estudio de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles y de la naturaleza del agente causal..... | 17 |
| 1.2. Controversia acerca de la naturaleza del agente infeccioso..... | 20 |
| 1.3. Formulación de la hipótesis de “solo proteína” y primeros pasos hacia su refutación..... | 21 |
| 1.4. Experimentos in vivo e in vitro confirman la hipótesis de “solo proteína”..... | 23 |
| 1.5. Características y clasificación de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles humanas..... | 28 |
| 1.6. Importancia de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en la actualidad..... | 30 |
| 2. PrP ^C , PrP ^{Sc} y mecanismo de conversión..... | 32 |
| 2.1. PrP ^C | 33 |
| 2.2. Mecanismo de conversión a PrP ^{Sc} | 37 |
| 2.3. PrP ^{Sc} | 41 |
| 3. Hacia un tratamiento de las encefalopatías espongiformes transmisibles..... | 50 |
| 4. Sistemas de propagación de priones..... | 54 |
| 4.1. Sistemas de propagación <i>in cellula</i> | 55 |
| 4.2. Sistemas de propagación <i>in vitro</i> | 56 |
| Objetivos..... | 61 |
| Materiales y Métodos..... | 62 |
| 1. Construcción de los plásmidos de expresión de las PrP de topillo rojo, de humano y de oveja..... | 62 |
| 2. Obtención de las proteínas PrP recombinantes..... | 64 |
| 2.1. Transformación de plásmidos en bacterias mediante choque térmico..... | 64 |
| 2.2. Expresión y purificación de proteínas PrP recombinantes para su uso en los sistemas de propagación <i>in vitro</i> | 65 |
| 3. PMSA como método de propagación in vitro de priones..... | 65 |
| 3.1. Preparación de sustratos para PMSA..... | 67 |
| 3.2. Propagación <i>in vitro</i> de priones mediante PMSA..... | 67 |
| 4. Detección de la formación de fibras amiloides utilizando ThT..... | 69 |
| 5. PMCA como método in vitro de propagación de priones..... | 70 |
| 5.1. Preparación de sustratos basados en PrP recombinante complementada con homogeneizado de encéfalo de pollo..... | 70 |
| 5.2. Preparación de sustratos basados en homogeneizado de encéfalo de ratón..... | 71 |
| 5.3. Propagación in vitro de priones mediante PMCA y testado de compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85..... | 71 |
| 6. Digestión de muestras con proteinasa K..... | 72 |
| 7. Detección de proteínas mediante electroforesis y Western Blot..... | 73 |
| 8. Determinación de la toxicidad de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85..... | 73 |
| 9. Testado de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 en el modelo de propagación in cellula ScN2a..... | 75 |
| 10. Detección de proteínas mediante la técnica de Dot Blot..... | 76 |
| Resultados..... | 77 |
| 1. Desarrollo de la PMSA como nuevo método de propagación in vitro..... | 77 |
| 1.1. Obtención de una semilla adaptada al sistema PMSA..... | 79 |
| 1.2. Optimización del sistema de propagación..... | 80 |
| 1.3. Adaptación de la PMSA a un sistema de cribado masivo..... | 86 |
| 2. Cribado de la biblioteca Ro3 Maybridge..... | 91 |

| | |
|---|-----|
| 3. Confirmación de la capacidad inhibidora de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 mediante técnicas alternativas..... | 95 |
| 3.1. Confirmación de la capacidad inhibidora de la propagación in vitro mediante PMCA..... | 96 |
| 3.2. Confirmación de la capacidad inhibidora de la propagación in cellula..... | 101 |
| Discusión..... | 104 |
| Conclusiones..... | 115 |
| Referencias..... | 116 |
| Lista de publicaciones..... | 135 |

INTRODUCCIÓN

1 - Encefalopatías Espongiformes Transmisibles y la naturaleza del agente causal

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas mortales y transmisibles que afectan a los seres humanos además de a un gran número de especies de mamíferos. Entre las descritas en seres humanos tenemos la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), el Insomnio Familiar Fatal (IFF), el Kuru y la Prionopatía con Sensibilidad Variable a Proteasas (PSVPr) (1). En cuanto al resto de mamíferos tenemos dos que destacan por su importancia económica: el Scrapie o tembladera, que afecta al ganado ovino y la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), que afecta a bóvidos y fue responsable de la epidemia de las vacas locas a inicios de los años 90 en el Reino Unido. Otra EET de gran relevancia por el alto número de casos, sobre todo en Estados Unidos y en Canadá, es la Enfermedad Crónica Debilitante de Cérvidos (ECD), que se está extendiendo rápidamente entre las poblaciones de cérvidos salvajes debido a la alta infectividad de la orina y las heces de los animales afectados. Esta es además la única EET detectada en animales salvajes. También se han descrito otras como la Encefalopatía Transmisible del Visón (ETV), observada solo en visones en cautividad, la Encefalopatía Espongiforme Felina (EEF) en gatos domésticos y la Encefalopatía de Ungulados Exóticos (EUE), también descrita solamente en animales en cautividad (2, 3).

Los individuos afectados presentan gran variedad de signos neurológicos, algunos comunes a todas las EETs, entre los que podemos destacar la ataxia cerebelar y una disfunción motora y cognitiva progresiva. En todos los casos la enfermedad es letal y se caracteriza por el corto periodo que transcurre desde la aparición de los primeros signos hasta el fallecimiento (entre 6 meses y dos años aproximadamente), un tiempo extremadamente corto si se compara con otras enfermedades neurodegenerativas. El estudio *post mortem* del encéfalo muestra una acusada espongiosis, astrogliosis y acumulación de proteína malplegada. La espongiosis está asociada a la muerte neuronal, dando aspecto de esponja al encéfalo debido a la pérdida celular que ocurre en el tejido nervioso. El análisis *post mortem* del encéfalo de los individuos sospechosos de sufrir la enfermedad es imprescindible para realizar un diagnóstico definitivo, ya que los signos son similares a los de otras enfermedades neurodegenerativas y en muchos casos no permiten discriminar una enfermedad de otra (1).



Figura 1. Anomalías observables en los encéfalos de individuos afectados por una enfermedad priónica. a) Imagen del córtex frontal de un paciente de ECJ donde se aprecia el daño esponjiforme. Tinción con hematoxilina & eosina. 20x b) Deposición de PrP en el córtex frontal de paciente de ECJ. Tinción con anticuerpo anti-PrP 12F10. 20x c) Aumento de gliosis reactiva en el tálamo de paciente de IFF. Tinción con anticuerpo anti-Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP). 40x (Modificado de Will 2017).

Una de las características más importantes de las EETs es su capacidad de transmitirse de unos individuos a otros. Este concepto lleva implícito la existencia de un agente con capacidad autopropagativa que es responsable de esta transmisibilidad. Las primeras teorías relacionaban estas enfermedades con algún tipo de virus lento que afecta al Sistema Nervioso Central (SNC) provocando la neurodegeneración y finalmente, la muerte de los afectados. La existencia de largos periodos de incubación y la variabilidad de las patologías descritas usando animales de experimentación encajaban con la teoría de un virus lento con diferentes cepas. Sin embargo, las evidencias en contra de esta teoría y la falta de pruebas que demostrasen la existencia del virus lento fueron decantando la balanza en favor de otra controvertida propuesta que relacionaba las EETs con un agente infeccioso de naturaleza exclusivamente proteica (4, 5).

1.1 - Inicios en la descripción y estudio de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles y de la naturaleza del agente causal

Las primeras referencias documentadas de las enfermedades priónicas datan de mediados del siglo XVIII. En una carta al Parlamento de Inglaterra los ganaderos de la región de Lincolnshire piden un mayor control en la importación de oveja merina española debido a un brote de tembladera o Scrapie, provocado por estas ovejas. Esta sería la primera vez que esta enfermedad queda reflejada de forma escrita. Posteriormente, y a lo largo de los siglos XVIII y XIX se suceden varios textos de carácter más o menos científico que relacionan el Scrapie, la única enfermedad priónica conocida por entonces, con diferentes causas. En un inicio, se llegó a postular que la tembladera estaba relacionada con la sobreactividad sexual de las ovejas o las tormentas eléctricas. A principios del siglo XX se la relacionaron con el parásito *Sarcosporidium* (6) y otros autores empezaron a hablar ya de agentes filtrables sugiriendo un virus como agente causal. Estudios realizados en 1936 por Cuille y Chelle demuestran que esta enfermedad es infecciosa realizando inyecciones intraoculares de médula espinal de animales enfermos en animales sanos (7, 8). La capacidad de transmitirse

entre individuos, junto a los largos periodos de incubación y a la evidencia de que se trata de un agente filtrable señalaba claramente que un agente vírico lento era el responsable de la enfermedad.

Mientras todas estas teorías y descubrimientos sobre el Scrapie se sucedían, los neurólogos alemanes Hans Gerhard Creutzfeldt y Adolf Jakob describen alrededor de 1920 los primeros casos de una neuropatía desconocida hasta entonces en seres humanos (9, 10). Se trata de la hoy conocida como Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, bautizada por el también neurólogo alemán Spielmeyer en 1922. Esta es la primera prionopatía descrita en humanos, aunque su relación con el Scrapie no fue descrita hasta muchos años después. Durante las siguientes décadas aparecen en la literatura diferentes casos con diferentes nombres debido a la heterogeneidad de los signos y síntomas que sufren los pacientes, relacionándose más tarde muchos de ellos con la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y esta finalmente, con el resto de las enfermedades priónicas.

Otra enfermedad con rasgos neurológicos que recuerdan a la ECJ, aunque en aquel momento aún sin relación, fue descrita a principios de los años 50 en Papúa-Nueva Guinea. El doctor Vincent Zigas, oficial médico de la región, fue el primero en describirla en los Fore, un grupo étnico de la isla. Se trataba de una enfermedad que provocaba temblores y graves problemas motores. Los afectados acababan por perder totalmente la capacidad de caminar o tenerse en pie y resultaba letal en todos los casos. Entre los Fore, que apenas hacía 10 años que habían entrado en contacto con el mundo occidental, era conocida como *kuru*, que significa temblor o miedo en su idioma. La relacionaban con la brujería debido a los extraños síntomas y a la rapidez con que los “embrujados” acababan sucumbiendo. Otro rasgo característico era que afectaba sobre todo a mujeres y niños. Las experiencias de los médicos y antropólogos que viajaron a la isla y la describieron atrajeron la atención de varios investigadores en busca de una explicación médica para la maldición (11). Así, unos años más tarde el pediatra Carleton Gajdusek llegó a la zona, atraído entre otras cosas por la peculiar encefalitis. Tras varios estudios en el terreno, el Dr. Gajdusek postuló que un virus lento que afectaba al sistema nervioso era el responsable del Kuru y lo relacionó con las prácticas rituales canibalísticas de la tribu. Entre los Fore era tradición que cuando un hombre moría, el resto compartieran su carne para liberar su espíritu. Uno de los ritos clave en esta ceremonia era el consumo del cerebro del fallecido por parte de su mujer e hijos. Cuando un individuo sufría la enfermedad del Kuru, aun antes de la manifestación de los síntomas, el agente infeccioso se encontraba ya presente en su sistema nervioso por lo que la enfermedad se transmitía a los consumidores, principalmente a los que hubiesen ingerido partes del encéfalo y médula espinal. Debido a este rito, Gajdusek logró relacionar la encefalitis con el consumo preferente del sistema nervioso por parte de los niños y mujeres, sugiriendo que el

agente infeccioso, probablemente un virus lento, debía encontrarse principalmente en el encéfalo de los afectados (12). El siguiente paso fue tratar de aislar el agente causal del Kuru e identificarlo, pero todos sus intentos fueron infructuosos, ya que estaban dirigidos hacia la posibilidad de que el agente infeccioso fuera un virus lento, teoría que poco a poco sería puesta en entredicho.

A pesar de que ya se conocían la ECJ y el Scrapie, la relación entre ellas y con el Kuru aún no se había establecido. Fue William Hadlow, un veterinario patólogo, el que relacionó las lesiones espongiiformes del Kuru con el Scrapie. El Dr. Hadlow, que a principios de los sesenta trabajaba en *Rocky Mountain Laboratories*, una institución pionera en Estados Unidos en el estudio del Scrapie, asistió en Inglaterra a una ponencia sobre la extraña encefalitis de los Fore en la que se mostraban imágenes de las lesiones espongiiformes del encéfalo de estos pacientes. Rápidamente Hadlow, avezado histopatólogo, relacionó las lesiones espongiiformes del Kuru con las del Scrapie (13), relacionándose por primera vez las dos EETs. Poco después, en 1966, Gajdusek y Gibbs demostraban definitivamente que el Kuru era infeccioso en chimpancés (14) estableciendo una conexión evidente e irrefutable entre ambas enfermedades. Sin embargo, la ECJ, aunque ya era conocida, todavía no se había relacionado con el Scrapie ni con el Kuru. Fue en 1968, tras la publicación del trabajo de Gajdusek con los chimpancés infectados experimentalmente con Kuru, cuando estas enfermedades empezaron a relacionarse con la ECJ. Klatzo fue uno de los primeros en sugerir esta conexión debido a la similitud de los síntomas y a las lesiones espongiiformes observadas en todos los casos (15). La repetición del experimento llevado a cabo con el Kuru en chimpancés, en este caso con material de pacientes de ECJ (16), terminó por demostrar que la ECJ también era una encefalopatía transmisible y, por tanto, estrechamente relacionada con el Kuru y el Scrapie.

Durante la segunda mitad del siglo XX se siguieron describiendo otras neuropatías en humanos que poco a poco se fueron uniendo al grupo de las EETs. La enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (17, 18) y el Insomnio Familiar Fatal (19, 20) fueron descritas en los años 1980-90 y la demostración de que eran transmisibles en primates (21) fue clave para demostrar que estaban directamente relacionadas con el Kuru y la ECJ. También fueron descritas otras enfermedades en varias especies de mamíferos que afectaban al sistema nervioso, generaban lesiones espongiiformes y eran transmisibles. Todas fueron poco a poco incluyéndose dentro de las EETs: la Enfermedad Transmisible del Visón (22), la Enfermedad Crónica Debilitante de Cérvidos (23), la Encefalopatía Espongiforme Felina (24) y la Encefalopatía de Ungulados Exóticos (25). Estas dos últimas tienen relación directa con otra EET, la Encefalopatía Espongiforme Bovina, también conocida como el mal de las vacas locas. Esta enfermedad afecta al ganado bovino y se propagó en el Reino Unido durante la

década de los ochenta debido al uso de piensos que incluían harinas cárnicas de animales infectados. Las similitudes bioquímicas e histopatológicas permitieron establecer una conexión directa entre la EEF y la EUE con la EEB. En el caso de la Encefalopatía Espongiforme Felina el proceso de infección fue el mismo, ya que era bastante común que los piensos que se usaban para alimentar a los gatos domésticos incluyeran harinas cárnicas, mientras que en los casos de Encefalopatía de Ungulados Exóticos se atribuyó a la ingestión de carcasas de animales que habían sido contaminadas con tejido nervioso infectado con EEB.

1.2 - Controversia acerca de la naturaleza del agente infeccioso

Una vez quedó demostrado sin lugar a dudas que las EETs eran transmisibles, el siguiente paso fue explicar y demostrar la naturaleza del agente infeccioso. Esta búsqueda desencadenaría una controversia cuyos ecos aún resuenan, ya que de las teorías propuestas, aquella que se confirmó posteriormente suponía un desafío al dogma central de la biología. Los primeros estudios de infectividad realizados en modelos experimentales *in vivo* demostraban que el agente infeccioso se encontraba principalmente confinado en el SNC, que era un agente filtrable (26) y que los tiempos de incubación hasta la aparición de los primeros signos eran muy largos en todos los casos (27-29). Estas características llevaron a formular las primeras hipótesis que relacionaban las EETs con un virus lento, hipótesis postulada por primera vez por Sigurdsson en 1954. Uno de los factores que más contribuyeron a esta hipótesis fue la existencia de diferentes cepas descubiertas a raíz de los experimentos llevados a cabo por Pattison y colaboradores en 1961. Inoculaciones realizadas en cabras y ovejas demostraron la existencia de dos aislados diferentes de Scrapie, conocidos como “scratchy” y “drowsy” (30). Estos estaban caracterizados por mostrar diferentes tiempos de incubación, signos clínicos y diferentes patrones de lesiones en el SNC. Otro descubrimiento clave para el campo que también se realizó durante esta época fue la transmisión del agente causal entre especies filogenéticamente alejadas. La inoculación de diferentes aislados de Scrapie procedentes de cabra (31, 32) y de oveja (33) en ratones, además de demostrar la transmisibilidad del agente en especies no emparentadas, dio lugar a los primeros modelos de laboratorio manejables, suponiendo un gran avance en el estudio de las EETs.

La imposibilidad de aislar el virus a pesar de los múltiples intentos y la ausencia de respuesta inmunológica fueron los principales argumentos en contra de la teoría del virus y, como consecuencia, fueron surgiendo otras explicaciones que trataban de esclarecer el extraño comportamiento del agente infeccioso: viroides, elementos tipo retrovirus o membranas con capacidad autorreplicativa (6). Ninguno de estos candidatos conseguía explicar todas las características descritas para el extraño agente. Uno de los indicios más claros lo proporcionaron los estudios realizados por Tikvah Alper y colaboradores. En ellos

demonstraron que el agente infeccioso era resistente a la radiación ultravioleta, lo que debería inactivar cualquier agente vírico. También observaron que era resistente a nucleasas o cualquier otra técnica usada para la inactivación de los ácidos nucleicos (34). Estimaron que el tamaño de la partícula infecciosa era de aproximadamente 2×10^5 Dalton (Da), demasiado pequeño para tratarse de un virus o una bacteria (35). Todo esto parecía indicar que el agente infeccioso no tenía material genético, a pesar de que era capaz de multiplicarse en un huésped, lo que desafiaba directamente el dogma central de la biología propuesto por Watson y Crick. John S. Griffith fue el primero en hipotetizar una estructura proteica capaz de autorreplicarse. En un texto publicado en 1967, Griffith habla de un modelo basado en una proteína con dos estructuras diferentes: una estructura estable A' y una estructura inestable A. La formación de la estructura inestable A es termodinámicamente muy desfavorable, por lo que hay muy pocas unidades estructurales en conformación A, pero esta proteína inestable A sería capaz de agregar formando dímeros. Una vez formados los dímeros estos irían sumando proteínas con estructura estable A', que es muy abundante, formando trímeros, cuatrímeros... en un proceso termodinámicamente favorable (36). A pesar de ser una hipótesis totalmente teórica fue el primer acercamiento a lo que hoy en día conocemos como la hipótesis de "solo proteína".

1.3 - Formulación de la hipótesis de "solo proteína" y primeros pasos hacia su refutación

La década de los ochenta supondría un punto de inflexión en la investigación dentro del campo de las enfermedades priónicas. Basándose en la publicación de Griffith y en los datos recabados acerca del extraño comportamiento del agente infeccioso en las décadas anteriores, Stanley Prusiner propuso el término prion (del inglés *proteinaceous infectious particle*) para nombrar a la partícula infecciosa responsable de las EETs (37). Según la teoría propuesta por Prusiner, solo una proteína podría cumplir las características que se le atribuían a la partícula infecciosa: resistencia a nucleasas, sensibilidad a proteasas y agentes alcalinos y su pequeño tamaño. Ese mismo año Bolton y colaboradores fueron capaces de aislar una proteína que se encontraba en grandes cantidades en el SNC de los individuos afectados y que era parte constituyente de la fracción infecciosa. También describieron que esta proteína era resistente a la digestión por proteinasa K (PK) y que tenía un tamaño aproximado de 27-30 kDa (38). En este mismo periodo Merz y colaboradores obtuvieron las primeras imágenes de estructuras que relacionaron con virus filamentosos en el SNC de animales y seres humanos afectados por Scrapie, ECJ y Kuru (39). Poco después Prusiner relacionaba estas estructuras, que él mismo denominaría "varillas del prion", con el agente infeccioso al demostrar que estaban compuestas exclusivamente de proteína priónica (PrP) y que eran una parte imprescindible, si no única, de la fracción infecciosa. Además, relacionaba estas varillas con los agregados amiloides detectados en el SNC de los afectados (40).

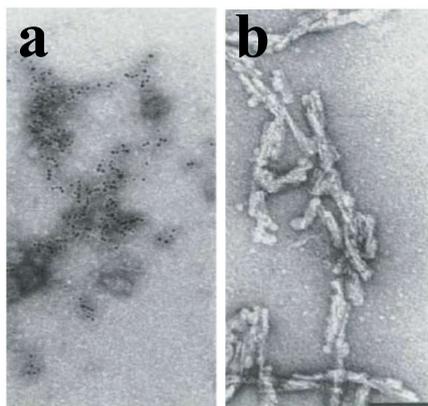


Figura 2. Imágenes de microscopía electrónica de campo oscuro de las fibras de PrP asociadas a las EET. a) Microfotografía de campo oscuro en el que podemos observar PrP^C marcada con un anticuerpo anti-PrP que porta partículas de oro. **b)** Microfotografía de campo oscuro de las “varillas del prion” formadas por PrP^{Sc}. Barra de escala de 100nm. (Modificado de Calella 2009).

Esta proteína, que se encontraba en alta cantidad en las fracciones infecciosas formando amiloides, resistente a proteasas y de un tamaño aproximado de 27-30 kDa se denominó PrP²⁷⁻³⁰ y fue vinculada directamente a la infectividad. El aislamiento y secuenciación de la PrP²⁷⁻³⁰ permitió demostrar que esta era una parte de una proteína mayor de unos 33-35 kDa (41). En 1986 se demostraría que la denominada proteína del prion (PrP) estaba codificada en un gen de copia única llamado *PRNP* que se expresaba de manera constitutiva en el SNC de animales sanos, así como otros tipos celulares. Estos estudios demostraron que la PrP²⁷⁻³⁰, también conocida como PrP^{Sc} (por su asociación al Scrapie), y la PrP de 33-35 kDa, conocida como PrP^C (de celular), estaban codificadas en el mismo gen cromosómico (42).

La conjunción de la teoría propuesta por Prusiner en 1982 con los datos obtenidos durante los años siguientes dio lugar a lo que hoy en día conocemos como la hipótesis de “solo proteína”. En esta teoría se propone que la PrP^{Sc} es el único componente del agente infeccioso de las EETs, siendo esta una isoforma malplegada de la PrP^C normalmente expresada con su plegamiento nativo. Sin embargo, cómo la PrP^C era capaz de malplegarse y transformarse en PrP^{Sc}, iniciando así el proceso infeccioso era todavía un misterio. Se planteó que la PrP^{Sc} se generaba a través de un proceso de modificación post-traducciona a partir de la PrP^C (43, 44), pero no se pudieron obtener datos claros que respaldaran esta teoría (45). Más tarde se propuso que la PrP^{Sc} actuaba como molde promoviendo la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} a través de un cambio conformacional. Datos de espectroscopía infrarroja con transformación de Fourier (FTIR, del inglés *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) y de dicroísmo circular (CD, del inglés *Circular Dichroism*) probaron que la transformación de PrP^C a PrP^{Sc} estaba relacionado con una disminución en la cantidad de hélices- α y un aumento en la proporción de láminas- β (46, 47), demostrando así que un cambio conformacional era el responsable de la conversión de la PrP^C en la forma infecciosa PrP^{Sc}. Este cambio

conformacional sería también el responsable de las diferencias en las propiedades bioquímicas observadas entre ambas proteínas, como por ejemplo la insolubilidad en presencia de detergentes no iónicos (48) o la resistencia parcial a la digestión por PK (49). Esta última característica se relacionaría directamente con la existencia de las dos conformaciones de la PrP con diferente peso molecular que hemos mencionado anteriormente: la forma normal de 33-35 kDa y la infecciosa de 27-30 kDa. La digestión con PK de la PrP^{Sc} daría como resultado la eliminación de, aproximadamente, los primeros 90 aminoácidos, dando lugar así a una proteína de menor peso molecular (27-30 kDa), distinguible de la PrP^C (33-35 kDa) mediante electroforesis. Otra importante diferencia relacionada con este cambio conformacional sería la tendencia de la PrP^{Sc} a formar fibras en el SNC de los individuos afectados (50). Hasta la fecha, la presencia de la PrP²⁷⁻³⁰ resistente a la digestión por PK y su reconocimiento por anticuerpos anti-PrP siguen siendo el único marcador patognomónico de la enfermedad. No obstante, la descripción en los últimos años de la Prionopatía con Sensibilidad Variable a Proteasas (PSVPr) (51) desafiaría la existencia de PrP resistente a la digestión por PK como marcador patognomónico aplicable a todas las EETs.

La identificación de formas familiares de las EETs atribuidas a diferentes mutaciones en el gen de la PrP supuso otro importante apoyo a la teoría de “solo proteína”. Diversas sustituciones, inserciones y deleciones en la secuencia aminoacídica de la proteína PrP la hacen más tendente a malplegarse, iniciándose así el proceso infeccioso. Hsiao y colaboradores relacionaron la mutación P102L en el gen *PRNP* con el GSS familiar en 1989, describiendo así la primera mutación ligada a una EET (18). En la actualidad se conocen más de 50 mutaciones relacionadas con el gen de la PrP humana y a las que se les ha atribuido aproximadamente el 10-15 % de todos los casos de EETs descritos en humanos (52).

1.4 - Experimentos *in vivo* e *in vitro* confirman la hipótesis de “solo proteína”

Los primeros estudios de transmisibilidad de priones se llevaron a cabo en modelos animales en los que la enfermedad había sido descrita o en los modelos más cercanos posibles a los mamíferos susceptibles. Ovejas, cabras y primates fueron los únicos modelos ampliamente disponibles durante las décadas de los sesenta y los setenta. Debido a su gran tamaño, la dificultad para trabajar con ellos y a los largos tiempos de incubación que presentan después de su inoculación, fue creciendo la necesidad de modelos animales más pequeños y que mostraran tiempos de incubación más cortos con el objetivo de resolver las nuevas incógnitas que iban surgiendo acerca de la naturaleza del agente infeccioso. La adaptación del Scrapie en ratones de genotipo silvestre llevada a cabo por Chandler (31) fue un primer paso. Este hito facilitó en gran medida los estudios *in vivo* dentro del campo de las EETs durante las siguientes décadas. Años más tarde, la EEB (53) y la ECJ (54) también serían

adaptadas a ratones de genotipo silvestre, demostrando la utilidad de este modelo animal. El hámster sirio dorado también sería un modelo ampliamente utilizado durante los ochenta (55, 56). Ambos modelos serían claves para la comprensión y descripción de las barreras interespecie, la distribución y propagación de los priones en el SNC y los ensayos utilizando diferentes vías de inoculación. Sin embargo, la imposibilidad de trabajar con PrP^C de diferentes especies era un importante factor limitante para el avance en el estudio de las enfermedades priónicas. Fue en 1982 cuando se obtendría el primer ratón transgénico (57), aunque hubo que esperar unos años más hasta la generación del primer ratón transgénico para el gen de la proteína priónica. DeArmond y colaboradores demostrarían que el modelo que habían generado contenía el transgén que expresaba la PrP^C del hámster sirio dorado y que este era capaz de reproducir fielmente todos los rasgos fenotípicos específicos de la infección por Scrapie en esta especie (58). Este sería un logro fundamental para el avance hacia la determinación y comprensión del agente infeccioso ya que esta tecnología permitiría la generación de ratones con PrP^C de otras especies o con mutaciones de interés manteniendo las ventajas de los modelos animales murinos.

La generación de un modelo animal transgénico con la mutación puntual P102L en el gen *PRNP*, asociada a la aparición espontánea del GSS, y la constatación de que este modelo sufría una enfermedad neurodegenerativa similar al GSS en humanos (59) demostraría que una mutación puntual en el gen *PRNP* era suficiente para la aparición espontánea de una EET, respaldando así la teoría de “solo proteína”. Sin embargo, a pesar de que este modelo animal reproducía los signos del GSS en humanos, la enfermedad espontánea inducida en este modelo no era transmisible (60). No obstante, otros modelos transgénicos generados posteriormente sí fueron capaces de reproducir la aparición espontánea de EETs transmisibles a animales de genotipo salvaje. Entre ellos podemos destacar el modelo de ratón transgénico que expresa la PrP^C bovina con una mutación asociada a GSS en humanos (61), los ratones transgénicos que expresan PrP^C de ratón con mutaciones asociadas a GSS y ECJ (62) y el modelo de ratón transgénico que expresa la PrP^C del topillo rojo, cuyo polimorfismo natural 109I favorece el malplegamiento espontáneo (63). Otro respaldo importante para la teoría de “solo proteína” vendría con la generación del primer ratón transgénico en el que se había eliminado el gen *PRNP*. Estos animales, que no tenían PrP^C, eran totalmente resistentes a la infección por Scrapie, sin manifestación alguna de signos clínicos ni acumulación de PrP^{Sc} (64). Esto demostró que la PrP^C era indispensable para la propagación y acumulación de PrP^{Sc}. Poco después la generación de ratones hemicigotos para *PRNP* (*PRNP*^{+/-}) evidenció que los niveles de expresión de PrP^C están directamente relacionados con la tasa de formación de PrP^{Sc} e inversamente relacionados con los tiempos de incubación, ya que estos eran más largos que en los animales homocigotos (*PRNP*^{+/+})

(65). También se generaron ratones transgénicos que sobreexpresan el gen *PRNP* (66) obteniéndose así tiempos de incubación mucho más cortos.

A pesar de todos los datos obtenidos mediante experimentación *in vivo* que respaldaban la hipótesis de “solo proteína”, todavía existía durante la década de los 90 y principio del 2000 cierta oposición hacia esta teoría (67). Los detractores de esta hipótesis argumentaban que todavía no se había logrado demostrar fehacientemente que únicamente era necesaria la presencia de PrP^C para mantener la propagación de PrP^{Sc} y que esta fuera capaz de producir una EET por sí sola. La prueba definitiva de la teoría propuesta por Prusiner sería la obtención de un prion generado *in vitro* únicamente a expensas de PrP^C y que, además, este fuera capaz de producir un síndrome con los mismos signos que las EETs y con un tiempo de incubación similar. Se tardarían casi treinta años en lograr este objetivo desde la publicación de la teoría de “solo proteína”.

El primer sistema de propagación *in vitro* de priones, desarrollado por Byron Caughey y colaboradores a principios de los noventa, conocido como ensayo de conversión libre de células (del inglés, *cell-free conversion assay*). Usando este sistema fueron capaces de demostrar la generación de PrP malplegada resistente a la digestión por PK usando únicamente PrP^C y PrP^{Sc} purificadas como sustrato y semilla respectivamente (68). De esta forma se demostró por primera vez usando un sistema *in vitro* que el proceso de conversión de la PrP^C a la isoforma resistente a la digestión por PK estaba catalizado por la PrP^{Sc}. No obstante, el bajo rendimiento de la conversión observada junto con las condiciones no fisiológicas empleadas durante el proceso de conversión y el exceso de PrP^{Sc} necesario para iniciar la propagación, dificultaba mucho la evaluación de la infectividad de la proteína resistente generada *in vitro*. En un intento por mejorar el ensayo libre de células en el año 2000 se consiguió la transformación de PrP^C a PrP^{Sc} utilizando una cantidad ínfima de semilla mediante el uso de la sonicación (69). Este estudio sería el inicio de la técnica que hoy en día se conoce como amplificación cíclica de proteínas malplegadas o PMCA (del inglés, *Protein Misfolding Cyclic Amplification*). Mediante la alternancia de ciclos de sonicación e incubación se consigue la obtención de grandes cantidades de PrP^{Sc} a partir de PrP^C *in vitro*, reproduciendo lo que ocurre en el SNC de los individuos afectados, con una cinética acelerada (70). Los priones amplificados utilizando PMCA han demostrado que mantienen las mismas propiedades estructurales, biológicas y bioquímicas de la PrP^{Sc} proveniente de encéfalo de animales afectados (71). Este hecho supuso para muchos un apoyo clave para la hipótesis de “solo proteína”, pero debido a que tanto la PrP^C como la PrP^{Sc} utilizadas en esta técnica provenían de encéfalos de animales, estas evidencias aún se consideraron insuficientes. Fue necesaria la obtención de material infeccioso a partir de PrP pura y en ausencia de cualquier

componente proveniente de encéfalos animales para alcanzar la confirmación final de la teoría.

Una década después de la obtención de los primeros priones mediante propagación *in vitro*, Legname y colaboradores generaron priones infectivos utilizando un nuevo método de propagación. En este caso, en lugar de utilizar PrP^C proveniente de encéfalo, se utilizó PrP recombinante de ratón producida en *Escherichia coli* (*E. coli*), dando lugar a fibras amiloides *de novo* en ausencia de PrP^{Sc} como semilla. La infectividad de estas fibras quedó demostrada cuando se inocularon en ratones transgénicos que sobreexpresaban la proteína priónica (72). Sin embargo, dado que los tiempos de incubación fueron más largos de lo habitual en este modelo transgénico y que las fibras no infectaban un modelo murino silvestre, este resultado no fue suficiente para conseguir un respaldo unánime de la teoría de “solo proteína”. Los disconformes argumentaron que el prion recombinante generado *in vitro* solo era capaz de infectar modelos de ratón que sobreexpresaban la PrP y, dado que estos animales desarrollaban espontáneamente una patología priónica cuando envejecían, se sugirió que este tipo de priones estuvieran simplemente acelerando este proceso y no generando una enfermedad priónica *per se*.

La generación de priones utilizando sistemas de propagación *in vitro* que fueran capaces de infectar animales silvestres llegaría en 2010 de la mano de Makarava y colaboradores. Utilizando un sistema de fibrilización diferente al realizado por Legname fueron capaces de generar fibras amiloides a partir de PrP de hámster proveniente de *E. coli*. Este prion recombinante requería de una segunda inoculación para hacer patentes los signos de la enfermedad, mostrando unos tiempos de incubación inusualmente largos (73). Este comportamiento llevó a que, de nuevo, estos resultados fueran insuficientes para confirmar definitivamente la teoría de “solo proteína”. Fue en ese mismo año cuando Jiyan Ma y colaboradores publicarían por primera vez la obtención de priones altamente infectivos generados *in vitro* utilizando PMCA y PrP recombinante de ratón como sustrato. Aunque anteriormente Kim y colaboradores habían generado priones infectivos mediante PMCA utilizando PrP recombinante, esta necesitaba de la presencia de una semilla de PrP^{Sc}. Además, la infectividad el producto resultante fue baja (74). En el experimento realizado por el grupo del Dr. Ma, la proteína malplegada se obtenía *de novo* mediante ciclos seriados de PMCA, es decir, sin la adición de ninguna semilla de PrP^{Sc}. El sustrato de PMCA utilizado estaba compuesto exclusivamente por PrP recombinante de ratón y ARN y lípidos como cofactores (75). Este prion generado *in vitro*, completamente carente de otros componentes encefálicos y que mostraba una alta infectividad en ratones de tipo salvaje, representaba en sí mismo la confirmación para muchos investigadores del carácter exclusivamente proteico del agente infeccioso de las EETs.

Actualmente, la discusión acerca de la naturaleza del agente etiológico de las EETs está prácticamente zanjada, a excepción de un reducido número de investigadores que aún trata de demostrar que es necesaria la existencia de ácidos nucleicos asociados al agente causal (6). Una de las principales dificultades para el respaldo total del modelo basado en la teoría de “solo proteína” es la existencia de diferentes cepas caracterizadas por diferentes tiempos de incubación y diferentes manifestaciones clínicas e histopatológicas. Tradicionalmente, la existencia de diferentes variantes o cepas de cualquier agente infeccioso se relaciona con la existencia de ácidos nucleicos que codifican la información responsable de estas diferencias. Según los detractores de la teoría de “solo proteína”, debido a que el agente causal de las EETs está formado exclusivamente por proteína, no es posible que existan diferentes cepas de prion. No obstante, la hipótesis de Prusiner se ha conciliado con el concepto de cepas justificándose la existencia de estas como diferentes variantes conformacionales o estados de agregación de la PrP^{Sc} (4). Esta posibilidad está respaldada con resultados experimentales como aquellos que muestran que la PMCA es capaz de reproducir y mantener las características de la semilla original utilizada (71), que algunos compuestos puedan interactuar de forma diferencial ante diferentes cepas (76) o que se hayan descrito ciertas diferencias estructurales entre cepas usando varias técnicas biofísicas y de reconocimiento por anticuerpos conformacionales (77-79). Además, se han descritos varios ejemplos en la naturaleza de proteínas que se valen de la existencia de variantes conformacionales para transmitir información. En particular, las proteínas Ure2 o Sup35, priones de levaduras descritos por Wickner y colaboradores en los noventa y que actúan como elementos de transmisión de información biológica heredándose en la división celular y confiriendo nuevos fenotipos metabólicos (80). También se han descrito mecanismos de transmisión de información a través de cambios conformacionales en la babosa marina *Aplysia californica*, cuya proteína CPEB, relacionada con la plasticidad sináptica y la memoria, pasa por un cambio conformacional que es inducible en CPEB cercanas (81). Otro ejemplo sería la proteína MAVS, descrita en cultivos celulares humanos y relacionada con la respuesta inmunológica innata (82). Otras proteínas descritas en plantas y en *Clostridium botulinum* también han demostrado su capacidad de transmitir diferentes variantes conformacionales, pero aún no se ha podido confirmar si esta capacidad está relacionada con la transmisión de información (83, 84).

A pesar de que ya no hay dudas sobre la naturaleza exclusivamente proteica del agente infeccioso causante de las EETs, aún quedan muchos aspectos de la enfermedad por esclarecer como la determinación de la estructura de la PrP^{Sc}, el mecanismo molecular de conversión de PrP^C a PrP^{Sc} tanto en presencia como en ausencia de semilla, si hay algún cofactor más implicado en la conversión además de la propia PrP, la cascada de eventos que

culmina en neurotoxicidad, los determinantes estructurales del fenómeno de la aparición de cepas, así como qué determina la barrera de transmisión entre especies.

1.5 - Características y clasificación de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles humanas

Las EETs están íntimamente asociadas a la aparición y propagación de PrP^{Sc} en el SNC de los afectados. Su acumulación en forma de fibras amiloides puede producirse en diferentes áreas del encéfalo y con diferentes características bioquímicas, dando lugar a diferentes manifestaciones clínicas. Teniendo en cuenta todas estas características diferenciales, las EETs se clasifican en función de su etiología, rasgos clínicos, áreas afectadas y características bioquímicas de la PrP^{Sc}.

En función de su etiología, las EETs se clasifican en genéticas o familiares, que representan el 10-15 % de los casos; adquiridas, siendo aproximadamente un 5 % de los casos registrados; y esporádicas (putativamente espontáneas), siendo estas las mayoritarias con un 80-85 % de los casos. Las EETs familiares están directamente relacionadas con mutaciones autosómicas dominantes en el gen de la PrP (*PRNP*). Entre las enfermedades priónicas genéticas tenemos la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob genética (ECJg), el Insomnio Familiar Fatal (IFF) y el síndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS). Han sido descritas más de 50 mutaciones diferentes en el gen *PRNP* relacionadas con el desarrollo de alguna EET. Entre ellas existen mutaciones puntuales, PrPs incompletas debido a la aparición de codones de terminación prematuros o inserciones/deleciones en la zona de las octarepeticiones (85-88). Las EETs adquiridas se relacionan con la introducción exógena del agente infeccioso a través de diferentes prácticas médicas (EETs iatrogénicas) o por la ingestión de material contaminado. Algunos ejemplos de las EETs iatrogénicas serían los trasplantes de duramadre o córnea procedentes de donantes enfermos, el uso de material quirúrgico contaminado o el tratamiento con hormona del crecimiento obtenida a partir de hipófisis de cadáveres (89). Hasta el momento, únicamente han sido descritos en todo el mundo alrededor de 492 casos de ECJ con un origen iatrogénico. La mayoría están relacionados con el uso de hormona del crecimiento o implantes de duramadre contaminados con PrP^{Sc} (90). Aparte de la ECJ con origen iatrogénico, dentro de las EETs adquiridas también se incluyen otras dos enfermedades priónicas muy particulares cuyo origen se relaciona con la ingestión de material procedente de animales o individuos enfermos. Se trata de la variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJv), relacionada con la ingestión de carne o derivados contaminados con SNC de bóvidos con EEB y el Kuru, relacionada con las prácticas canibalísticas de los Fore. Finalmente, cabe destacar la existencia de 3 casos de ECJv contraídos a partir de transfusiones de sangre procedentes de donantes que más tarde desarrollaron ECJv (91). Las EETs esporádicas son las más comunes y no tienen ninguna

causa conocida. Dentro de estas enfermedades se incluye la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (ECJe), el Insomnio Fatal esporádico (IFe) y la Prionopatía con Sensibilidad Variable a Proteasas (VPSPr). Debido a que la aparición de estas patologías no se ha podido relacionar con ningún factor genético ni con la exposición a material biológico o quirúrgico infectado, se han propuesto diferentes teorías para intentar explicar la supuesta aparición espontánea de estas patologías. Diferentes experimentos realizados en primates y modelos murinos han demostrado la existencia de cierta transmisibilidad entre el Scrapie y la PrP^C humana, aunque hay que destacar la existencia de una fuerte barrera interespecie (92, 93). A pesar de estos datos experimentales, diferentes estudios epidemiológicos han sido incapaces de identificar una conexión clara entre la existencia de Scrapie y la prevalencia de las EETs espontáneas (94, 95). Otra explicación sería la existencia de mutaciones somáticas en el gen *PRNP* que favorecería el inicio de la enfermedad como ocurre en los casos genéticos (96), pero esta teoría tampoco ha sido confirmada.

Aunque la clasificación de las EETs atendiendo exclusivamente a su etiología resulta simple, cada uno de los tres grupos engloba síndromes diferenciados entre sí por sus síntomas, áreas del SNC afectadas y características bioquímicas de la PrP^{Sc} asociada a dicha enfermedad. Esta variabilidad se relaciona directamente con la existencia de diferentes cepas de priones humanos, estando estas íntimamente asociadas al origen del malplegamiento y a la existencia de polimorfismos en la PrP en la posición 129. Existen tres genotipos diferentes de este polimorfismo: homocigosis para metionina (M129M), homocigosis para valina (V129V) y heterocigosis (M129V) (97), afectando estos a las características de las diferentes cepas y a la mayor o menor susceptibilidad ante ellas. Un ejemplo claro de la importancia de este polimorfismo dentro de las EETs humanas es la posibilidad de desarrollar ECJg o IFF dependiendo del polimorfismo 129 cuando la mutación D178N se encuentra presente. En los casos en que esta mutación se asocia a la presencia del polimorfismo V129V, el paciente desarrollará ECJg, mientras que si la mutación está asociada a los polimorfismos M129M o M129V el paciente desarrollará IFF (19).

| <u>Etiología</u> | <u>Nombre de la enfermedad</u> |
|------------------------|--|
| EET genéticas | Enfermedad de Creutzfeldt Jakob genética (ECJg) Insomnio Familia Fatal (IFF) Enfermedad de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS) |
| EET adquiridas | Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénico (ECJi) Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob variante (ECJv) Kuru |
| EET esporádicas | Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádico (ECJe) Insomnio Familiar esporádico (IFe) Prionopatía con Sensibilidad variable a Proteasas (VPSPr) |

Tabla 1. Clasificación de las EET de acuerdo a su etiología.

A pesar de que los síntomas de estas enfermedades son muy similares a otras enfermedades neurodegenerativas, estos también juegan un papel importante en el diagnóstico diferencial de las EETs humanas. Entre los rasgos clínicos más comunes a todas las EETs humanas se incluyen: demencia, anomalías del habla y la marcha, problemas motores como mioclonos, temblores, rigidez y espasticidad, y cambios del comportamiento como agitación, confusión o depresión. Hacia el final del curso de la enfermedad los pacientes entran en estado de mutismo aquinético dejando de responder a estímulos externos. Algunos de los rasgos clínicos diferenciales entre las EETs humanas incluyen el insomnio o sueño interrumpido en el Insomnio Fatal, tanto en los casos genéticos como en los esporádicos, o la disimetría ocular en el síndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (98). Desde el inicio de los primeros síntomas hasta la muerte del paciente, siendo este el desarrollo inevitable de la enfermedad, transcurren entre cuatro meses y dos años, aunque el curso de la enfermedad y muchos de estos rasgos clínicos pueden variar entre las diferentes EETs (99). Destaca el caso del síndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker, cuya progresión se puede alargar entre 3 y 10 años (98).

1.6 - Importancia de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en la actualidad

Desde los inicios en la descripción de las EETs, estas han suscitado gran interés en la comunidad científica debido a las peculiares características del agente infeccioso y a factores económicos, ecológicos y de salud pública que implican. Sin embargo, debido a que las EETs humanas pertenecen a la categoría de enfermedades raras o poco prevalentes, estas se han mantenido relativamente desconocidas para la opinión pública durante una buena parte del siglo XX. Esta situación cambió radicalmente con la descripción de la primera, y única hasta el momento, zoonosis debida a la ingestión de carne procedente de animales con EEB, popularmente conocida como enfermedad de las vacas locas. Ya desde mediados de los ochenta se conocía esta enfermedad, que había sido descrita en 1985 en el Reino Unido (100). Poco después de la identificación de la EEB, estudios epidemiológicos demostraron que la infección estaba relacionada con el uso de piensos que contenían harinas cárnicas de animales infectados. Esta situación precipitó la prohibición del uso de harinas cárnicas provenientes de rumiantes para alimentar rumiantes en Julio de 1988. A pesar de ello, debido al largo tiempo de incubación de la EEB, muchos de los animales que habían ingerido piensos contaminados con harinas infectadas de EEB enfermaron durante el siguiente lustro. Esta prohibición fue seguida de otra con carácter preventivo que en 1989 prohibía la inclusión de tejidos de ganado bovino con alta carga del agente causal en la cadena de alimentación humana con la intención de proteger la salud pública. En 1995 se diagnosticó el primer caso de ECJ relacionado con la ingestión de material contaminado en un adolescente británico. Al

cabo de un año cuatro jóvenes más fueron diagnosticados. Esta nueva EET pasó a llamarse variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJv) y ya en 1997 quedó demostrada su relación directa con la EEB, considerándola una zoonosis proveniente de la última (101). Para el año 2006 ya se habían diagnosticado más de 300 casos de ECJv en Reino Unido e Irlanda del Norte, 16 en Francia, 3 en la República de Irlanda, 2 en Estados Unidos y 1 caso en Portugal, España, Italia, Países Bajos, Japón y Canadá, todos ellos países con casos de EEB previos. Sin embargo, las medidas tomadas para controlar la enfermedad acabaron surtiendo efecto y desde 2011 solo se han diagnosticado dos casos, uno en 2013 y otro en 2016 (dato de National CJD Research and Surveillance Unit, Universidad de Edimburgo, 2017), siendo el último de especial importancia ya que se trata del primer caso de ECJv diagnosticado en un paciente con polimorfismo M129V en el gen *PRNP* (102). Previamente, todos los casos diagnosticados de esta EET humana poseían el polimorfismo M129M, evidenciando la mayor susceptibilidad de este polimorfismo a la infección por EEB (103). Datos experimentales utilizando ratones transgénicos que expresan la PrP humana con las tres posibles combinaciones del polimorfismo inoculados con el agente causal de la EEB han demostrado que el polimorfismo M129M es el más susceptible, seguido por el heterocigoto M129V (92). Estos datos, sumados a la descripción de dos casos subclínicos de ECJv con polimorfismo M129V (104) y al hecho de que se estima que 1 de cada 2.000 individuos en el Reino Unido fueron infectados (105), no hacen sino aumentar las sospechas de que una posible segunda ola de casos de ECJv en combinación con el polimorfismo M129V pueda comenzar en un futuro próximo.

Otra EET que ha suscitado gran interés en la comunidad científica debido a su importancia económica y a su prevalencia en el ganado ovino durante siglos, es el Scrapie, siendo una de las EETs animales más estudiadas. Se estima que dentro de las cabañas de ganado ovino de Reino Unido y los Países Bajos el porcentaje de incidencia de Scrapie en la década de los noventa llegó a alcanzar el 0,37 % y el 1,2 %, respectivamente (106, 107). Además, una vez que la enfermedad aparece se extiende rápidamente por el rebaño con un alto grado de mortalidad (108), lo que supone grandes pérdidas económicas. Sin embargo, a raíz de la descripción de la ECJv como una zoonosis debida a un salto de especie de la EEB a los seres humanos, el control sobre el Scrapie aumentó en gran medida. Hoy en día y gracias a las medidas de control adoptadas, se estima que en Estados Unidos la prevalencia de esta enfermedad se ha reducido un 99 % desde 2003 hasta los datos obtenidos en 2016 (datos de la United States Department of Agriculture, 2017). A pesar de estos datos, los programas de vigilancia siguen activos con el objetivo de mantener el Scrapie fuera de la cadena alimenticia, ya que todavía no está totalmente descartada la posibilidad de transmisión a los seres humanos (92, 93).

La ECD de los cérvidos también ha supuesto una parte importante de los esfuerzos de la comunidad científica en este campo en los últimos años. En este caso, y a diferencia de la EEB o del Scrapie, no destaca tanto el riesgo para de salud pública o la importancia económica de esta, si no el gravísimo riesgo ecológico que esta podría suponer en el futuro próximo. Se trata de la única EET descrita en animales salvajes, afectando a varias especies de cérvidos. En la actualidad está descrita en ciervo mula (*Odocoileus heminous*), ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), reno (*Rangifer tarandus*) y alce (*Alces alces* y *Cervus elaphus*) (109). Su origen se localiza en animales cautivos de Wyoming y Colorado en la década de los 60, identificándose algunos años después en animales salvajes (110). Desde entonces se ha extendido rápidamente por las poblaciones salvajes de cérvidos de Estados Unidos, donde se ha identificado en 24 estados, además de Canadá, Korea del Sur (111) y, recientemente, Noruega (112). Se estima que, en las zonas afectadas, la sufren en torno al 5 % de los animales en estado salvaje, aunque se ha reportado que puede llegar a afectar hasta el 50 % en algunas zonas (109). El principal riesgo de esta enfermedad y la causa de su rápido avance en las poblaciones de cérvidos es la alta carga infectiva presente en orina y heces, incluso en periodos presintomáticos (113-115). También se ha demostrado la persistencia de EDC-PrP^{Sc} en suelos (116) y agua (117) de zonas endémicas, lo que facilita la diseminación de la enfermedad, suponiendo una grave amenaza para las poblaciones de cérvidos en América, Korea y Europa. Además, las posibles implicaciones que puede tener la existencia de priones en el medio ambiente durante largos periodos de tiempo son desconocidas, pudiendo afectar a otras especies de mamíferos que cohabitan estas zonas y suponiendo un posible riesgo para la salud pública debido a su potencial zoonótico. Experimentos realizados en macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*) (118) y ratones transgénicos que sobreexpresan la PrP^C humana (119) han demostrado la existencia de una fuerte barrera interespecie con los seres humanos, aunque no descartan completamente el posible riesgo de transmisión. Por ejemplo, la inoculación de monos ardilla con ECJ (*Saimiri sciureus*) ha demostrado ser más efectiva que en el caso de los macacos cangrejeros (120). Sin embargo, datos publicados en 2018 por el grupo de Chesebro y colaboradores demuestran la ausencia de infectividad en *Macaca fascicularis* transcurridos 13 años desde la inoculación de estos con ECD (121).

2 - PrP^C, PrP^{Sc} y el mecanismo de conversión

Hace más de tres décadas que se identificó el gen que codifica la proteína del prion, el gen *PRNP* (42), de copia única y cuyo marco de lectura abierto (ORF, del inglés *Open Reading Frame*) está contenido en un solo exón en todas aquellas especies de mamíferos en las que se ha estudiado (97). El gen se encuentra en el brazo corto del cromosoma 20 en humanos y en la región homóloga del cromosoma 2 en ratón, el primero formado por dos exones con el

ORF codificado en el segundo, mientras en ratón, oveja, vaca o rata se han detectado tres exones, estando codificado el ORF en el tercero (122). También se han identificado genes homólogos al gen *PRNP* en varias especies de aves (123), peces (124), anfibios (125) y reptiles (126), aunque la similitud de estas proteínas priónicas con la PrP de mamíferos es baja (127).

2.1 - PrP^C

Tanto la PrP^C como la PrP^{Sc} están codificadas en el mismo gen, estando ambas constituidas por la misma estructura primaria. La proteína está formada por 250 aminoácidos, entre los que se incluye un péptido señal de 22 aminoácidos de longitud en el extremo N-terminal que dirige la PrP hacia la membrana plasmática y otro de 19 aminoácidos en el extremo C-terminal que codifica la adición de un anclaje de Glicosilfosfatidilinositol (GPI, del inglés *Glycosylphosphatidylinositol*). Ambos extremos son eliminados durante el procesamiento post-traducciona, conformándose una proteína extracelular de 212 aminoácidos anclada a la membrana plasmática. Su expresión comienza en fases tempranas de la embriogénesis, siendo ubicua por todo el organismo, aunque los mayores niveles de expresión los encontramos en el SNC. Dentro de este tejido, las neuronas son las que más cantidad de PrP^C presentan en su membrana plasmática, aunque también es común encontrarla en las células gliales (128). El proceso de expresión comienza en los ribosomas asociados al retículo endoplasmático, siendo transportada a continuación al aparato de Golgi. A partir de ahí, la proteína viaja hasta la membrana plasmática, donde se acumula en las balsas lipídicas a través del anclaje mediante GPI (97).

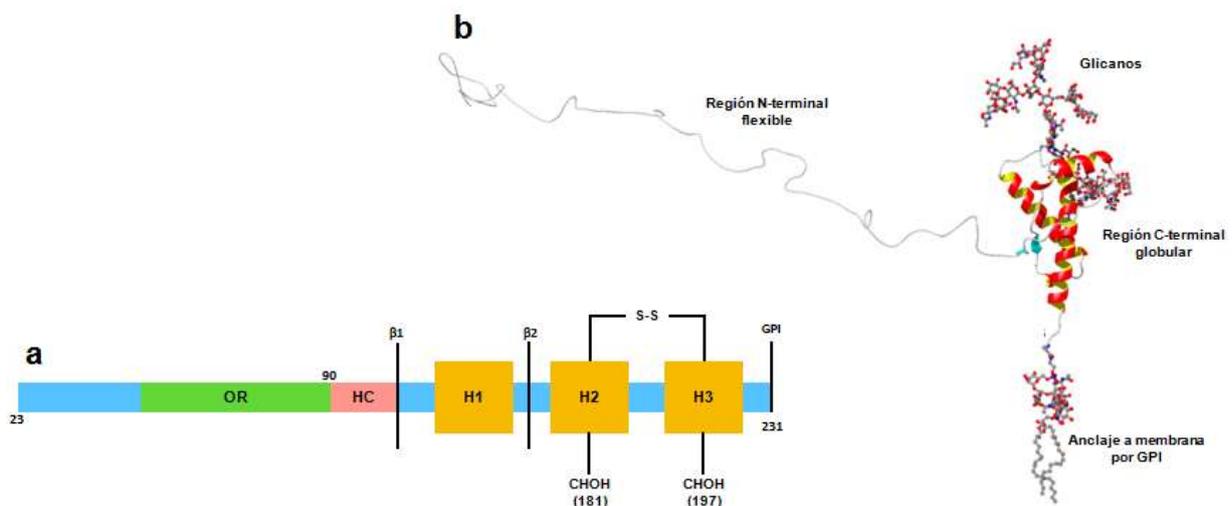


Figura 3. Representación esquemática de la PrP^C y estructura de la PrP^C resuelta por RMN. a) Representación esquemática de los diferentes dominios de la PrP^C. Los números hacen referencia a la posición del aminoácido. En la región N-terminal existe un péptido señal que dirige a la PrP^C hacia la membrana plasmática hasta la posición 23 (no aparece en la imagen). A continuación le sigue la región de las octarepeticiones y la zona rica en aminoácidos con carácter hidrofóbico. Ya en el dominio globular aparecen las dos regiones estructuradas en forma de lámina-β y las tres regiones estructuradas en forma de α-hélice. Dentro de la zona globular también aparecen esquematizados el puente disulfuro entre las posiciones 179 y 214, las asparaginas en las que se apoyan los glicanos, con su posición escrita entre paréntesis y el anclaje a GPI en el aminoácido 231. Por último, tenemos una región de 19 aminoácidos que codifica el anclaje a GPI (no aparece en la imagen). OR: Región de octarepeticiones. HC: Región hidrofóbica. β1 y β2: Regiones estructuradas en lámina-β 1 y 2. H1, H2 y H3: Regiones estructuradas en α-hélice 1, 2 y 3. CHOH: Grupo carboxilo de las asparaginas 181 y 197 a los cuales se unen los glicanos. GPI: Anclaje de Glicofosfatidilinositol a la membrana plasmática. **b)** Representación de la estructura terciaria de la PrP^C deducida a través de RMN. Se puede diferenciar la región N-terminal no estructurada y flexible de la región C-terminal globular y estructurada. Las estructuras en lámina-β aparecen de color turquesa y las estructuras en α-hélice aparecen de color rojo. (Imagen **b** modificada de Gill 2017).

Una gran parte del extremo N-terminal de la proteína, en concreto desde la posición 23 a la 124 en humanos, está articulada en un dominio flexible muy poco estructurado. En esta parte de la proteína se puede resaltar la presencia de las octarepeticiones (OR, del inglés *Octapeptide Repeats*), una zona conformada por cuatro o cinco repeticiones, dependiendo de la especie, de una secuencia variable de ocho aminoácidos (129). La zona de OR, además de estar altamente conservada entre todos los mamíferos se relaciona con algunas EETs genéticas (130), lo que ha suscitado la atención de varios grupos de investigación. También se la relaciona con alguna posible función fisiológica de la PrP^C donde estaría implicada la activación de señales. Se ha demostrado la interacción de esta zona con diferentes cationes metálicos bivalentes, principalmente el Cu²⁺ (131), y a otras moléculas como el heparán sulfato. Flanqueando la región de OR hay dos pequeñas zonas cargadas positivamente conocidas como CC1 y CC2 (del inglés *Charged Cluster*). Además del dominio desestructurado en el N-terminal previamente mencionado, la proteína priónica está conformada por un dominio globular en el extremo C-terminal y un conector entre ambas partes con una alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos conocido como HC (del inglés *Hydrofobic Core*).

En la zona globular altamente estructurada localizada en el extremo C-terminal se identifican diferentes dominios de gran importancia. La mayoría de las mutaciones relacionadas con el desarrollo de una EET se encuentran en esta zona (132), estando además altamente conservada en todos los mamíferos, tanto en su estructura primaria como secundaria. La zona consta de dos pequeñas regiones conformadas en lámina-β separadas por una región en hélice-α. La segunda región de lámina-β se continúa con otras dos regiones en hélice-α (133, 134). También aparece un puente disulfuro entre las cisteínas localizadas en las posiciones 179 y 214 y dos asparaginas en las posiciones 181 y 197 que pueden estar o no glicosiladas, dando lugar a las diferentes variantes de proteína priónica conocidas como PrP^C no glicosilada, monoglicosilada o diglicosilada. Estos glicanos suelen presentar cantidades elevadas de ácidos siálicos en su composición y, aunque con evidencias limitadas, parecen estar implicados en el proceso de propagación (135-137). Tampoco está

completamente demostrada la implicación de los glicanos en otras características biológicas de los priones. Aun así, es común utilizar las proporciones de proteína no glicosilada, monoglicosilada y diglicosilada para distinguir y caracterizar diferentes cepas priónicas.

Otra característica remarcable de la PrP^C madura es el anclaje de esta a la membrana plasmática mediante GPI. Este hecho es relativamente común en las células eucariotas, donde el 10-20 % de las proteínas de membrana presentan este tipo de anclaje. Se trata de un proceso complejo que ocurre en el retículo endoplasmático y está iniciado por un péptido señal, el cual es sustituido por un GPI preformado. En el caso de la PrP^C este se añade en la posición 231, el último aminoácido presente en la PrP^C madura. Todos los GPI comparten una estructura muy conservada formada por una etanolamina fosfato unida al C-terminal de la proteína mediante un enlace amida, un núcleo glicano de tres residuos de manosa, glucosamina, un grupo fosfatidilinositol y colas fosfolipídicas que anclan el GPI a la membrana plasmática (138). Debido al gran número de funciones que ejercen las proteínas ancladas a membrana por GPI no se puede establecer una función para la PrP^C específicamente relacionada con la presencia de este tipo de anclaje, aunque sí se le atribuye cierta implicación en el proceso de propagación, así como en el desarrollo de la patología priónica. Al ser el GPI el responsable de la acumulación de la PrP^C en las balsas lipídicas la alteración del GPI mediante diferentes mutaciones causa una alteración en la localización de la PrP^C en la membrana, lo que provoca una reducción en la propagación de la PrP^{Sc} (139). Un efecto similar se observa si alteramos las balsas lipídicas mediante compuestos que modifican estas zonas de la membrana (138). También existen ratones transgénicos que expresan una PrP^C sin anclaje por GPI a membrana, mostrando en este caso altos niveles de placas de PrP^{Sc} al ser inoculados con priones murinos, pero con reducidos niveles de neurotoxicidad (140). Este dato parece indicar que *in vivo* el GPI juega un papel más relacionado con el desarrollo de la patología que con la propagación propiamente dicha. La separación entre propagación y neurotoxicidad que existe en las enfermedades priónicas es un tema que trataremos más adelante en esta tesis doctoral, pero que conviene adelantar debido a su relación con el anclaje a GPI. Dos fenómenos independientes se dan lugar en el desarrollo de este grupo de enfermedades: i) la conversión de PrP^C a PrP^{Sc}, también llamada propagación y ii) la neurotoxicidad, en la que el anclaje a GPI parece jugar un papel importante según los experimentos de Chesebro y colaboradores.

Una de las mayores incógnitas relacionadas con la PrP^C es conocer su función fisiológica. Se han desarrollado diferentes modelos animales carentes de PrP^C, no observándose en ningún caso un cambio fenotípico claro que los pudiera diferenciar de animales con PrP^C, salvo la resistencia total a la infección por priones (141). Además, la ausencia de PrP^C no solo afecta al proceso de propagación, sino que también afecta al proceso de neurotoxicidad (140). Otro experimento que evidencia la necesidad de PrP^C para mediar el proceso neurotóxico se

realizó utilizando animales *PRNP*^{-/-} a los que se les había implantado un injerto en el SNC procedente de un animal que expresaba la PrP^C normalmente. Los niveles de PrP^{Sc} eran los mismos en todo el sistema, sin embargo, solo se pudieron observar daños por neurotoxicidad en el injerto (142). Por lo tanto, parece claro que una de las funciones de la PrP^C sería la mediación de la neurotoxicidad provocada por la infección por priones, pero su relación con la neurotoxicidad no acaba aquí. También se ha relacionado con la neurotoxicidad asociada a la propagación del β -amiloide. Esta proteína agrega en un modo similar al que ocurre con la PrP^{Sc}, proceso que se relaciona directamente con la enfermedad de Alzheimer. Estudios realizados en modelos celulares N2a *PRNP*^{-/-} han demostrado ser más resistentes a la muerte neuronal provocada por las fibras de β -amiloide. Además, al añadir PrP recombinante en el medio, esta se unía a las fibras y evitaba la unión de estas a cultivos celulares que sí expresaban el gen *PRNP*, reduciendo así la muerte celular (143). Resultados similares se han conseguido utilizando el modelo *Drosophila*. En este caso se sobreexpresan en el mismo animal la proteína APP (del inglés, *Amyloid Precursor Protein*), precursora de la proteína que se acumula en forma de β -amiloide, y la PrP^C ovina. En estos animales se observa un deterioro cognitivo claro respecto a los controles que expresan solo una de las dos proteínas (144). Otros grupos de trabajo también han logrado reducir la propagación de las fibras de β -amiloide utilizando péptidos de PrP, demostrando así la unión de estos a las fibras de β -amiloide (145). Una relación similar se ha observado entre las fibras de α -sinucleína, relacionadas con la enfermedad de Parkinson, y la PrP^C (146). A pesar de que esta función de la PrP^C en neurotoxicidad es clara no parece probable que esta sea su única función debido al alto grado de conservación que presenta a lo largo de la evolución en los diferentes grupos animales en los que aparece. Parece más probable que la relación entre PrP^C y neurotoxicidad podría deberse más a un proceso de alteración de la actividad de esta proteína en una situación fisiológica normal que a un efecto intrínseco a esta. Conocer la función fisiológica de esta proteína podría ser clave para un mejor entendimiento del proceso de toxicidad en las EETs y otras enfermedades neurodegenerativas.

Se han llevado a cabo diversos estudios encaminados a la identificación de la función fisiológica de la proteína PrP^C desde el conocimiento de esta hace ya dos décadas. Los primeros estudios se realizaron utilizando principalmente modelos animales carentes de PrP^C y diferentes experimentos de identificación de moléculas que interaccionan con la PrP^C. Sin embargo, el desarrollo de diferentes modelos en los últimos años ha incrementado nuestro conocimiento sobre la función de la proteína. Entre las diferentes funciones atribuidas a esta tenemos la adhesión celular, desarrollo de neuritas, excitabilidad neuronal, neurogénesis, citotoxicidad, citoprotección, actividad como canal iónico, regulación del sistema inmunológico y regulación de los niveles de hierro y cobre (147-152). Aun así, muchas de estas funciones se han detectado en modelos muy concretos y necesitan ser validadas para poder asegurar que una o más de estas son funciones fisiológicas de la PrP^C. Además, los mecanismos

moleculares que rigen estas funciones se desconocen, por lo que siguen sin ser útiles a la hora de determinar sus funciones con seguridad (153). Por el contrario, sí se ha relacionado directamente la PrP^C con la cascada controlada por la proteína Notch, que está íntimamente ligada con la formación y desarrollo del tubo neural, demostrándose como animales sin PrP^C presentan alteraciones en la expresión de Notch a lo largo del desarrollo (154). También cuenta con claras evidencias a favor su posible función en la conservación de la vaina de mielina periférica mantenida por las células de Schwann. Tras la ablación del gen *PRNP* en varias cepas de ratón se demostró el desarrollo de una polineuropatía desmielinizante crónica (155, 156).

2.2 - Mecanismo de conversión a PrP^{Sc}

Como ocurre con muchos de los aspectos centrales de la biología de los priones, el mecanismo de conversión a PrP^{Sc} no es del todo conocido. De acuerdo con la teoría de “solo proteína”, el proceso se produce exclusivamente mediante un malplegamiento proteico que ocurre de forma auto-catalítica. Este proceso de propagación es el responsable del acúmulo de PrP^{Sc} en forma de fibras amiloides, que a su vez se organizan en placas en el SNC de los individuos afectados. Una de las diferencias entre la PrP^C y la PrP^{Sc} que se puede destacar es la diferencia en la estructura secundaria, es decir, la cantidad de estructura en forma de hélice- α o lámina- β . En el caso de la PrP^C el porcentaje es $\sim 40\%$ de hélice- α y $\sim 3\%$ de lámina- β , estando el resto conformado en zonas desestructuradas y giros. En cambio, los valores en la PrP^{Sc} son radicalmente diferentes, teniendo ausencia total de hélice- α y $\sim 75\%$ de lámina- β , siendo el resto zonas desestructuradas o giros (157). Estudios biofísicos previos indicaban que la PrP^{Sc} podría tener una parte de su estructura en forma de hélice- α , pero este dato ha sido más tarde descartado gracias al uso de técnicas biofísicas cada vez más sofisticadas como la resonancia magnética nuclear (RMN) en estado sólido (158). Otras características diferenciales de la PrP^{Sc} son su insolubilidad en detergentes no iónicos (48) y su resistencia parcial a la digestión por PK (49). Estas dos características son ampliamente utilizadas para la diferenciación, identificación y purificación de la PrP^{Sc}. Tras el tratamiento con PK se eliminan, aproximadamente, los primeros 90 aminoácidos de la PrP^{Sc}. Este número depende en gran medida de la compactación del núcleo de la fibra amiloide y varía de una cepa a otra (159). Sin embargo, se acepta que, en general, se mantiene intacto un núcleo de 27-30 kDa, a diferencia de la proteína completa que tiene un peso molecular de 33-35 kDa. La solubilización de este núcleo resistente en liposomas mantiene su capacidad infectiva, indicando así que no es la estructura amiloide la que porta la capacidad infectiva, si no los oligómeros de PrP^{Sc}. Estos por si solos forman los centros de nucleación para la propagación de los priones (160). En concreto, el oligómero formado por 14-28 moléculas de PrP^{Sc} es la partícula más infectiva, según estudios realizados por Silveira y colaboradores. En este experimento se desagregó parcialmente la PrP^{Sc} y luego se sometió a un proceso de

separación de acuerdo al tamaño de las partículas. Así pudieron observar que las partículas que portaban mayor infectividad eran las de 300-600 kDa, es decir, los oligómeros de los tamaños anteriormente mencionados (161).

Diferentes experimentos han demostrado que existe una interacción directa entre la PrP^C y la PrP^{Sc} y que esta es importante para el proceso de propagación. Por ejemplo, el llevado a cabo por Meier y colaboradores, en el que se expresaba una PrP soluble dimérica (162) u otro de Prusiner y colaboradores, donde se expresaban en el mismo modelo animal la PrP de ratón y de hámster (163). Sin embargo, este complejo PrP^C/PrP^{Sc} nunca se ha podido aislar, por lo que su existencia se mantiene en entredicho (97). Un hecho para tener en cuenta a la hora de determinar esta interacción es el fenómeno de salto de especie que trataremos más adelante. A pesar de que la secuencia primaria de la PrP^C en diferentes especies está altamente conservada, existen ciertas diferencias entre las secuencias de unas especies y de otras. Esto se traduce en una dificultad para malplegar una PrP^C con una secuencia aminoacídica diferente a la PrP^{Sc} con la que está interaccionando. Un estudio realizado *in vitro* utilizando PrP de hámster y de ratón confirmó este hecho demostrando que, aunque la interacción inicial entre ambas PrPs de diferentes especies ocurre, la tasa de conversión está reducida respecto a una interacción entre dos PrPs de la misma especie. Dicho de otra forma, se ve más afectado el proceso de malplegamiento que la interacción inicial entre la PrP^C y la PrP^{Sc} cuando se trata de diferentes especies (164).

Debido al conocimiento limitado que tenemos de esta interacción y de sus principales características y teniendo en cuenta la hipótesis de “solo proteína”, se han descrito dos modelos para esta interacción:

Modelo de conversión inducida por molde

En este modelo, el malplegamiento estaría provocado por una interacción directa entre la PrP^C y la PrP^{Sc}, actuando la última como molde para transformar a la primera. Una conversión directa de PrP^C a PrP^{Sc} sin la mediación como molde de la PrP^{Sc} no podría ocurrir debido a una alta barrera de energía entre ambas estructuras. Debido a la existencia de EETs genéticas y esporádicas, un malplegamiento inducido por molde por sí solo no podría explicar estos fenómenos, ya que sería necesaria la aparición de PrP^{Sc} sin que proviniera de una fuente externa que inicie el proceso de malplegamiento. Por ello, se hace necesaria la adición de un estado conformacional conocido como PrP*. Este sería un estado intermedio entre la PrP^C y la PrP^{Sc} cuya formación estaría catalizada por la unión entre una proteína X y la PrP^C. La interacción entre PrP* y la PrP^{Sc} o entre dos unidades de PrP* conduciría a la formación de un homodímero de PrP^{Sc}. De esta forma podemos explicar la existencia de EETs genéticas

como una tendencia de la PrP^C a transformarse a PrP^{*} más alta debido a una mutación en el gen *PRNP* que reduce la estabilidad de la PrP^C. Según aumenta la cantidad de PrP^{*} es más fácil que se formen homodímeros de esta, los cuales terminarían malplegando y formando homodímeros de PrP^{Sc}. En el caso de las EETs esporádicas el proceso se inicia por la formación, altamente infrecuente, de un homodímero de PrP^{*}, que luego evoluciona a un homodímero de PrP^{Sc}. También se podría explicar la aparición espontánea de PrP^{Sc} a través de una mutación somática que aumenta la probabilidad de aparición de PrP^{*}, como ocurre con las EETs genéticas (49).

Modelo de nucleación-polimerización

En este modelo la PrP^C y la PrP^{Sc} se encuentran en un equilibrio termodinámico reversible en solución. Debido a la baja estabilidad de la PrP^{Sc} en su forma monomérica esta tiende a formar agregados, desplazando el equilibrio termodinámico hacia la formación de PrP^{Sc} conforme se van sumando al núcleo de agregación unidades de esta (165). El proceso se divide en dos fases: una primera fase conocida como fase de latencia, en la que el proceso es muy lento y se va formando un núcleo o semilla inicial, seguida de una fase de crecimiento exponencial en el que nuevas PrP^{Sc} monoméricas van siendo reclutadas al núcleo en expansión. Conforme el agregado aumenta de tamaño ocurre una fragmentación de este generando varios núcleos, los cuales a su vez pasan a la fase de crecimiento exponencial. De esta forma se favorece la cada vez más rápida propagación del agente.

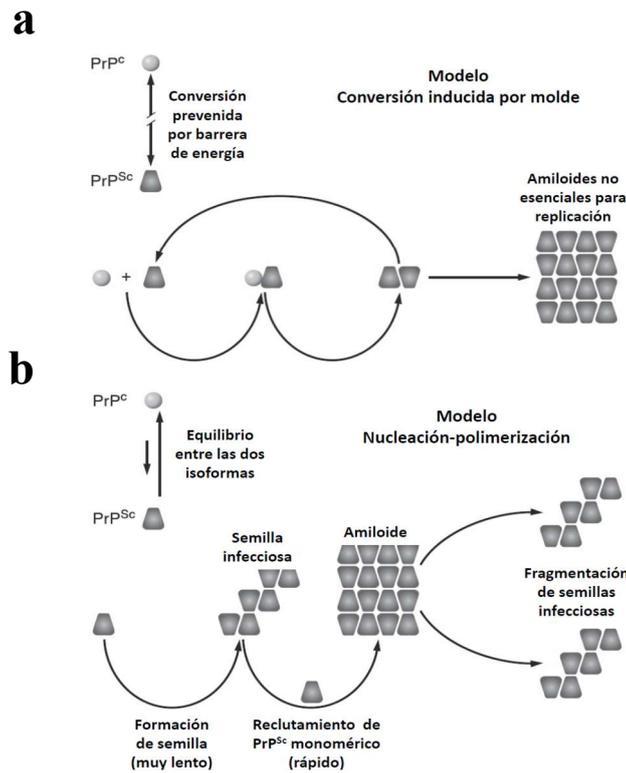


Figura 4. Representación esquemática de los modelos de conversión de priones.
a) Modelo de conversión inducida por molde. **b)** Modelo de nucleación-polimerización.
 (Modificado de Calella 2009).

Hasta la actualidad ninguno de los modelos ha podido ser confirmado o revocado, ya que existen pruebas tanto a favor como en contra para ambas teorías. Por ejemplo, la conocida como proteína X, una parte importante del modelo de conversión inducida por molde, nunca ha podido ser identificada. En un principio se le atribuyó una naturaleza proteica, sin embargo, la obtención de priones recombinantes *in vitro* utilizando componentes altamente definidos y purificados (75) demostró que este factor X podría tratarse de otra macromolécula que no formaría parte del agente infeccioso. Este factor X actuaría únicamente como asistente de la conversión. Otros indicios a favor de la teoría de conversión inducida por molde es la demostración mediante experimentos *in vitro* de la existencia de un estado conformacional intermedio entre la PrP^C y la PrP^{Sc} que se correspondería con la PrP* (137, 166). Sin embargo, otras evidencias apoyan el modelo de nucleación-polimerización frente al de conversión inducida por molde. Entre ellas destacamos los modelos matemáticos (167) y los datos cuantitativos obtenidos en diferentes ensayos de conversión libre de células. En estos últimos se demuestra la necesidad de oligómeros mayores que el dímero de PrP^{Sc} que, según el modelo de conversión inducida por molde, iniciaría la propagación (161). También se han caracterizado morfológicamente los agregados como polímeros no ramificados y de diámetro relativo constante (168).

2.3 - PrP^{Sc}

Aunque hoy en día se dispone de muchos datos acerca de las características estructurales, biológicas y bioquímicas de la PrP^{Sc}, su estructura tridimensional y su papel en la neurotoxicidad o en otros procesos en los que está implicada aún no están totalmente descritos.

Estructura amiloide

La estructura tridimensional de los oligómeros o polímeros de PrP^{Sc} es uno de los campos de investigación más intensos y que mayor atención han reclamado en los últimos años. A pesar de los múltiples intentos, varios eventos han imposibilitado la obtención de una estructura tridimensional a nivel molecular de la PrP^{Sc}. Entre ellos destacamos la existencia de polímeros de diferentes tamaños en equilibrio dinámico, lo que dificulta el estudio de la unidad básica de PrP^{Sc} (161). Además, la alta heterogeneidad de las muestras debida a la existencia de formas no glicosiladas, monoglicosiladas y diglicosiladas dificulta el uso de técnicas como la Cristalografía de rayos X o la RMN (169). Su naturaleza hidrofóbica también supone un importante obstáculo, ya que esta es requerida en la mayoría de los estudios estructurales. Sí se puede conseguir una forma soluble utilizando detergentes, pero en estas condiciones se compromete la infectividad de la PrP^{Sc}, con lo que la estructura estudiada podría no corresponderse con la estructura infectiva real (160). Además, la purificación de la PrP^{Sc} a partir de encéfalo es muy complicada, obteniéndose muestras que suelen estar contaminadas con otras proteínas, lípidos o ácidos nucleicos (170), lo que aumenta la viscosidad de la muestra.

Basados en la información obtenida hasta el momento se han confeccionado varios modelos teóricos de la estructura de las fibras de PrP^{Sc}. Aunque en un principio se incluían en la estructura de la PrP^{Sc} diferentes cantidades de hélice- α dependiendo de la técnica utilizada, estudios posteriores han demostrado que la presencia de hélice- α se trataba de un artefacto, quedando demostrado que la PrP^{Sc} está formada exclusivamente por lámina- β , con rangos variables dependiendo de la técnica biofísica utilizada (157). La proteólisis limitada también ha ofrecido pistas acerca de la estructura de la fibra, informándonos de cuáles son las zonas más expuestas de la estructura (171). Otra técnica valiosa a la hora de determinar la estructura de la PrP^{Sc} es el mapeo por epítomos accesibles utilizando anticuerpos monoclonales. Esta técnica nos ha permitido, por ejemplo, conocer la existencia de un núcleo altamente resistente que engloba desde la posición 90 hasta la 120 o el reconocimiento de zonas fácilmente accesibles en el núcleo C-terminal (152-163 y 225-231) (172). La microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *Transmission Electronic Microscopy*)

(173), la microscopía de fuerza atómica (AFM, del inglés *Atomic Force Microscopy*) (174) y recientemente la criomicroscopía electrónica (175) también ha aportado valiosos datos sobre la estructura de las fibras de PrP^{Sc}. Utilizando protocolos de purificación exhaustivos se pueden obtener imágenes nítidas de las llamadas varillas priónicas (*prion rods*, en inglés), las cuales nos permiten determinar ciertas características estructurales. Aunque la obtención de cristales de PrP^{Sc} no ha podido ser posible, la determinación de ciertas características de estas fibras se han identificado usando cristalografía de rayos X, obteniéndose patrones de difracción de baja resolución (176). Por ejemplo, se ha identificado la existencia de un patrón en cross-β. Este motivo cross-β se define como el apilamiento de laminas-β perpendicularmente al eje de la fibra y es muy común en las fibras amiloides, aunque en el caso de la PrP^{Sc} se han observado importantes diferencias respecto a otras fibras (177). Finalmente habría que destacar la RMN en estado sólido, que nos ha aportado un buen número de pistas acerca de la estructura tridimensional de la PrP^{Sc}. Estudios realizados por Jaroniec y colaboradores utilizando la cepa Y145Stop, una cepa generada *in vitro* e infectiva *in vivo* que lleva una mutación que se relaciona con GSS en humanos, en combinación con RMN de estado sólido han demostrado la existencia de un núcleo formado por laminas-β que abarca desde la posición 112 a la 139-141, dependiendo de la especie (178). Otros estudios también han utilizado PrP de tamaño completo, malplegada *in vitro* e infectiva *in vivo*, dándonos por tanto información más completa acerca de la estructura de la PrP^{Sc}. En este caso se observa un núcleo formado totalmente por la laminas-β en el extremo C-terminal de aproximadamente 155 aminoácidos, aunque lamentablemente no se pudo determinar la localización exacta de estas laminas-β (179). Otra modalidad de la RMN es la RMN de estado sólido paramagnética, en la que se utilizan elementos paramagnéticos unidos a determinadas zonas de la proteína, pudiendo estudiar así esas zonas con más detalle. El procedimiento consiste en incubar la muestra en presencia de Cu²⁺, un metal paramagnético. El Cu²⁺ tiende a unirse a las estructuras más superficiales de la PrP^{Sc}, permitiéndonos determinar qué aminoácidos están más expuestos en la fibra. En el caso de la cepa Y145Stop se determinó que los aminoácidos en forma de lámina-β a más expuestos se encuentran en las posiciones 113, 114, y 130-141, mientras que las posiciones 115-127 formarían el núcleo de la fibra (180). La técnica de intercambio hidrógeno-deuterio acoplada a la espectroscopía de masas o a la RMN es otra técnica útil en el estudio de las estructuras amiloides. En este caso se va observando cómo, a lo largo del tiempo, los átomos de hidrógeno de la estructura se van intercambiando por los átomos de deuterio presentes en el entorno. Así podemos determinar qué aminoácidos están más expuestos en la estructura. Un experimento utilizando esta técnica con priones purificados de cerebro ha demostrado la existencia de un núcleo muy empaquetado en forma de laminas-β a partir de la posición 90 y hasta la zona C-terminal. Además, también se pudo observar que existía cierta variación entre las posiciones 90 y 140

cuando se utilizaban diferentes cepas, confirmando así que diferentes cepas equivalen a diferentes estructuras de la PrP^{Sc} (181).

La recopilación de todos estos datos obtenidos por técnicas de baja resolución ha permitido la generación de varios modelos teóricos para la estructura de las fibras de PrP^{Sc}. Varios de ellos incluyen hélices- α en su estructura, pero debido a que hoy en día se acepta que la estructura de la PrP^{Sc} está formada únicamente por laminas- β (157), aquí solo se mostrarán los modelos que incluyen exclusivamente laminas- β en su estructura.

Modelo hélice- β

Este modelo determina la estructura de la PrP^{Sc} como una hélice- β , es decir, una hélice formada por laminas- β entrelazadas de forma anti-paralela con una altura de 38.4 Ångstroms (Å), lo que equivale a ocho laminas- β (182). Ninguna estructura proteica conocida se asemeja a esta (183). Además, los datos de difracción de rayos X descartan que la altura de las moléculas de PrP^{Sc} pueda ser de 38.4 Å (184), por lo que este modelo se considera hoy en día como muy poco probable.

Modelo de lámina- β paralela en registro

En este caso el modelo propone una estructura formada por laminas- β paralelas que se disponen en registro, permitiendo un crecimiento infinito de las fibras. La PrP^{Sc} está formada únicamente por laminas- β plegadas sobre sí mismas de forma que cada molécula de PrP^{Sc} aporta una altura de 4.8 Å a la estructura (185). Este modelo se basa principalmente en datos obtenidos por intercambio de hidrógeno-deuterio utilizando PrP recombinante. Otro experimento en el que se utilizó RMN de estado sólido y estudios *in silico* de dinámica molecular (MD, del inglés *Molecular Dynamics*) también respalda este modelo, aunque los priones utilizados en este estudio no son infectivos *in vivo* (158). También se han realizado estudios con PrP²⁷⁻³⁰ purificada a partir de ratones transgénicos sin GPI que indican que este modelo podría ser el más parecido a los priones que pueden encontrarse en encéfalos de individuos afectados (181). Datos afines a este modelo también se han descrito utilizando la cepa Y145Stop en combinación con RMN de estado sólido (180, 186). Una de las críticas más importantes a este modelo sería su incapacidad para explicar la existencia de una señal repetitiva de 19.2 Å detectada por difracción de rayos X y que no debería aparecer si este modelo fuera el correcto al estar formado por unidades repetitivas de 4.8 Å idénticas entre sí (157).

Modelo de laminas- β en solenoide de cuatro pisos

Este modelo se basa principalmente en datos de difracción de rayos X, de criomicroscopía electrónica y de proteólisis limitada. El modelo se define como una estructura formada por laminas- β enrolladas sobre sí mismas en un solenoide de cuatro niveles. Cada PrP^{Sc} formaría cuatro niveles en el solenoide, colocándose unas unidades de PrP^{Sc} sobre otras formando un protofilamento. Esta estructura repetida formaría a su vez una fibra al relacionarse con otro protofilamento formando una hélice (175). Anteriormente se habían realizado varios intentos utilizando difracción de rayos X para obtener información acerca de la estructura de la PrP^{Sc}, pero debido a dificultades técnicas no se había conseguido demasiada información. Sí se pudo confirmar la existencia de las unidades repetitivas de 4.8 Å típicas de las fibras amiloides, aunque no sin cierta dificultad (187). Wille y colaboradores utilizando PrP²⁷⁻³⁰ altamente purificada a partir de cerebros de ratón y fuente de rayos X más potentes tuvieron éxito, determinando la existencia de unidades repetitivas de 19.2 Å en la que encajaría cuatro veces la unidad de 4.8 Å (184). En este mismo experimento también se confirmó la ausencia de señal correspondiente a ~10 Å, una señal que en difracción de rayos X se asocia a una estructura en forma de lamina- β paralela en registro. Además, experimentos realizados con priones recombinantes sí confirmaron la presencia de esta señal de ~10 Å que se asocia a la presencia una estructura de lamina- β paralela en registro (184, 188, 189). Debido a las diferencias biológicas y bioquímicas que existen entre los priones purificados de encéfalo y los generados *in vitro* a partir de proteína recombinante no es sorprendente que estos puedan presentar una estructura diferente. Datos de criomicroscopía electrónica utilizando PrP²⁷⁻³⁰ sin anclaje a GPI purificada a partir de encéfalos de ratón también han sido determinantes para la generación de este modelo. En este caso Vázquez-Fernández y colaboradores pudieron observar unidades repetitivas de ~20 Å, que se corresponderían con las unidades formadas por cuatro pisos de 4.8 Å determinadas por difracción de rayos X (175). Finalmente datos de proteólisis limitada utilizando PrP^{Sc} purificada de encéfalo y priones recombinantes infectivos *in vivo* también respaldan este modelo (171, 190).

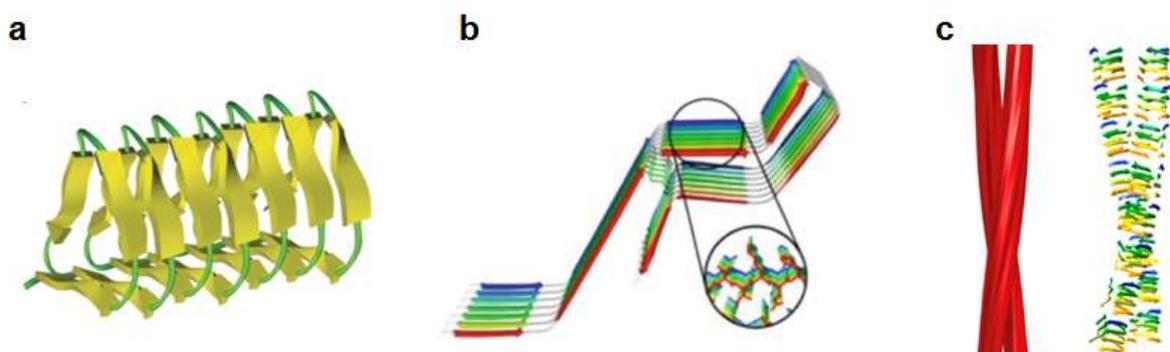


Figura 5. Representación de los diferentes modelos estructurales de las fibras de PrP^{Sc}. a) Modelo β -hélice. (Modificado de Choi 2008). b) Modelo de lámina- β paralela en registro. (Modificado de Apostol 2011). c) Modelo de lámina- β en solenoide de cuatro niveles. (Modificado de Requena 2018).

Neurotoxicidad

Existen diferentes indicios que sugieren una disociación entre la propagación de PrP^{Sc} y la neurotoxicidad presente en las EETs. En la actualidad se acepta sin reservas que la unidad portadora de la infectividad y que es capaz de propagarse es la PrP^{Sc}. Sin embargo, no está tan claro su papel en la neurotoxicidad. La generación de los primeros animales sin PrP^C demostró que la falta de esta proteína no era la causante de los signos clínicos de la enfermedad, puesto que estos animales se desarrollaban normalmente (191). Más tarde se observó que animales a los que se les eliminaba la PrP^C de forma condicional cuando la PrP^{Sc} ya se había extendido por todo el encéfalo mostraban signos de recuperación y se revertía la degeneración esponjiforme inicial. Además, los acúmulos de PrP^{Sc} en el SNC de estos animales eran similares a los animales con PrP^C que estaban en fase terminal de la enfermedad (192). Estos datos demuestran que la neurotoxicidad está mediada por la PrP^C, como también confirman los experimentos realizados con animales sin PrP a los que se les realizó un injerto en el SNC que sí expresaba PrP^C, y cuyas neuronas presentes en el injerto acabaron desarrollando neurodegeneración (193). Otros estudios ahondan más en el hecho de que la PrP^C probablemente actúe como mediadora de la neurotoxicidad y demuestran que no solo es necesaria la presencia de PrP^C, sino que esta debe estar anclada a la membrana por GPI para poder mediar esta acción de forma eficiente (194). También se han descrito casos en los que los niveles de agregados de PrP^{Sc} eran mínimos pero la neurodegeneración era evidente e indistinguible de otros casos de EET, tanto en animales (195) como en humanos (196), indicando que la responsable de provocar la neurotoxicidad cuando se asocia a la PrP^C podría ser una forma intermedia que se generaría durante el proceso de malplegamiento.

Experimentos llevados a cabo por Silveira y colaboradores demostraron que los oligómeros formados por 14-28 moléculas de PrP^{Sc} son la unidad con mayor capacidad infectiva, y también los que tienen una mayor actividad neurotóxica (161). Esto sugeriría que las fibras no serían las unidades responsables de la neurotoxicidad, sino multímeros de pequeño tamaño, datos también confirmados con muestras preparadas *in vitro* e inoculadas en modelos animales y celulares (197). Sin embargo, la vía metabólica que rige esta neurotoxicidad y que, presumiblemente, sería iniciada por la PrP^C, es desconocida. En los últimos años también se han hecho avances en el estudio de la neurotoxicidad provocada por la presencia de oligómeros de α -sinucleína, relacionada con la enfermedad de Parkinson y β -amiloide, relacionada con la enfermedad de Alzheimer. Estos han demostrado la relación entre la PrP^C y los oligómeros presentes en los pacientes de ambas enfermedades, sugiriendo que la PrP^C podría actuar como receptor e iniciar la cascada de muerte celular responsable de la neurotoxicidad asociada a estas enfermedades (144, 146).

Adquisición y diseminación por el organismo

Al igual que otros aspectos de la biología de los priones, las rutas de adquisición de priones desde el medio ambiente y su transporte hasta el SNC todavía no está bien definida. Si bien, sí se tiene una idea aproximada de cómo funcionan estos procesos y qué órganos o tipos celulares están implicados. La situación más común en modelos experimentales es la inoculación intracerebral, que consiste en la inoculación directa al SNC de homogeneizados de encéfalos de animales infectados (97). Sin embargo, es evidente que esta no es la situación que ocurre en la naturaleza, habiéndose descrito otras vías de entrada al organismo tanto de forma natural como de forma experimental.

Sin lugar a dudas, la vía oral es la vía natural más frecuente y, por tanto, una de las más estudiadas experimentalmente. Tras la ingestión, la PrP^{Sc} viaja a través del sistema digestivo hasta el intestino delgado, donde es captada por las células M (198). Estas células se encuentran en la superficie de las placas de Peyer y su función es la de captar antígenos y microorganismos de la luz intestinal y presentarlos al sistema inmunológico para su procesamiento. Se trata de un proceso fisiológico normal del que los priones se aprovechan, entrando así en el organismo. No está claro cómo ocurre esta captación en detalle, pero recientes estudios indican que no es necesaria la acción de la PrP^C presente en las células epiteliales intestinales (199). Además, en este mismo estudio se determinó que una inflamación de la pared intestinal mantenida en el tiempo puede aumentar la captación de PrP^{Sc} de la luz intestinal, siendo este por tanto un factor de riesgo a tener en cuenta. Una vez la PrP^{Sc} ha penetrado en las placas Peyer comienza su propagación, la cual está íntimamente asociada a las células dendríticas foliculares. Finalmente, la PrP^{Sc} llega hasta los nervios entéricos y desde allí viaja hasta el SNC (200). Un proceso similar se ha observado en otros tejidos linfáticos inervados, principalmente por el sistema nervioso simpático (201). También se ha descrito que la reducción de la distancia entre las células dendríticas foliculares y las terminaciones nerviosas en estos órganos se traduce en un aumento en la entrada de priones al SNC (202). Existen tres teorías diferentes acerca de cómo se produce este intercambio entre el sistema linfático y las terminaciones nerviosas: i) contacto célula-célula, ii) por transporte vesicular o iii) flotando libremente por el medio extracelular. Datos experimentales *in vitro* respaldan las tres teorías, indicando que quizás se trata de una suma de las tres vías. Una vez que la PrP^{Sc} entra en contacto con las terminaciones nerviosas viaja hacia el SNC de forma retrógrada, probablemente a través de un transporte tanto axonal como no axonal, implicándose en el proceso otras células del sistema nervioso, como las células de Schwann (97).

Otro actor que tiene un papel importante en la dispersión de los priones por el organismo es el sistema linforeticular. Desde hace varias décadas se conoce la implicación de varios órganos relacionados con este sistema en el transporte y propagación de los priones por el organismo. Tanto el bazo (203) como los nódulos linfáticos (204) son tejidos infecciosos que acumulan PrP^{Sc}. También se sabe que los linfocitos tienen cierta relevancia en la dispersión por el organismo, ya que se ha demostrado que expresan PrP^C, aunque a un nivel moderado (205). Más tarde se demostró que la ausencia de linfocitos impedía la adquisición de priones por vía periférica, mientras que no se observaba cambio alguno respecto a los controles cuando se utilizaba la vía intracerebral (206). En este mismo estudio también se determinó la importancia de las células dendríticas foliculares como aglutinadoras de la PrP^{Sc} en los nódulos linfáticos. Después se confirmaría que estas eran las responsables de la propagación y la acumulación de PrP^{Sc} en los nódulos linfáticos (207).

Aparte del papel que juega el sistema inmunológico en la propagación y dispersión de los priones por el organismo, también se debe tener en cuenta el hecho de que la PrP^{Sc} es capaz de evadirse del control ejercido por el sistema inmunológico. Al ser una proteína que se expresa también de forma endógena, la respuesta inmunológica se encuentra restringida. Además, el empaquetamiento y las grandes glicosilaciones presentes en los oligómeros de PrP^{Sc} dificultan el acceso y reconocimiento de epítomos conformacionales que permitirían diferenciarla de la PrP^C (208). Sin embargo, una vez la PrP^{Sc} llega al SNC y empieza a propagarse, la microglía se muestra muy activa contra los agregados de PrP^{Sc}. La inactivación farmacológica de esta gliosis provoca un aumento en el acúmulo de PrP^{Sc} y un acortamiento del periodo de incubación de la enfermedad (209, 210).

Una vez los priones han alcanzado el SNC estos son capaces de propagarse de unas neuronas a otras, colonizando así todo el sistema. Existen dos teorías no excluyentes acerca de cómo la PrP^{Sc} pasa de unas neuronas a otras: i) transmisión por nanotubos (TNT, del inglés *Tunneling NanoTubes*). Según esta teoría las neuronas generan entre sí unas estructuras conocidas como TNTs a través de las cuales las células pueden intercambiar diferentes moléculas o incluso orgánulos (211). Zurzolo y colaboradores fueron los primeros en describir el transporte de priones a través de estos TNTs (212). Desde entonces, diferentes experimentos llevados a cabo en modelos celulares han respaldado el papel de estos TNTs en el transporte y propagación de priones por el SNC (213). ii) Transmisión a través de vesículas extracelulares (EVs, del inglés *Extracellular vesicles*). La secreción y endocitosis de EVs es un proceso fisiológico altamente regulado y básico en el mantenimiento de la homeostasis celular. Proteínas, lípidos y ácidos nucleicos se comparten entre diferentes células mediante este método, pero los mecanismos de control que rigen este sistema de transporte todavía no se conocen con detalle. Fevrier y colaboradores describieron por

primera vez el transporte de PrP^{Sc} a través de EVs en cultivos celulares (214). Más tarde se identificaron EVs que transportaban PrP^{Sc} entre diferentes neuronas en varios tipos de cultivos celulares, dando importancia así al papel que este método de transporte juega en la dispersión de priones por el SNC (213).

Fenómeno de cepas

Desde los inicios en el estudio de las EETs uno de los fenómenos más intrigantes y que más han contribuido a la controversia que rodea a la teoría de “solo proteína” es la existencia de diferentes cepas de priones. Debido a la naturaleza exclusivamente proteica del agente infeccioso, la existencia de diferentes cepas no se podría explicar por mecanismos biológicos conocidos, donde solo una molécula formada por ácidos nucleicos podría codificar la información necesaria para generar semejantes diferencias. La teoría de “solo proteína” explica este fenómeno mediante la existencia de diferentes variantes conformacionales de la PrP^{Sc} que comparten una misma secuencia aminoacídica. Estas diferencias conformacionales explican las diferentes características fenotípicas de las cepas de priones. Estas no son solo evidentes en la sintomatología, sino también en relación al patrón de depósitos de proteína agregada en el SNC, periodos de incubación, perfil de lesiones histopatológico y áreas neuronales específicas para los depósitos de proteína malplegada (215). El periodo de incubación y el perfil de lesiones son los métodos más utilizados para su clasificación (216).

Estas diferencias conformacionales se basan en cambios en la estructura secundaria y terciaria de la proteína. Uno de los estudios clave a la hora de demostrar y determinar estas diferencias fue el realizado por Bessen y colaboradores utilizando dos cepas de priones de hámster. Estas cepas, conocidas como Hyper (HY) y Drowsy (DY), presentaban una manifestación de la enfermedad totalmente diferente. Tras la purificación de ambas cepas a partir de encéfalos de hámster se observaron claras diferencias en las propiedades fisicoquímicas de los priones causantes de una u otra sintomatología. Por ejemplo, se observaron diferentes velocidades de sedimentación y diferente resistencia al tratamiento con agentes desnaturalizantes (217). En un experimento posterior realizado con estas mismas cepas también se observó la existencia de dos núcleos resistentes a la digestión con PK de diferente tamaño, de acuerdo a su movilidad electroforética (218). Debido a que ambas cepas presentaban la misma secuencia aminoacídica, la única explicación posible era que ambas cepas tenían una estructura diferente, de modo que en una hay más aminoácidos expuestos para su digestión con PK, mientras que en la otra no son accesibles. La existencia de variantes conformacionales también daba explicación a todas las otras características observadas. Debido a que, hasta la actualidad, no ha sido posible describir la estructura de la PrP^{Sc} con

detalle, no se puede determinar con seguridad cómo estos cambios estructurales rigen las diferencias fenotípicas descritas entre las cepas de priones.

Otro rasgo bioquímico de importancia para la clasificación de las cepas de priones es la proporción de PrP no glicosilada, monoglicosilada y diglicosilada. La presencia proporcional de cada una de estas formas son característicos de cada cepa y se mantienen estables durante múltiples pases seriados en modelos animales (219) e *in vitro* (71). Este dato sugiere que el patrón de glicosilación, junto a la conformación de la PrP^{Sc}, estaría implicado en la caracterización y diferenciación de la cepa. De acuerdo al patrón de glicosilación de la PrP se distinguen dos tipos de cepas: i) cepas clásicas, que presentan un patrón de tres bandas en diferentes proporciones y ii) cepas atípicas, que además de presentar las tres bandas clásicas, también muestran fragmentos internos resistentes a PK y escindidos de los extremo amino y carboxilo terminal de entre 6 y 8 kDa, dependiendo de la cepa. Se han descrito cepas atípicas en humanos, tanto en el GSS (220) como en VPSPr (221), y en el ganado ovino, donde se identificó la cepa Nor98 como atípica (222). Mención aparte merece la existencia de las variantes atípicas de la EEB, que aunque están denominadas como tal, no presentan los fragmentos de 6-8 kDa y solo se diferencian de la EEB clásica en su particular movilidad electroforética (223).

El fenómeno de tropismo celular de los priones es, dentro del estudio de las EETs, una de las características más llamativas y sorprendentes de las cepas. Diferentes cepas afectan a diferentes áreas del SNC, traducándose esta diferencia en la generación de diferentes signos clínicos y la distinta deposición de PrP^{Sc} en el SNC. Este fenómeno ha sido estudiado utilizando diferentes cultivos celulares en combinación con diferentes cepas, pero a pesar de ello se desconoce qué es lo que define este tropismo (224). Debido a las diferencias conformacionales inherentes a las cepas, se ha postulado que estas diferencias podrían influir en su habilidad para interactuar con moléculas específicas, como por ejemplo, receptores celulares o ciertos cofactores. Esto generaría un tropismo de las cepas en favor de un tipo celular específico o de una zona donde un cofactor concreto sea más abundante (97, 225). Otras teorías se basan en el patrón de glicosilación como explicación al tropismo que observamos en el SNC (226). Así, una PrP^{Sc} con un patrón de glicosilación concreto tenderá a propagarse en zonas del SNC donde la PrP^C presente ese mismo patrón de glicosilación (227).

Barrera de transmisión

La transmisión de priones entre diferentes especies es un fenómeno ampliamente conocido y estudiado desde los inicios en la descripción de las EETs. Ya en los primeros experimentos

de Gajdusek y colaboradores se demostró que el Kuru era transmisible a chimpancés (26). Otra de las demostraciones de que es posible una transmisión interespecies es el conocido salto de la EEB a los seres humanos, provocando en estos la ECJv (228). Debido a su potencial zoonótico, este fenómeno ha sido ampliamente estudiado utilizando modelos animales transgénicos que expresan PrP de otros mamíferos (58).

Sin embargo, la transmisión de priones entre diferentes especies, aunque ocurre, está restringida por un fenómeno denominado barrera de transmisión o barrera de especie. Habitualmente, tras la inoculación de un grupo de animales con un prion procedente de otra especie no todos los individuos desarrollan la enfermedad y los que lo hacen, presentan tiempos de incubación más largos comparados con los que se observan cuando se inocula la misma especie (229). El porcentaje de animales que sucumben a la enfermedad, conocido como tasa de ataque, va aumentando según realizamos pases seriados, mientras que los tiempos de incubación se van acortando. Finalmente ocurre una adaptación del prion en esta nueva especie. El número de pases necesarios para lograr una estabilización del prion en la nueva especie es una forma de medir el grado de barrera de transmisión que existe entre esas dos especies. Sin embargo, para realizar una medición más rigurosa es común la utilización de inóculos sometidos a diluciones seriadas con el objetivo de medir la dosis letal 50 (LD50, del inglés *Lethal Dose 50 %*) (227). Este método se suele utilizar habitualmente para medir el posible riesgo zoonótico de priones procedentes de diferentes especies (92, 93, 119, 121).

En un principio se pensó que la existencia de dicha barrera se debía a la eficiencia de conversión y la patología generada por la cepa seleccionada (230, 231). Sin embargo, el factor que parece tener más peso en este fenómeno es la diferencia en la secuencia aminoacídica entre la especie donante y la receptora (58). Un claro ejemplo que demuestra la importancia de la estructura primaria es el experimento realizado por Prusiner y colaboradores. Ratones transgénicos que expresaban la PrP^C de ratón y de hámster se inocularon con priones procedentes de ambas especies. Cuando eran inoculados con priones de ratón solo se observaban agregados de PrP^{Sc} de ratón, mientras que si se inoculaban con priones de hámster, solo se observaban agregados de PrP^{Sc} de hámster (163). Otro experimento que demuestra la importancia de la secuencia aminoacídica en la barrera de transmisión es la existencia de variantes polimórficas y cómo estas afectan a la barrera. Uno de los ejemplos más conocidos es el caso de los ratones de genotipo *a* y genotipo *b*, cuya diferencia en la estructura primaria es de solo dos aminoácidos. Sin embargo, muestran tiempos de incubación muy dispares en función de la cepa utilizada (232). Por otro lado, también se ha observado que cada cepa de prion responde de forma diferente a la barrera de transmisión. Es decir, dos cepas diferentes de la misma especie y que comparten la misma secuencia

aminoacídica, pueden mostrar un comportamiento diferencial en relación a su capacidad de transmitirse a otros individuos (233). Por tanto, la barrera de transmisión se rige por una combinación de la secuencia aminoacídica y la estructura tridimensional, siendo ambos factores determinantes en la interacción proteína-proteína y, por tanto, en la propagación de la estructura aberrante.

3 - Hacia un tratamiento de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles

En un principio se teorizó que un virus lento era el factor etiológico de las EETs y este concepto no cambió hasta la confirmación de la teoría de “solo proteína”. Esto llevó a que los tratamientos que se testaron durante este periodo se centraran fundamentalmente en los antivíricos. Durante la década de los setenta y ochenta se llegó a utilizar aciclovir (234), amantadine (235), interferon (236) y vidarabine (237), siendo en todos los casos los resultados negativos. A medida que se acumulaban las evidencias demostrando la naturaleza exclusivamente proteica del agente infeccioso, el tratamiento con antivíricos se fue abandonando enfocándose a principios del siglo XXI únicamente en el tratamiento de las manifestaciones neurológicas. Entre los fármacos utilizados en este periodo podemos destacar el uso de analgésicos (238) y anticonvulsivos (239). Hoy en día algunos de estos compuestos se siguen usando como métodos paliativos frente a los síntomas de las EETs. A partir de la confirmación de la teoría de “solo proteína” y el mayor conocimiento de los procesos de propagación, diseminación y neurotoxicidad mediados por la PrP^{Sc} se diseñaron nuevas estrategias enfocadas al futuro tratamiento de las EETs.

A diferencia de otras enfermedades infecciosas, el sistema inmunológico apenas interviene en la defensa contra las EETs. Debido a que la secuencia aminoacídica de la PrP^C y la PrP^{Sc} es la misma, no existe una respuesta inmunológica robusta contra la infección por priones. Este fenómeno se conoce como autotolerancia y es fundamental para evitar el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Además, la casi exclusiva propagación del agente infeccioso en el SNC, un tejido inmunoprivilegiado, dificulta todavía más el desarrollo de una respuesta inmunológica eficaz contra la diseminación de la enfermedad por el SNC. Sin embargo, sí se ha descrito un aumento en la activación de la microglía, siendo esta la única manifestación clara de una reacción del sistema inmunológico contra las enfermedades priónicas. Este fenómeno quedó demostrado por el acortamiento de los tiempos de incubación y el aumento del acúmulo de PrP^{Sc} en el SNC al inhibir farmacológicamente este tipo de macrófagos residentes del SNC (210, 240). Por tanto, una de las estrategias que se contemplan para el tratamiento de las EETs consiste en estimular el sistema inmunológico mediante vacunas contra la PrP^{Sc}. El objetivo es forzar una respuesta inmunológica contra la PrP^{Sc} generando

anticuerpos contra la isoforma malplegada, creando así una inmunidad duradera que evite la propagación de los priones tras su entrada al organismo. El uso de PrP de origen recombinante es el proceso más común para generar inmunocompetencia contra los priones. Utilizando PrP dimérica recombinante se han generado auto-anticuerpos en ratón, demostrando más tarde su eficacia en modelos celulares (241). La inmunización contra la PrP recombinante también ha demostrado su eficacia *in vivo* en varios modelos murinos, aunque siempre utilizada como método profiláctico (242-244). Más recientemente se ha logrado generar una vacuna oral efectiva contra la EDC utilizando un péptido de PrP que podría ser vital para el control de esta enfermedad en las poblaciones de cérvidos salvajes (245). A pesar de los datos positivos, el principal problema de esta estrategia radica en que solo funciona como método profiláctico cuando los priones provienen de una fuente externa. Como la mayoría de los anticuerpos no pueden acceder de forma eficiente al SNC debido a la barrera hematoencefálica, el tratamiento de las EETs genéticas o esporádicas con esta estrategia no sería efectiva. Otro acercamiento a esta estrategia es el uso de anticuerpos monoclonales generados en células. Se ha demostrado en modelos murinos que estos anticuerpos generados de forma exógena son efectivos en modelos celulares e *in vivo* (243, 246). Sin embargo, existe una fuerte controversia acerca de esta estrategia, ya que hay evidencias que indican que los anticuerpos contra el dominio globular de la PrP pueden provocar una neurodegeneración similar a la que se observa en los pacientes de EETs (247). Además, persiste el problema de la barrera hematoencefálica, que restringe el paso de macromoléculas al SNC, entre ellas, una gran variedad de anticuerpos.

El uso de terapia génica es otra de las estrategias que han mostrado mayor eficacia en la lucha contra las EETs en modelos experimentales. En este caso se utilizan virus modificados que portan, o bien una proteína mutante resistente a la propagación o un RNA silenciador del gen *PRNP*, inhibiendo así la expresión de la PrP^C. Utilizando un lentivirus que porta una secuencia de la PrP humana con la mutación Q167R, que había sido descrita como dominante negativa (con capacidad de inhibir la propagación de priones por competencia) (248, 249), se logró una reducción casi total de la cantidad de PrP^{Sc} a los 15 días del tratamiento en un modelo celular de ratón (250). Este mismo lentivirus se testó a continuación en modelos murinos, donde se observó un aumento en el periodo de incubación del 20 % acompañado de una clara reducción en la espongiosis y astrogliosis (251). Utilizando lentivirus que portan RNAs silenciadores del gen *PRNP* también se han obtenido resultados prometedores *in vivo* en dos experimentos independientes (252, 253). El principal problema de las técnicas de modificación génica es la falta de infectividad de estos virus, que en muchas ocasiones no logran infectar a un número de neuronas suficiente como para generar cambios que se reflejen en la remisión de los síntomas o la prolongación en la vida de los animales de forma sustancial. Además, aunque la eliminación de la PrP^C en varios modelos murinos no ha

demostrado que estos sufran de un cambio de fenotipo evidente (191), los efectos de la falta de una proteína ubicua y conservada en la evolución de los mamíferos a largo plazo podría ser perjudicial (254).

La estrategia que hasta la actualidad ha dado más frutos y tiene más posibilidades de convertirse en un futuro tratamiento contra las EETs es el uso de moléculas, normalmente de pequeño tamaño, capaces de interactuar con la PrP^C o PrP^{Sc} e inhibir el proceso de malplegamiento. Estas moléculas pueden actuar de diferentes formas, aunque en algunas ocasiones el mecanismo molecular concreto es desconocido. El modo de acción más común es la unión a PrP^C, pero debido a que ignoramos los mecanismos que rigen el proceso de propagación con detalle es muy difícil dilucidar la acción específica de estas. Entre los inhibidores capaces de unirse a la PrP^C e inhibir la propagación tenemos la quinacrina (255), el Rojo Congo (40), las tetraciclinas (256) y las porfirinas (257). Todos ellos han demostrado su eficiencia en diferentes modelos *in vitro*, *in vivo* e *in cellula*. La quinacrina y la doxiciclina son dos de las más estudiadas y es común su uso como compuestos de referencia en los estudios de inhibición de la propagación hoy en día. Además, ambas han sido utilizadas en varios ensayos clínicos (258-260). Desafortunadamente, no se observó reducción en los síntomas de los pacientes ni un retraso en el desarrollo de la enfermedad en ninguno de los ensayos. Otro modo de acción de estas moléculas es la unión a la PrP^{Sc}, estabilizando las fibras amiloides de PrP^{Sc} y evitando así su disgregación. Este modo de acción, que a primera vista puede parecer contraproducente, es efectivo a la hora de ralentizar la propagación de la PrP^{Sc} por el SNC. Las partículas que juegan el papel dominante en la propagación son los oligómeros de 18-24 unidades (161), por lo que aumentando la estabilidad de las fibras amiloides podemos disminuir la cantidad de estos oligómeros, provocando así una ralentización del proceso patológico. Los poltiofenos conjugados luminiscentes (LCP, del inglés *Luminiscent Conjugated Polythiophenes*) son un grupo de compuestos luminiscentes de pequeño tamaño que actúan de esta forma y que han mostrado su eficacia *in vivo* (261). Anteriormente ya se había descrito su uso para detectar fibras amiloides y diferenciar cepas (262). A partir de este último trabajo podemos intuir el principal problema al que se enfrenta este tipo de compuestos, y es que como las diferentes cepas poseen distintas estructuras tridimensionales y los LCPs se basan en la afinidad con determinadas estructuras, los LCPs serán probablemente más efectivos frente a unas cepas que frente a otras.

Otras moléculas que también actúan uniéndose a la PrP^C son las conocidas como chaperonas moleculares. Se trata de moléculas de pequeño tamaño que se asocian a la PrP^C de forma específica y modifican su estructura aumentando su estabilidad (263, 264). Debido a que en el proceso de malplegamiento se produce un cambio estructural para transformar la PrP^C en PrP^{Sc}, un aumento en la estabilidad de la PrP^C dificulta este cambio conformacional

al aumentar la barrera de energía necesaria para iniciarlo. Gracias a su pequeño tamaño y a su fácil manipulación este tipo de compuestos son muy prometedores como futuros fármacos contra las EETs, ya que se pueden modificar fácilmente para aumentar su vida media, su unión a PrP^C o su paso a través de la barrera hematoencefálica. Además, al ser muy específicas no se necesitan dosis altas para obtener un efecto farmacológico eficaz. Varias chaperonas moleculares han sido descritas como inhibidoras de la propagación. Entre ellas destacamos las porfirinas, las antraciclinas, los pigmentos azoicos, las metilaminas, la heparina, el tegobuvir y el GN8 (264-267). La más conocida y estudiada de estas es el TMPyP-FelIII (del inglés *Iron (III) meso-Tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphine*), una porfirina capaz de unirse a la PrP^C en ratio 1:1 con una Kd de 11 μ M y que ha demostrado su actividad en modelos celulares (268) y animales (257).

Además de las estrategias que se centran en la potenciación de la respuesta inmunológica y la inhibición de la propagación de los priones también se han estudiado otras vías de tratamiento contra las EETs. Entre ellas, las centradas en la potenciación de los sistemas de eliminación de desechos celulares del SNC. En un experimento realizado por Muth y colaboradores se utilizó un retrovirus capaz de aumentar la actividad de la microglía en el SNC de un modelo murino de propagación de priones. Los datos obtenidos demuestran que esta estrategia aumenta la eliminación de los priones y que, por tanto, se reducen los niveles de PrP^{Sc} (269). Un aumento de la actividad lisosomal en el SNC funcionaría de un modo similar al proceso descrito anteriormente y se ha testado como posible tratamiento contra las EETs con éxito moderado (270-273). También se ha utilizado la inhibición de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR, del inglés *Unfolded Protein Response*) mediante fármacos (274) o modificaciones genéticas (275) como posible método de tratamiento de las enfermedades priónicas, ya que previamente se había descrito un aumento en la actividad de la UPR en modelos animales de varias enfermedades neurodegenerativas (276-278), entre ellas las EETs (275). Utilizando modelos murinos inoculados con RML se consiguió un retraso claro en el avance de la enfermedad y en las lesiones histopatológicas al ser tratados con un fármaco inhibidor de la UPR (279).

4 - Sistemas de propagación de priones

El desarrollo de sistemas *in vitro* e *in cellula* capaces de mimetizar el proceso de propagación que tiene lugar *in vivo* es uno de los logros más importantes en el campo de investigación de las EETs. Gracias a la implementación de los métodos de propagación *in vitro* e *in cellula* hemos sido capaces de estudiar más a fondo los diferentes aspectos del proceso de conversión con una considerable reducción en el tiempo y en el coste con respecto a los experimentos realizados en modelos animales. En este apartado describiremos los

diferentes sistemas *in vitro* e *in cellula* que más información nos han aportado acerca de las características biológicas de los priones y su uso en el cribado de moléculas con actividad anti-priónica.

4.1 - Sistemas de propagación *in cellula*

La obtención de líneas celulares capaces de mantener la propagación de priones ha sido de gran ayuda para la descripción de diferentes mecanismos que entran en juego en la propagación y neurotoxicidad de la PrP^{Sc} (280). Una de las principales ventajas de estos métodos es que, al igual que los modelos *in vitro*, son rápidos y fácilmente manipulables. Además, se considera que son más semejantes a los modelos *in vivo* que los sistemas *in vitro*, ya que se respeta el anclaje a membrana por GPI y la interacción entre células. Debido a ello, los estudios de alteración de localización celular de la PrP^C, de mecanismos de toxicidad o de silenciamiento del gen *PRNP* solo son posibles en este tipo de modelos, exceptuando los modelos *in vivo*. La clorpromazina es un antipsicótico cuya actividad anti-priónica ya había sido descrita con anterioridad (255, 281). Sin embargo, a pesar de haberse observado la interacción entre el compuesto y la PrP^C *in vitro*, no se conocía en detalle el mecanismo de acción que explicaba la inhibición descrita. Utilizando un modelo celular proveniente de neuroblastoma de ratón conocido como N2a, se logró demostrar que la clorpromazina alteraba la localización subcelular de la PrP^C, evitando así su interacción con la PrP^{Sc} (282). Utilizando esta misma línea celular, Hetz y colaboradores lograron demostrar por primera vez la importancia de la respuesta al estrés mediada por el retículo endoplasmático en la mediación de la toxicidad provocada por la infección de priones (283). En experimentos similares también se describió la importancia del sistema del proteasoma a la hora de eliminar las estructuras aberrantes de PrP (284) o la alteración en las mitocondrias neuronales tras la infección con priones (285), todos ellos clave a la hora de entender la neurotoxicidad mediada por el malplegamiento de la PrP. También han sido críticos los modelos celulares a la hora de demostrar la eficacia de las terapias génicas de silenciamiento del gen *PRNP*, validando así su posterior uso en modelos animales (286).

El testado y descripción de nuevos compuestos con actividad anti-priónica también es uno de los principales valores de estos modelos. Un gran número de compuestos han sido identificados mediante sistemas *in vitro*, más alejados de la situación natural que se desarrolla en el SNC, y han sido más tarde validados mediante diferentes modelos de propagación *in cellula*. Algunos ejemplos son la quinacrina (287), el TMPyP-FeIII (288), los ácidos biliares (289) y el tegobuvir (267). También se han utilizado estos modelos para el testado masivo de bibliotecas de compuestos con posible actividad anti-priónica (290), sin embargo estos métodos requieren de amplia experiencia previa y tienen altos costes comparados con los métodos *in vitro* que no implican cultivos celulares. Además, la necesidad de técnicas

bioquímicas como el *Western Blot* o el *Dot Blot* para detectar los niveles de PrP^{Sc} lastran el sistema para su aplicación como método de testado masivo. A pesar de su utilidad, la imposibilidad de propagar ciertas cepas en líneas celulares de uso rutinario en el laboratorio es un serio problema para el uso de estos sistemas (280). Hasta el día de hoy se desconoce el mecanismo que explique por qué algunas líneas celulares son susceptibles a la infección únicamente por determinadas cepas priónicas (291).

4.2 - Sistemas de propagación *in vitro*

El primer sistema de propagación de priones *in vitro* se conoce como ensayo de conversión libre de células y fue desarrollado por Caughey y colaboradores a principios de la década de los noventa. Este sistema se basa en el uso de PrP^C y PrP^{Sc} purificadas a partir de cultivos celulares y encéfalo, respectivamente. Tras la desnaturalización de la PrP^{Sc} utilizando agentes coatrópicos esta se volvía a renaturalizar mediante dilución del agente desnaturalizante. Esta PrP^{Sc} renaturalizada es capaz de provocar el malplegamiento de la PrP^C, que anteriormente había sido marcada radiactivamente con ³⁵S para facilitar su detección (68). Gracias a este sistema se pudieron identificar diferentes factores que afectan al proceso de propagación y a la barrera de transmisión (292). Además, se demostró por primera vez que el proceso de malplegamiento puede ocurrir en un entorno controlado donde ningún otro componente aparte de PrP^C y PrP^{Sc} está presente, siendo este estudio un gran apoyo a la teoría de “solo proteína”. No obstante, el bajo rendimiento del proceso y el exceso de PrP^{Sc} necesaria han impedido la caracterización de la proteína malplegada generada *in vitro*.

En un intento de mejorar el ensayo de conversión libre de células se consiguió por primera vez simular el proceso de propagación *in vitro* partiendo de cantidades ínfimas de PrP^{Sc} mediante el uso de sonicación (69). Este estudio marcó el comienzo del desarrollo de la técnica de amplificación cíclica de proteínas malplegadas (PMCA, del inglés *Protein Misfolding Cyclic Amplification*). Dos principios fueron claves para su desarrollo: i) la demostración de que el proceso de propagación se podía simular en un tubo de ensayo (68) y ii) un sistema cíclico basado en un baño de ultrasonidos/incubación (69). Conceptualmente, la PMCA es un análogo a la PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*), donde a partir de una hebra de ADN molde se pueden generar millones de copias idénticas en un corto espacio de tiempo a expensas de una reacción que ocurre de forma cíclica. Posteriormente, el sistema fue automatizado (PMCAa) con el objetivo de aumentar su sensibilidad, especificidad y rendimiento (293-296). La técnica se basa en la repetición constante de un ciclo formado por dos fases, permitiendo imitar *in vitro* el proceso de propagación que se da *in vivo* con una cinética acelerada. Durante la primera fase, una pequeña cantidad de PrP^{Sc} es incubada en presencia de un exceso de PrP^C, lo que promueve la formación de agregados de PrP^{Sc}. Tras esta fase de incubación la muestra se somete a la acción de ultrasonidos con el objetivo de

disgregar los agregados de PrP^{Sc} formados durante la fase de incubación, aumentando así el número de núcleos de crecimiento para la siguiente fase de incubación. Con los sucesivos ciclos de sonicación e incubación se va aumentando exponencialmente la cantidad de “semilla” (294), obteniéndose finalmente una cantidad de PrP^{Sc} significativamente mayor que la utilizada inicialmente. De esta forma cantidades de PrP^{Sc} que eran indetectables por métodos bioquímicos estándares como el *Western blot* inicialmente pueden amplificarse hasta niveles fácilmente detectables. A partir de este proceso se han realizado diferentes modificaciones y adaptaciones: la adición de diferentes componentes, equipos más sofisticados y nuevas aplicaciones han sido elementos esenciales para su actualización a lo largo de los años.

Uno de los principales valores de la PMCA es que ha demostrado que es capaz de mimetizar algunas de las etapas fundamentales implicadas en la propagación de priones que ocurren *in vivo*. Y como consecuencia, es capaz de replicar diferentes cepas de priones manteniendo sus características determinantes (71) y de reproducir gran parte de los fenómenos de barrera de especie asociados a estas (297). No obstante, conviene recordar que el propósito original para el que nació la PMCA es el diagnóstico de las EETs a partir de muestras de tejidos o fluidos corporales donde las cantidades de PrP^{Sc} son indetectables. En este sentido podemos resaltar, por ejemplo, que la PMCA se utilizó por primera vez para la detección con éxito de priones en muestras de sangre provenientes de animales tanto sintomáticos como presintomáticos (70, 296).

Por otro lado, la PMCA también ha sido una técnica clave a la hora de confirmar algunos de los postulados centrales de la teoría de “solo proteína”. La conversión de PrP^C a PrP^{Sc} gracias a los sucesivos ciclos de incubación/sonicación supone la confirmación de un proceso de propagación en el que la nueva PrP^{Sc} generada es capaz de malplegar a otras moléculas de PrP^C presentes en el sustrato (298). Posteriormente, la generación de priones mediante PMCA utilizando sustratos basados exclusivamente en PrP recombinante, sin la necesidad de ningún cofactor sintético o proveniente de mamífero, fue decisiva para la confirmación de la teoría (74).

Debido a las dificultades para trabajar con la PrP^C purificada a partir de cultivos celulares o de encéfalo se han realizado diferentes estudios con el objetivo de generar priones sintéticos a partir de PrP recombinante proveniente de *E. coli*. Esta proteína, al generarse en un organismo procariota, presenta dos diferencias importantes que influyen en el proceso de propagación *in vitro* y en la infectividad *in vivo*: i) carece de glicosilación y ii) carece de la secuencia C-terminal que sirve de anclaje al GPI. A pesar de estas diferencias, la PrP recombinante se ha utilizado con éxito en la PMCA para la generación de priones infectivos

in vivo (74). Sin embargo, las semillas generadas en PMCA a partir de PrP recombinante, conocidas como PrP^{res} (PrP resistente a PK), presentan niveles de infectividad limitados. La definición de infectividad limitada responde a que no todas las PrP^{res} generadas *in vitro* son tan infecciosas como las semillas de origen animal al ser inoculadas *in vivo*, siendo gran parte de ellas no infecciosas. Una característica importante del experimento llevado a cabo por Kim y colaboradores es que se utilizó una semilla para iniciar el proceso de propagación. El grupo liderado por Jiyun Ma fue pionero en la generación de priones recombinantes *in vitro* de forma espontánea. Para ello se utilizó un sustrato formado por PrP recombinante y complementado con dos cofactores: ARN y lípidos. Este prion artificial generado espontáneamente mediante PMCA mostró niveles de infectividad semejantes a los procedentes de animales al ser inoculados en ratones de genotipo salvaje (75), incluso por vía intraperitoneal (299). Otros priones artificiales generados por PMCA y con capacidad infecciosa *in vivo* son los generados por Suppattapone y colaboradores utilizando fosfatidiletanolamina como cofactor (300) y los generados por Castilla y colaboradores utilizando diferentes cofactores (225). Estos experimentos demuestran que la generación de priones artificiales mediante PMCA en un entorno controlado bien definido es posible y que estos pueden presentar niveles de infectividad similares a los priones existentes en la naturaleza.

El empleo de la PMCA para el cribado de nuevos compuestos anti-priónicos también está ampliamente extendido en el campo de las EETs. Debido a que esta técnica ha demostrado su capacidad para mimetizar las principales etapas que tienen lugar en el proceso de propagación *in vivo*, podríamos asumir que aquellos compuestos que muestren una inhibición del malplegamiento utilizando esta metodología, tendrán un comportamiento similar *in vivo*. Varios compuestos que han demostrado su efectividad en PMCA han sido posteriormente inhibidores efectivos de la propagación *in vivo*, por ejemplo el compuesto anle138b (301). Teniendo en cuenta este comportamiento, la PMCA a priori sería un modelo ideal para el testado masivo de bibliotecas de compuestos químicos con posible actividad anti-priónica. Sin embargo, la necesidad de un gran número de sistemas de sonicación y el uso de técnicas bioquímicas como el *Western Blot* para detectar la reducción en la propagación de PrP^{Sc} dificultan el uso de la PMCA en este tipo de estudios.

Otra técnica de propagación de priones *in vitro* de gran relevancia en el estudio de las EETs es la conversión inducida por agitación en tiempo real (RT-QuIC, del inglés *Real Time - Quaking Induced Conversion*). En este método se utiliza la agitación como fuente de energía en lugar de la sonicación y un sustrato conformado exclusivamente por PrP recombinante, tioflavina T (ThT, del inglés *Thioflavine T*), sales y detergentes (302). El sistema se vale de la ThT para monitorizar la formación de fibras amiloides en tiempo real (303) y esto, sumado al uso de placas de 96 pocillos y a la medición de la fluorescencia a través de un lector de placas,

permite la automatización del sistema. Todas estas características hacen que esta técnica sea más rápida, sensible y reproducible que la PMCA. De hecho, actualmente es el principal candidato para convertirse en la herramienta de diagnóstico clínico de las EETs humanas y animales. Su extraordinaria capacidad para inducir el malplegamiento proteico permite detectar cantidades ínfimas de PrP^{Sc} en diferentes muestras de fácil acceso, como líquido cefalorraquídeo (304, 305), raspados nasales (306), orina (307), heces (308) y saliva (309). En el caso de las EETs humanas ha demostrado una sensibilidad del 96 % y una especificidad del 100 % utilizando muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con ECJe (306). También se han obtenido valores de sensibilidad y especificidad similares utilizando muestras de mucosa olfatoria procedentes de pacientes de IFF y ECJe (306, 310). Por otro lado, el control de las poblaciones de cérvidos salvajes frente a la amenaza de la EDC también puede ser facilitado gracias a esta técnica, que permite detectar la presencia de PrP^{Sc} en muestras de orina, heces y saliva de estos animales con una alta sensibilidad y especificidad (307, 311). Esto permitiría detectar las poblaciones de cérvidos infectadas y aislarlas del resto, conteniendo así la enfermedad. A pesar de su enorme potencial como técnica de diagnóstico, la ausencia total de infectividad al inocular las fibras amiloides generadas mediante RT-QuIC en modelos animales ha impedido el uso de la técnica para estudios relacionados con la descripción del proceso de propagación o la estructura de la PrP^{Sc}. También se ha descrito el uso del RT-QuIC para el testado de compuestos anti-priónicos como la acridina, el dextrano, el ácido tánico y las trimetilchalconas, siendo todos ellos activos también en modelos celulares (312, 313). Además, gracias a su versatilidad, velocidad y reproducibilidad se ha propuesto su uso como sistema de testado masivo de bibliotecas de compuestos con posible actividad anti-priónica (314), pero otra vez, la imposibilidad de trabajar con priones *bona fide* lastran su uso para el testado de compuestos en un método lo más parecido a una situación real de propagación.

Con el objetivo de aunar las ventajas de la PMCA y el RT-QuIC se inició el desarrollo de una nueva técnica de propagación *in vitro* en nuestro laboratorio, siendo el desarrollo de dicha técnica uno de los pilares centrales de esta tesis doctoral. El método, bautizado como amplificación de proteínas malplegadas mediante agitación (PMSA, del inglés *Protein Misfolding Shaking Amplification*), cambia la sonicación por agitación como fuente de energía, al igual que el RT-QuIC. Sin embargo, la agitación se administra a través de un sistema diferente que en el RT-QuIC, siendo también la composición del sustrato y el soporte donde se produce la reacción de propagación, diferentes en esta técnica. Estos cambios respecto al RT-QuIC, junto con el uso de un prion con alta infectividad procedente de PMCA como semilla, han permitido integrar la propagación de un prion *bona fide* que mantiene su infectividad en modelos animales con la versatilidad, reproducibilidad, sencillez instrumental y escalabilidad que aporta el uso de la agitación en lugar de la sonicación. Además, gracias a la simplicidad

del sustrato utilizado, compuesto por PrP recombinante, dextrano sulfatado, detergentes y sales, en combinación con el uso de ThT para la detección de fibras amiloides y el uso de placas de 96 pocillos acoplado a un sistema de lector de placas, permite testar compuestos de una forma rápida y fiable. Teniendo en cuenta todas estas ventajas, la PMSA se convierte en un sistema ideal para el testado masivo de bibliotecas de compuestos con posible actividad anti-priónica, siendo este el principal objetivo de esta tesis doctoral.

OBJETIVOS

1. Desarrollo de un sistema de propagación *in vitro* de priones infecciosos aplicable al cribado masivo de compuestos con potencial actividad anti-priónica.
 - a. Obtención de un prion recombinante infeccioso con alta capacidad de propagación *in vitro* en un entorno con una composición definida.
 - b. Optimización de la eficiencia de propagación *in vitro* del prion infeccioso.
 - c. Desarrollo de un método de detección de priones compatible con el cribado masivo de compuestos.

2. Cribado de una biblioteca de 2500 compuestos con alta diversidad química para la detección de compuestos anti-priónicos.

3. Confirmación de la actividad anti-priónica de los compuestos seleccionados mediante otras técnicas.
 - a. Evaluación de la capacidad anti-priónica de los compuestos seleccionados utilizando una técnica alternativa de propagación *in vitro*.
 - b. Evaluación de la capacidad anti-priónica de los compuestos seleccionados utilizando una técnica de propagación *in cellula*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 - Construcción de los plásmidos de expresión de las PrP de topillo rojo, de humano y de oveja

Para la producción de las PrP recombinantes de humano, oveja y topillo rojo en *Escherichia coli* (*E. coli*) utilizamos vectores plasmídicos especializados en la expresión de genes eucariotas, incorporados mediante genética molecular. En concreto, utilizamos los vectores pOPIN desarrollados por *Oxford Protein Production Facility UK* (OPPF). Estos vectores están especialmente diseñados para su clonación mediante el sistema *In Fusion*, que permite una alta expresión de la proteína clonada (315). Concretamente, utilizamos el plásmido pOPIN E, basado en el vector pTriEx2 cuyas principales características son su resistencia al antibiótico ampicilina, la presencia de un *enhancer* (del inglés, potenciador) híbrido de Citomegalovirus (CMV), del promotor de β -actina que permite la expresión de proteínas eucariotas en bacterias *E. coli* y de una diana para la carboxi-peptidasa A seguida de una cola de 6 histidinas, necesarias para la purificación de proteínas mediante el sistema de cromatografía de afinidad Niquel - Ácido Nitriloacético (Ni-NTA, del inglés *Niquel - Nitriloacetic Acid*).

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

Para la clonación de las diferentes secuencias de PrP en el vector pOPIN E mediante el sistema *In Fusion*, los extremos de las secuencias de los genes de PrP humana 129M, de oveja ARQ (alanina en posición 136, arginina en posición 154 y glutamina en posición 171) y de topillo rojo 109I se adecuaron mediante la técnica de PCR, teniendo en cuenta las especificaciones señaladas en el protocolo de la OPPF. Este paso es crucial para la correcta clonación de la secuencia deseada en el vector mediante el sistema *In Fusion*, ya que se basa en una recombinación homóloga entre los extremos de la secuencia a clonar y el vector. Por esto, los oligonucleótidos diseñados para tal fin se hicieron coincidir al menos 15 pares de bases con los extremos del vector. Además, en el oligonucleótido del extremo carboxilo terminal se introdujo un codón de terminación (TTA) en la posición de la lisina inmediatamente anterior de la cola de histidinas con el fin de evitar el corte con carboxi-peptidasa A tras la purificación. El uso de esta enzima es imprescindible para la eliminación de la cola de 6

histidinas necesaria para la purificación de la proteína por columnas de afinidad Ni-NTA. Sin embargo, debido a la presencia de numerosas histidinas en la zona de octarrepeticiones de la PrP, la cola de histidinas no es necesaria para su purificación mediante este tipo de columnas de afinidad, cumpliendo la misma función que una cola de histidinas añadida artificialmente. Las secuencias 5'-3' de los oligonucleótidos utilizados son las siguientes:

- Oligonucleótido del extremo amino terminal para la PrP de topillo rojo I109I:

AGGAGATATACCATGAAGAAGCGGCCAAAGCCTGG

- Oligonucleótido del extremo carboxilo terminal para la PrP de topillo rojo I109I:

GTGATGGTGATGTTAGGAACTTCTCCCTTCGTAGTA

- Oligonucleótido del extremo amino terminal para la PrP de humano M129M:

AGGAGATATACCATGAAGAAGCGCCCGAAGCCTGG

- Oligonucleótido del extremo carboxilo terminal para la PrP de humano M129M:

GTGATGGTGATGTTAGCTGATCCTCTCTGGTAATA

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

AGGAGATATACCATGAAGAAGCGACCAAAGCCTGG

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

GTGATGGTGATGTTAACTTGCCCCCTTTGGTAATA

Utilizando como molde el ADN genómico de las especies indicadas anteriormente, se realizó una PCR con el fin de amplificar la secuencia de ADN de interés mediante los oligonucleótidos específicamente diseñados y mostrados en el párrafo anterior. Los reactivos presentes en las reacciones de PCR fueron: 2-10 ng de ADN genómico, 50 ng de cada uno de los oligonucleótidos (Sigma), 1,25 unidades *LongAmp™ Taq DNA Polymerase* (New England Biolabs), 10 µl 5X *LongAmp™ Taq Reaction Buffer* (New England Biolabs), 0,4 µl dNTP 10 mM (Sigma-Aldrich), H₂O desionizada (hasta alcanzar un volumen final de reacción de 50 µl, dependiendo de la concentración de ADN genómico). Las condiciones de PCR aplicadas fueron en primer lugar, un ciclo inicial de desnaturalización del molde de ADN de partida mediante calentamiento a 95 °C durante 5 min, a continuación, 35 ciclos de amplificación y finalmente, un periodo adicional de 10 min a 72 °C que permite la extensión de los productos de PCR incompletos. Cada ciclo de amplificación consistió en un periodo de desnaturalización a 95 °C durante 20 s, seguido de un periodo de 45 s a 56 °C que facilita la hibridación de los oligonucleótidos con el molde de ADN y finaliza con un periodo de 60 s a 72 °C que permite la polimerización de las nuevas cadenas de ADN. El producto de PCR se almacenó y conservó a 4 °C. Para realizar las PCR se empleó el termociclador *DNA Engine Peltier Thermal Cycler, PTC-200* (Bio-Rad).

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

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

Finalmente, los vectores se transformaron en bacterias súper competentes *E. coli DH5 XL-Gold*[®] (Stratagene) siguiendo el protocolo estándar de transformación mediante choque térmico descrito por Inoue *et al* (316). Todas las colonias bacterianas obtenidas se cultivaron en 2 ml de medio de cultivo Luria Bertoni (LB) (Pronadisa) con 50 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37 °C en agitación toda la noche. Partiendo de estos cultivos, los plásmidos procedentes de colonias bacterianas se purificaron empleando el kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para verificar que los plásmidos purificados tenían incorporados los genes que codifican las PrP humana 129M, de topillo rojo 109I y de oveja ARQ se realizó un análisis de restricción de los plásmidos con la enzima de restricción Aval (New England Biolabs). Finalmente, con el fin de asegurar que los plásmidos obtenidos contenían las secuencias correctas, el gen de la PrP y los extremos adyacentes se secuenciaron completamente mediante el servicio de secuenciación de Stabvida empleando el oligonucleótido universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3').

2 - Obtención de las proteínas PrP recombinantes

En este apartado se explicará paso por paso la transformación del plásmido deseado en las bacterias súper competentes *E. coli Rossetta (DE3)*[™] (EMD Millipore) y la generación de PrP recombinante para su uso en sistemas de propagación *in vitro*.

2.1 - Transformación de plásmidos en bacterias mediante choque térmico

Para producir las proteínas recombinantes de PrP completas [rec-PrP(23-231)] a partir de los plásmidos pOPIN E generados anteriormente, los vectores se transformaron en bacterias súper competentes *E. coli Rossetta (DE3)*[™] (EMD Millipore), desarrolladas especialmente

para la expresión de proteínas eucariotas. Los plásmidos pOPIN E se transformaron específicamente en estas bacterias mediante el protocolo estándar de transformación por choque térmico (316). Posteriormente se conservaron a -80 °C en medio glicerol 1:1 (v:v).

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

Las bacterias DE3 transformadas con el plásmido deseado se cultivaron en 50 ml de medio Luria Bertoni (LB) (Pronadisa) en presencia de ampicilina (20 µg/ml) a 37 °C en agitación a 200 rpm durante toda la noche. A continuación estos 50 ml se mezclaron con 2 L de medio LB con ampicilina (20 µg/ml) (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37 °C en agitación a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica en la longitud de onda de 600 nm (DO_{600}) de 0,8-1. Una vez alcanzada, se añadió al cultivo bacteriano isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Gold Biotechnology) a una concentración final de 1 mM con el objetivo de inducir la síntesis de proteínas en las bacterias DE3. Una vez añadido el IPTG se mantuvieron las condiciones de temperatura y agitación descritas durante 3 h. Pasadas las 3 horas, la inducción se detuvo con la incubación de los cultivos bacterianos en hielo durante 15 min. Finalmente los cultivos se centrifugaron durante 15 min a una velocidad de 4500 *g* y a una temperatura de 4 °C (Centrífuga Sorvall Legend XTR, Thermo Scientific) con el objetivo de precipitar las bacterias que acumulan la proteína recombinante producida en forma de cuerpos de inclusión.

El precipitado bacteriano resultante se resuspendió en 100 ml de solución de lisis [50 mM tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreuro Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 5 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich), 1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich), 100 µg/ml Lisozima (Sigma-Aldrich), ajustado a pH 8,0] y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en presencia de 100 U/ml de desoxirribonucleasa (DNAsa) (Sigma-Aldrich) con agitación suave y cloruro de magnesio ($MgCl_2$) (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 20 mM, necesario para el correcto funcionamiento de la DNAsa. El producto lisado se centrifugó a 8500 *g* (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific) durante 1 h y a una temperatura de 4°C. El precipitado resultante se resuspendió en 100 ml de solución de lavado [20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 150 mM cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich), 1% Sarkosyl (Sigma-Aldrich), ajustado a pH 8,0]. El material resuspendido se centrifugó de nuevo a 8500 *g* durante 1 h a una temperatura de 4 °C y el precipitado resultante se disgregó en 12 ml de solución de inclusión [20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 0,5 M NaCl (Sigma-Aldrich), 6 M cloruro de guanidina (GndCl) (Fisher Scientific), ajustado a pH 8,0]. Con el objetivo de disolver totalmente los cuerpos de inclusión presentes en el precipitado, el material resuspendido se incubó a 37 °C durante toda la noche con agitación suave. Finalmente, las muestras se centrifugan a 8500 *g* durante 1 h a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante

resultante se filtra utilizando un tamaño de poro de 0,22 μm (Minisart, Sartorius Stedim) y se sonica 3 veces utilizando un sonicador de punta acoplado a un sistema Misonix Q-700 (Qsonica) con una potencia del 60 % durante 15 s para reducir su viscosidad.

Una vez filtrada y sonicada, la PrP recombinante presente en la muestra se purifica utilizando columnas de afinidad de histidinas *HisTrap FF Crude 5 ml* (GE Healthcare Amersham). Las columnas se equilibran con 35 ml de solución de unión [20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 500 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 5 mM Imidazol (Sigma-Aldrich), 2 M GndCl (Fisher Scientific), ajustado a pH 8,0]. Seguidamente, la muestra se carga en la columna utilizando una aguja de 22G (Terumo). La columna se lava con 75 ml de solución de unión y finalmente la PrP se eluye utilizando 30 ml de solución de elución [20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 500 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 500 mM Imidazol (Sigma-Aldrich), 2 M GndCl (Fisher Scientific), ajustado a pH 8,0]. Las proteínas purificadas se desnaturalizan completamente aumentando la concentración de GndCl hasta 6 M y posteriormente se concentran hasta alcanzar 25 mg/ml mediante filtros de centrifugación de 10 KDa *Amicon Ultra-15 10KDa Centrifugal filter unit* (Millipore). Finalmente, las proteínas recombinantes generadas se almacenan a -80 °C hasta su uso.

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

3 - PMSA como método de propagación *in vitro* de priones

En este apartado se explicará la preparación del sustrato para PMSA utilizando PrP recombinante de topillo rojo 109I complementada con dextrano sulfatado y se indicarán en

detalle los diferentes métodos de propagación de priones mediante PMSA utilizados en esta tesis doctoral.

3.1 - Preparación de sustratos para PMSA

A lo largo del proceso de preparación, todos los componentes que forman parte de los sustratos se mantuvieron a 4 °C para preservar su estabilidad. Tras su preparación, se alicuotaron convenientemente para evitar ciclos de congelación/descongelación y se conservaron a -80 °C hasta la realización de los experimentos.

Las proteínas purificadas mediante columnas de afinidad *HisTrap* se diluyeron en ratio 1:5 en PBS, se cargaron en casetes de diálisis de 10 kDa *Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette 10K MWCO* (Thermo Scientific) y se dializaron durante 1 h frente a PBS (Fisher Bioreagents) a temperatura ambiente. Durante el proceso de diálisis se puede observar la formación de acúmulos blanquecinos de proteína anormalmente plegada. Para la eliminación de este precipitado las muestras dializadas se centrifugaron a 19000 *g* durante 15 min a una temperatura de 4 °C (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific). Finalmente se recogió el sobrenadante que contiene la proteína PrP soluble plegada. La concentración de esta se midió utilizando el kit *BCA Protein Assay* (Fisher Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante. Dependiendo de la concentración de la proteína esta se diluye utilizando PBS o se concentra mediante filtros de 10 KDa *Microcon Ultra-0.5 10 KDa* (Millipore) hasta obtener una concentración de 40 µM.

Una vez preparada la proteína, esta se diluyó en solución de conversión fría [PBS (Fisher BioReagents), 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)] a un ratio 1:10. De esta forma la concentración final de proteína será de 4 µM. Por último se añadió dextrano sulfatado hasta alcanzar una concentración final de 0,5 % (p/v).

3.2 - Propagación *in vitro* de priones mediante PMSA

Todos los experimentos de PMSA se llevaron a cabo utilizando tubos de 0,2 ml (Axygen), igual que en PMCA. El volumen final utilizado en todos los experimentos fue de 50 µl por tubo. Durante el proceso de desarrollo del sistema PMSA, su optimización y su posterior adaptación a un sistema de cribado masivo se han ido implementando diferentes cambios que se describen a continuación:

Obtención de una semilla adaptada al sistema PMSA

Con el objetivo de adaptar una semilla de topillo rojo 109I con capacidad infecciosa procedente de PMCA al nuevo sistema de propagación *in vitro* PMSA, se realizaron rondas sucesivas de PMSA en las que la cepa de prion se diluyó 1:10 en el sustrato. Tras 24 h de PMSA, se realizó una dilución 1:10 en sustrato fresco, sometiéndolo de nuevo a 24 h de PMSA. Este proceso se repitió 15 veces, obteniéndose finalmente una cepa adaptada al nuevo sistema. Además, la realización de 15 pases seriados asegura la total desaparición del inóculo original utilizado, ya que basándonos en el número de Avogadro, una dilución 1:10¹⁵ sería suficiente para su eliminación total (296). También se incluyó una muestra sin semilla inicial que se sometió al mismo proceso con el objetivo de controlar la aparición espontánea de priones. A lo largo del experimento se realizaron cuadruplicados intraexperimentales para dar robustez estadística a los resultados, tanto de las muestras inoculadas como de los controles sin semilla. Las condiciones utilizadas en este experimento son las siguientes: ciclos de 60 s de agitación a 700 rpm y 5 min de incubación, 38 °C y partículas de zirconio/silica de 1 mm (Sigma-Aldrich). Todo el proceso de obtención de la semilla adaptada a PMSA se llevó a cabo en un *Thermomixer* (Eppendorf).

Proceso de optimización del sistema PMSA

Durante el proceso de optimización del sistema PMSA se empleó el método de diluciones seriadas con el objetivo de determinar qué condiciones son más efectivas para la propagación de la semilla adaptada al nuevo sistema. Este método consiste en la realización de diluciones seriadas de la semilla en sustrato fresco (1:10¹ - 1:10⁸), sometiéndose a continuación a 24 h de propagación mediante el sistema PMSA. Todos los experimentos se realizaron por triplicado utilizando un *Thermomixer* (Eppendorf). Dependiendo de las condiciones utilizadas, se determinó la dilución máxima a la que podía detectarse PrP^{res}, lo que indicaba la eficiencia de propagación de esas condiciones concretas. Las variables modificadas y las condiciones utilizadas aparecen detalladas en el apartado 1.2 de Resultados.

Sistema de cribado masivo de compuestos químicos mediante PMSA

Para testar la posible inhibición de la propagación de priones de los diferentes compuestos químicos, se utilizaron también diluciones seriadas de semilla. Sin embargo, las condiciones utilizadas fueron diferentes a las descritas para el desarrollo y optimización del sistema. Una vez realizadas las diluciones, se añadieron los compuestos a una concentración final de 200 µM, obteniendo así un ratio 1:50 respecto a la PrP recombinante. También se incluyó una dilución seriada con control de vehículo DMSO (Sigma-Aldrich), otra con TMPyP-FeIII (200 µM) y 8 muestras no inoculadas como controles de ausencia de propagación, necesarios para la detección de fibras amiloides por Tioflavina T (ThT, del inglés *Thioflavine T*). En este caso,

utilizamos un sistema *Monoshake* (Thermo Scientific) introducido en un horno de laboratorio (Nahita) para controlar la temperatura. Además, se usaron unas literas diseñadas especialmente con este propósito para aumentar al doble el número de diluciones seriadas testadas por cada *Monoshake* (Thermo Scientific). Las condiciones utilizadas son las siguientes: agitación continua a 1000 rpm, 39 °C de temperatura y partículas de cristal de 0,1 – 0,2 mm de diámetro (Sigma-Aldrich). Las muestras se sometieron a una única ronda de PMSA de 24 h.

4 - Detección de la formación de fibras amiloides utilizando ThT

La ThT es un compuesto químico fluorescente de pequeño tamaño capaz de unirse con alta afinidad a las fibras amiloides, aumentando su emisión de luz de forma directamente proporcional a la cantidad de fibras amiloides presentes en la muestra (303). Gracias a estas características, la ThT se ha utilizado para comprobar la formación de fibras amiloides, especialmente de priones. Por ejemplo, se utiliza para determinar la formación de fibras amiloides en tiempo real en el RT-QuIC (302). En nuestro caso la medición se realizará a tiempo final, es decir, someteremos a la muestra a la propagación *in vitro* mediante PMSA y la presencia de fibras amiloides será comprobada una vez finalizado este proceso. El producto de PMSA se diluye en proporción 1:5 en la solución de medición [Acetato sódico (Sigma-Aldrich) 10 mM, ThT (Sigma-Aldrich) 20 µM, ajustado a pH6]. Esta mezcla se coloca en placas negras de 96 pocillos de fondo transparente *Costar® 96xwell black plate assay* (Corning), realizándose 2 repeticiones de cada una de las muestras. A continuación se introduce en el aparato *FLUOstar Optima* (BMG Labtech). Las muestras se incuban durante 15 min a 45 °C en el interior del aparato y a continuación se mide la fluorescencia. Las condiciones de medición utilizadas son las siguientes: longitud de onda de emisión a 450 nm y de recepción a 480 nm, ganancia a 2000 y 20 pulsos por muestra. Entre las muestras medidas siempre se incluyen 8 muestras no inoculadas como controles de ausencia de fibras. La medida de estas muestras se utiliza como control de la autofluorescencia de la ThT en ausencia de fibras amiloides.

$$\Delta RFU = \text{Media de RFU de la muestra} - \text{Media de RFU del control no inoculado}$$

Esta diferencia de unidades relativas de fluorescencia (ΔRFU , del inglés *Relative Fluorescence Units*) será la medida que utilizaremos para determinar si una muestra es positiva o negativa, es decir, si ha habido propagación de priones a niveles detectables o no. Para ello utilizamos la siguiente regla:

Si ΔRFU de la muestra > 10% de la media de RFU del control no inoculado = positivo

Si ΔRFU de la muestra \leq 10% de la media de RFU del control no inoculado = negativo

5 - PMCA como método *in vitro* de propagación de priones

En este apartado se explicará la preparación de los dos tipos de sustratos utilizados para testar la capacidad inhibidora de los compuestos químicos identificados en el cribado masivo y se indicará con detalle el proceso de propagación mediante PMCA.

5.1 - Preparación de sustratos basados en PrP recombinante complementada con homogeneizado de encéfalo de pollo

Al igual que en la preparación de sustratos para PMSA, todos los componentes del mismo se mantuvieron a 4 °C para mantener su estabilidad. Tras su preparación, se alicuotaron convenientemente para evitar ciclos de congelación/descongelación y se conservaron a -80 °C hasta la realización de los experimentos.

Las proteínas producidas según lo explicado en el apartado 2.2 de Materiales y Métodos se diluyeron 1:5 en PBS y se dializaron frente a PBS durante 1 h a temperatura ambiente empleando casetes de diálisis con un límite de exclusión de 10 kDa *Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette 10K MWCO* (Thermo Scientific). A continuación las muestras se centrifugan a 19000 *g* durante 15 min a 4 °C para eliminar los agregados insolubles de proteína anormalmente plegada y precipitada. Finalmente recogemos el sobrenadante, que contiene únicamente la proteína soluble plegada y medimos su concentración utilizando el kit *BCA Protein Assay* (Fisher Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante. En este caso, y a diferencia de la PMSA, se acepta un rango de concentración de la proteína que oscila entre 0,5 mg/ml y 1 mg/ml, lo que equivaldría a, aproximadamente, 20 y 40 μM. Dependiendo de la concentración de la proteína esta se diluye utilizando PBS o se concentra mediante filtros de 10 KDa *Microcon Ultra-0.5 10 KDa* (Millipore) hasta obtener una concentración dentro de este rango.

Con el objetivo de complementar los sustratos con todos los factores presentes en el SNC necesarios para estimular la propagación de los priones, utilizamos homogeneizado de cerebro de pollo (*Gallus gallus domesticus*), cuya PrP^C no interviene en el proceso de propagación al no ser convertible. Debido a la complejidad de llevar a cabo la perfusión de estos animales, los cerebros fueron extraídos lo más rápidamente posible y se lavaron externamente con solución de perfusión [PBS (Fisher Bioreagents), EDTA 5 mM (Sigma-Aldrich)] para eliminar la mayor cantidad de sangre posible. También se complementaron algunos de los sustratos con homogeneizado de encéfalo de ratón *PRNP*^{-/-}. En este caso, los animales se sacrificaron mediante inhalación de dióxido de carbono (CO₂) y se perfundieron inmediatamente mediante perfusión cardíaca con 50 ml de solución de perfusión para eliminar la mayor cantidad de sangre posible. Este proceso es importante, ya que la sangre afecta negativamente al proceso de propagación. Los encéfalos se homogeneizaron al 10 % (p/v)

en solución de conversión fría a la que se le había añadido previamente un inhibidor de proteasas (Roche). Este proceso se llevó a cabo con ayuda de un homogeneizador de vidrio o *Potter* (Fisherbrand) en hielo para evitar el calentamiento de las muestras debido a la fricción que se produce durante la homogeneización. Seguidamente, el homogeneizado se centrifugó a 19000 *g* durante 15 min a 4 °C para eliminar restos de tejido no homogeneizado correctamente, quedándonos con el sobrenadante. Por último, la PrP recombinante dializada y cuantificada se mezcló con el sobrenadante del homogeneizado de encéfalo de pollo o ratón *PRNP*^{-/-} en proporción 1:10 (PrP recombinante : encéfalo de pollo), se alicuotó y se conservó a -80 °C para su posterior uso.

5.2 - Preparación de sustratos basados en homogeneizado de encéfalo de ratón

Con el objetivo de testar los compuestos en un modelo más parecido a una situación *in vivo*, se utilizaron homogeneizados de ratones transgénicos que expresan el gen *PRNP* de oveja o topillo rojo como sustrato en lugar de PrP recombinante complementada con homogeneizado de encéfalo de pollo. Los animales se sacrificaron mediante inhalación de dióxido de carbono (CO₂) y se perfundieron inmediatamente mediante perfusión cardíaca con 50 ml de solución de perfusión para eliminar la mayor cantidad de sangre posible. Los encéfalos se homogeneizaron al 10 % (p/v) en solución de conversión fría a la que se le había añadido previamente un inhibidor de proteasas (Roche). Este proceso se llevó a cabo con ayuda de un homogeneizador de vidrio o *Potter* (Fisherbrand) en hielo para evitar el calentamiento de las muestras debido a la fricción asociada al proceso de homogeneización. A continuación los sustratos se alicuotaron convenientemente y se conservaron a -80 °C para su uso posterior.

5.3 - Propagación *in vitro* de priones mediante PMCA y testado de compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85

La propagación *in vitro* de priones se realizó basándose en el procedimiento de PMCA descrito por Castilla y colaboradores (69, 70, 296) que permite replicar la propagación de priones *in vitro* mimetizando el proceso que tiene lugar *in vivo*, pero con una cinética acelerada.

Todos los experimentos se realizaron en tubos de 0,2 ml de pared fina para favorecer la penetración de las ondas ultrasónicas. El volumen final empleado en todos los casos es de 50 µl. Se utilizó un sonicador Misonix Q-700 con sistema de microplaca (Qsonica) programado para llevar a cabo ciclos de 30 min de incubación y 15 s de sonicación a una potencia del 60 %. La temperatura a lo largo del proceso se mantuvo constante a 38 °C utilizando un baño de agua circulante. También se añadieron partículas de zirconio-sílice de 1 mm para aumentar la homogeneidad de los resultados (317).

Al igual que en el proceso de cribado de compuestos por PMSA, utilizamos diluciones seriadas de las semillas para testar los inhibidores en PMCA. Sin embargo, y basándonos en la experiencia previa del laboratorio, no nos limitamos a las diluciones 1:10¹ - 1:10⁸, sino que estas se variaron en función de la capacidad propagativa de las diferentes cepas de priones utilizadas y del tipo de PrP recombinante o PrP^C presentes en el sustrato. Una vez realizadas las diluciones seriadas se añadieron los compuestos a testar a una concentración final de 500 µM. También se utilizaron como controles las mismas diluciones seriadas con vehículo DMSO y con el inhibidor TMPyP-FelII a 500 µM. A continuación, las diluciones seriadas se sometieron a 24 o 48 h de PMCA utilizando las condiciones especificadas anteriormente.

6 - Digestión de muestras con proteinasa K

La digestión de las muestras con proteinasa K (PK) es el método por excelencia para la detección de PrP^{Sc} en cualquier tipo de muestra, ya sea procedente de técnicas *in vitro*, *in cellula* o *in vivo*. Debido a que a lo largo de esta tesis doctoral se han utilizado diferentes métodos de propagación, las condiciones de digestión han sido adaptados a los diferentes tipos de muestras utilizadas.

Las muestras procedentes de PMSA y de PMCA se digirieron durante 1 h a 42 °C en agitación constante de 450 rpm utilizando un *Thermomixer* (Eppendorf). Sin embargo, las concentraciones de PK variaron dependiendo del sustrato utilizado. En los casos en que la PrP del sustrato era recombinante, tanto en PMSA como en PMCA, se utilizó una concentración de PK (Roche) de 50 µg/ml, mientras que las muestras en las que el sustrato estaba basado en homogeneizado de encéfalo de ratón se utilizó una concentración de PK de 150 µg/ml. Además, con el objetivo de mejorar el proceso de digestión, se utilizaron diferentes mezclas de detergentes (solución de digestión). En el caso de los sustratos recombinantes las muestras se diluyeron 1:2 en PBS con 10 % de Sarkosyl (*N-Laurilsarcosine sodium salt*, Sigma-Aldrich), mientras que las procedentes de encéfalo de ratón se diluyeron 1:7 en PBS con 2 % de Tween-20 (Sigma-Aldrich) + 2 % de Nonidet P40 (Sigma-Aldrich) + 5 % de Sarkosyl (Sigma-Aldrich). En todos los casos, el proceso de digestión se detuvo con la adición de solución de carga *NuPAGE* (Invitrogen Life Technologies).

Las muestras procedentes del modelo de propagación *in cellula* ScN2a se sometieron a una incubación previa a la digestión por PK con el objetivo de lisar las células presentes en el cultivo. Para ello eliminamos el medio de cultivo, dejando las células adheridas al fondo de los pocillos y añadimos 50 µl de solución de lisis [50 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 0.5% Deoxicolato sódico (Sigma-Alrich) y 0,5 % Triton X-100 (Sigma-

Aldrich), ajustado a pH 7,4]. A continuación añadimos 25 µl de Benzonasa (30 µU/µl Sigma-Aldrich) e incubamos las muestras a 37 °C durante 30 min para digerir los ácidos nucleicos presentes en la muestra, ya que estos aumentan la viscosidad de la muestra y afectan al proceso de *Dot Blot* que realizamos posteriormente. Transcurridos los 30 min, añadimos 25 µl de PK (Roche) para obtener una concentración final de 100 µg/ml. Incubamos durante 1 h a 37 °C y detuvimos la digestión añadiendo 100 µl de *Pefabloc* a 1 mM (Sigma-Aldrich), quedando las muestras listas para la detección de proteínas mediante *Dot Blot* (apartado 10 de Material y Métodos).

7 - Detección de proteínas mediante electroforesis y *Western Blot*

Una vez digeridas las muestras, se evaluó la presencia o ausencia de PrP^{res} mediante la técnica de *Western Blot*. La separación proteica se llevó a cabo mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). En todos los casos se utilizó para la separación proteica el sistema *Criterion TGX gel 4-15%* (Bio-Rad), mientras que para la transferencia de las muestras se utilizaron membranas adsorbentes de difluoruro de polivinilideno (PVDF, del inglés *PolyVinylidene DiFluoride*) (*Trans-Blot Turbo Transfer Pack PVDF*, Bio-Rad) y electrotransferencia con el equipo *Trans Blot Turbo System* (Bio-Rad). Tras el bloqueo de la membrana utilizando solución de bloqueo [PBS (Fisher Bioreagents), 5 % (p/v) leche deslipidada, 0,05 % (p/v) Tween-20 (Sigma-Aldrich)] durante 1 h, la membrana se incubó con el anticuerpo primario D18 (1:5000) (Peretz 2001) en todos los casos. Como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (Thermo Scientific Pierce). Tras la incubación de cada anticuerpo durante 1 h a temperatura ambiente se realizaron lavados con una solución de PBS (Fisher Bioreagents) + 0,05 % (p/v) Tween-20 (Sigma-Aldrich). Por último, las bandas se revelaron por quimioluminiscencia utilizando el kit *Super Signal West Pico* (Thermo Scientific Pierce) y la visualización de imágenes digitales se llevó a cabo mediante el equipo *FluorChem Q* (Alpha Innotech) y el software *AlphaView* (Alpha Innotech).

8 - Determinación de la toxicidad de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85

Para la determinación de los niveles de toxicidad de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 utilizamos el modelo celular N2a procedente de neuroblastoma de ratón inoculado con priones de ratón de la cepa RML. Este modelo, también conocido como ScN2a (de Scrapie), es el mismo que utilizamos para testar la capacidad inhibidora de los compuestos nombrados anteriormente. Para ello, se utilizará el ensayo MTT, llamado así por el uso del compuesto MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), el cual solo

puede ser metabolizado por las células vivas presentes en el medio de cultivo. Este proceso de metabolización del MTT genera un compuesto insoluble que precipita en forma de cristales que presentan un característico color morado al ser disueltos en DMSO 100 %, siendo la cantidad de colorante generado proporcional al porcentaje de células vivas presentes en el cultivo. Así, midiendo la cantidad de colorante presente en nuestra muestra mediante la absorbancia a una longitud de onda concreta (570 nm), podemos determinar el porcentaje de células vivas y cómo el compuesto ha afectado a la supervivencia de las mismas.

Las células persistentemente infectadas con la cepa murina RML y conservadas en nitrógeno líquido en alícuotas de 2 ml, se descongelan rápidamente en un baño seco a una temperatura de 37 °C. Una vez descongeladas se añaden 10 ml de medio de cultivo [*Buffer OptiMEM* (Gibco), Suero Bovino Fetal al 10 % (v/v) (Gibco) y 2 mM de Glutamina (Gibco)]. A continuación, la muestra se resuspendió brevemente y se centrifugó a 200 g durante 5 min a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y el precipitado resultante se resuspendió en medio de cultivo. Este proceso se repite 3 veces para asegurar la total eliminación del medio de congelación, necesario para la conservación de las células en nitrógeno líquido. Finalmente, diluimos el medio de cultivo con las células resuspendidas en proporción 1:5 en nuevo medio de cultivo atemperado y los introducimos en un frasco de cultivo celular de 25 cm² (Corning). Finalmente, los frascos se incuban a 37 °C en presencia de un 5 % de CO₂ utilizando un incubador *Heracell 150i* (ThermoFisher).

Una vez que las células han alcanzado la confluencia deseada (80-90 %), se desecha el medio de cultivo, quedando las células adheridas al fondo del frasco. Con el objetivo de despegar las células del fondo añadimos 3 ml de solución de digestión con Tripsina [Solución 1x 0,05 % Tripsina - EDTA (Sigma-Aldrich)] y dejamos incubar durante 1 min. A continuación, se añade 10 ml de medio de cultivo fresco y se resuspendió varias veces para asegurar la disgregación total de las células en el medio. Esta suspensión de células disgregadas se diluyó 1:10 en medio de cultivo y rellenamos una o varias placas de 96 pocillos de fondo redondeado transparente (Corning), poniendo 95 µl por pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C en presencia de un 5 % de CO₂ durante 3 h 30 min. Transcurrida esta incubación, se añadieron 5 µl de los compuestos a testar, del control TMPyP-FelII y del vehículo DMSO para obtener las concentraciones finales deseadas. En nuestro caso la concentración final de los compuestos y del TMPyP-FelII fue de 100, 50, 10, 1, 0,1 y 0,01 µM. En el caso del control de vehículo, se realizó una simulación de las cantidades de DMSO presentes en las muestras con compuestos. Todas las pruebas a diferentes concentraciones de compuestos y del DMSO se realizaron por cuadruplicado. Además, por razones estadísticas, se realizó un cuadruplicado a una concentración final del 5 % de DMSO para utilizar como control de muerte celular del 100 % de la población. Como control del 0 % de muerte celular utilizamos la

muestra a concentración de compuesto 0,1 μM . Finalmente, las placas se incubaron en presencia de los compuestos utilizando las condiciones descritas anteriormente durante 4 d, momento en el que pudieron ser utilizadas para el ensayo de toxicidad.

Para la realización del ensayo MTT, en primer lugar preparamos una solución de 5 mg/ml del compuesto MTT (Sigma-Aldrich) en H_2O desionizada, se filtró utilizando filtros con tamaño de poro de 0,22 μm y se conservó a 4 °C. Se añadió 10 μl de esta solución al cultivo celular incubado en presencia de compuesto durante 4 d para obtener una concentración final de 0,5 mg/ml y se dejó incubar durante 2 h a 37 °C en presencia de un 5 % de CO_2 . Pasadas las 2 h se eliminó el medio de cultivo, asegurándose de no despegar los cristales generados como resultado del metabolismo del compuesto MTT, que se encuentran adheridos al fondo de los pocillos. Se añadieron 125 μl de DMSO 100 % a cada pocillo para disolver los cristales y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a 570 nm utilizando el aparato *CLARIOstar* (BMG Labtech). Los datos obtenidos se analizaron mediante el software *GraphPad Prism* (GraphPad).

9 - Testado de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 en el modelo de propagación *in cellula* ScN2a

Para testar los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 se utilizó el modelo celular ScN2a. Nuestro objetivo en este caso fue calcular su concentración inhibidora media máxima (IC50, del inglés *half maximal inhibitory concentration*), es decir, la concentración de compuesto necesaria para reducir a la mitad la cantidad de PrP^{res} presente en el cultivo celular.

Los primeros pasos de preparación del cultivo celular fueron idénticos a los detallados en el apartado 8 de Materiales y Métodos. Una vez se dispone del cultivo celular en las placas de 96 pocillos incubadas durante 3 h 30 min a 37°C en presencia de un 5 % de CO_2 , los compuestos se añadieron hasta alcanzar concentraciones finales idénticas a las utilizadas en el ensayo MTT. En este caso también utilizaremos como control de inhibición el compuesto TMPyP-FelII. También se realizaron cuadruplicados de todas las muestras, incluido un cuadruplicado con 5 % de concentración final de DMSO como control del 0 % de PrP^{res}. El control del 100 % de PrP^{res} fue el cuadruplicado al que se añadió DMSO simulando una concentración de compuesto de 0,1 μM . Estos dos controles se incluyeron por razones estadísticas. Una vez añadido el compuesto, el control TMPyP-FelII y el DMSO, al igual que en el ensayo MTT, las muestras se incubaron durante 4 d a 37 °C en presencia de un 5 % de CO_2 . Una vez finalizada la incubación se midieron los niveles de PrP^{res} presentes en la muestra mediante la digestión con PK y el empleo de la técnica *Dot Blot*.

10 - Detección de proteínas mediante la técnica de *Dot Blot*

Una vez digeridas las muestras mediante el protocolo especificado en la sección 6 de Materiales y Métodos, se activó una membrana de PVDF sumergiéndola en metanol (Fisher Chemical) durante 20 s. Seguidamente aclaramos la membrana con H₂O desionizada y solución TBS (Del inglés, *Tris Buffer Saline*) [50 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents) y 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich), ajustado a pH 7,4]. Con el objetivo de transferir las proteínas presentes en las muestras a la membrana activada se utilizó un aparato de microfiltración *Bio-Dot* (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante. Una vez finalizado el proceso de transferencia se incubó la membrana durante 8 min en una solución 3M de GndCl (Fisher Scientific) para asegurar la exposición de los epítomos reconocibles por el anticuerpo utilizado posteriormente. Tras la exposición de los epítomos, se bloqueó la membrana utilizando solución de bloqueo [TBS, 5% (p/v) leche deslipidada + 0,05 % (p/v) Tween-20 (Sigma-Aldrich)] durante 1 h a temperatura ambiente. Como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo anti-PrP 6D11 (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 h. Terminada esta incubación, lavamos la membrana con TBS + Tween-20 0,05 % (p/v) y se incubó 1 h con un anticuerpo secundario policlonal conjugado con fosfatasa alcalina (1:3000) (Santa Cruz Biotechnology). Finalmente se lavó la membrana con TBS + Tween-20 0,05 % (p/v) y se reveló utilizando el kit *Attophos* (Roche), según las condiciones del fabricante. La captación y visualización de las imágenes se realizó mediante el equipo *Typhoon FLA 9500* (GE Healthcare) y el software *Typhoon FLA 9500* (GE Healthcare). Los análisis densitométricos necesarios para estimar la cantidad de PrP^{res} en las muestras se llevó a cabo mediante el software *JImage* (NIH). Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el software *GraphPad Prism* (GraphPad).

RESULTADOS

1 - Desarrollo de la PMSA como nuevo método de propagación *in vitro*

Un gran número de compuestos han sido identificados mediante diferentes sistemas *in vitro* e *in cellula*, siendo algunos de ellos efectivos también en modelos murinos (256, 257). Sin embargo, aunque dos de ellos han sido utilizados en ensayos clínicos en humanos, ninguno ha logrado ralentizar el desarrollo de la enfermedad ni reducir los síntomas en los pacientes (258-260). Por tanto, la descripción de nuevos compuestos con posible actividad anti-priónica es uno de los objetivos principales dentro del campo de estudio de las EET. Con este fin decidimos desarrollar un sistema de propagación *in vitro* sencillo, escalable, reproducible en cualquier laboratorio con un equipo mínimo, que imitara la propagación del prion de la forma más fiel posible a la que ocurre en el SNC y que por tanto se pudiera utilizar para el testado masivo de compuestos con actividad inhibidora del malplegamiento.

Como punto de partida se utilizó la PMCA (71, 318), una técnica ampliamente conocida en el campo, pero imposible de aplicar en testado masivo de inhibidores debido a la complejidad del sistema de sonicación. Por tanto, el primer requisito para un nuevo sistema de propagación *in vitro* que pudiera aplicarse al testado masivo, es que necesite un equipo mínimo, pero sin perder la capacidad de propagar priones *bona fide*. Por ello, se decidió cambiar la sonicación por la agitación como fuente de energía necesaria para inducir el malplegamiento de la PrP. Se evitó el uso de un sistema de sonicación, que no permite la propagación de una gran cantidad de muestras a la vez, siendo además la agitación una fuente de energía más uniforme y estable. En concreto, se utilizó un sistema *Thermomixer* para la optimización y estandarización de las condiciones del ensayo y un sistema *Monoshake*, más sencillo, de reducido tamaño, y escalable para el cribado de la biblioteca de compuestos. La nueva técnica se ha bautizado como amplificación de proteínas malplegadas mediante agitación (PMSA). Al igual que en la PMCA, se utilizaron tubos de 0,2 ml con el fin de introducir los mínimos cambios posibles y mantener de esta forma la propagación de priones infecciosos en el proceso de adaptación y desarrollo de la nueva técnica. Esto diferencia a la PMSA de otras técnicas de propagación *in vitro* que utilizan la agitación como fuente de energía, como por ejemplo el RT-QuIC, que utiliza una placa de 96x pocillos en lugar de los tubos de 0,2 ml. También se mantuvo el uso de partículas esféricas de zirconio-sílice de 1 mm, ya que aumentan la reproducibilidad y la eficiencia de conversión del ensayo (317).

El segundo requisito, consistió en disponer de una fuente prácticamente ilimitada y menos costosa de obtener sustrato convertible a PrP^{res} que los homogenados de encéfalo utilizados

previamente en PMCA, como podría ser la PrP recombinante proveniente de *E. coli*. Nuestro grupo había reportado previamente la generación de priones recombinantes altamente infecciosos utilizando PrP recombinante, sales, detergentes y diferentes cofactores utilizando la PMCA como técnica de propagación *in vitro* y PrP recombinante de topillo rojo con el polimorfismo 109I (319). Por tanto, y debido al interés que ha despertado en los últimos años el topillo rojo como modelo de enfermedades priónicas, se decidió por el uso de esta proteína como sustrato convertible para el desarrollo de la nueva técnica de propagación. La posibilidad de utilizar priones recombinantes con gran capacidad infecciosa que pueden propagarse en sustratos con componentes mínimos, conviene además al tercer requisito necesario para adaptar el nuevo sistema de propagación *in vitro* al testado masivo de compuestos, la necesidad de un método sencillo y rápido para la lectura de los resultados. El uso de sustratos con componentes mínimos, permite prescindir de la necesidad del tratamiento de las muestras con proteasas y posterior *Western blot* para la detección de PrP malplegada, pudiéndose utilizar compuestos fluorescentes con afinidad por las fibras amiloides como la Tioflavina T (ThT, del inglés *Thioflavine T*) y técnicas espectroscópicas para su detección.

Estudios previos de PMCA realizados en nuestro laboratorio demostraron que se pueden propagar cepas de priones infecciosas en PrP recombinante de topillo rojo 109I en ausencia de cofactores o utilizando ARN, ADN plasmídico o dextrano sulfatado. Por ello, se decidió utilizar para el nuevo sistema un sustrato conformado por PrP recombinante de topillo rojo 109I, sales, detergentes y dextrano sulfatado. Se podría haber seleccionado el ARN como cofactor dado que dio lugar también a una cepa con alta capacidad infecciosa *in vivo*, sin embargo la necesidad de obtener grandes cantidades de ARN extraído de hígado añade complejidad y variabilidad al sistema. Además, la purificación de ARN implica la copurificación de otros componentes abundantes en este órgano como el colágeno. Por esta razón, finalmente se utilizó el dextrano sulfatado como cofactor, un compuesto que se puede obtener de forma comercial y proporciona una mayor reproducibilidad. También existía la posibilidad de no utilizar ningún cofactor, pero las cepas de priones obtenidas en este sustrato carente de cofactores resultaron menos infecciosas *in vivo* comparadas con las cepas seleccionadas en presencia de dextrano (319).

Finalmente las condiciones de temperatura y agitación utilizadas inicialmente en el nuevo sistema se basaron también en la PMCA manteniendo en lo posible condiciones similares de incubación y aporte energético. El proceso estándar de PMCA incluye un ciclo de 20 s de sonicación y 30 min de incubación (71). Debido a que la cantidad de energía producida por la agitación es menor comparada con la producida por un sistema de sonicación, decidimos aumentar el ratio agitación/incubación. En concreto utilizaremos como condición inicial 60 s

de agitación a 700 rpm y 5 min de incubación. La temperatura inicial y la concentración de PrP recombinante elegidas inicialmente fueron también las mismas que en la PMCA basada en sustrato de PrP recombinante: 38 °C y 4 µM, respectivamente (319). No obstante, todas estas condiciones utilizadas inicialmente para el desarrollo del sistema, fueron modificadas posteriormente tras un proceso de optimización, el cual será explicado en el apartado 1.2 de Resultados.

1.1 - Obtención de una semilla adaptada al sistema PMSA

Una vez fijadas las condiciones iniciales, el primer paso consistió en la obtención de un prion recombinante o semilla adaptada al nuevo sistema de propagación para su uso posterior en el testado masivo de compuestos. Teniendo en cuenta diferentes trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio se decidió tomar como punto de partida una semilla generada por PMCA en un sustrato compuesto por PrP recombinante de topillo rojo 109I, sales, detergentes y dextrano sulfatado como cofactor. Esta semilla procede de un aislado de EDC sometido a sucesivos pases de PMCA en sustratos basados en PrP recombinante de topillo rojo 109I. Finalmente se obtuvo la semilla L-seeded-Dextran, que al ser inoculada intracerebralmente en topillos rojos 109I presentó un 100 % de tasa de ataque y un periodo de incubación 239 ± 46 d.p.i. (días post-inoculación), observándose los signos típicos de una infección por priones (319). Al trabajar con un sustrato basado en PrP recombinante de topillo rojo 109I y dextrano sulfatado como cofactor en el nuevo sistema de propagación, la elección de esta semilla buscaba mantener la continuidad respecto a la PMCA de la que procedía, tratando de conservar su infectividad.

A lo largo de todo el proceso de adaptación de la semilla original L-seeded-Dextran procedente de PMCA al sistema PMSA utilizamos un sustrato compuesto por PrP recombinante de topillo rojo 109I, tampón fosfato salino (PBS, del inglés *Phosphate Buffer Saline*), Triton X-100 y dextrano sulfatado como cofactor. Este sustrato será nombrado a lo largo de esta tesis doctoral como sustrato recombinante de topillo rojo 109I con dextrano. La semilla procedente de PMCA se diluyó 1:10 en el sustrato mencionado y se sometió a 24 h de propagación en las condiciones detalladas en el apartado anterior utilizando un *Thermomixer*. Tras 24 h de PMSA el producto resultante se diluyó 1:10 en sustrato fresco y se sometió a otras 24 h de propagación en las mismas condiciones. Este proceso se repitió durante 15 pases seriados para la total eliminación por dilución de la semilla original L-seeded-

Dextran procedente de PMCA. A lo largo del proceso se observó propagación efectiva en todos los pases, obteniendo finalmente una semilla adaptada al sistema PMSA con un perfil electroforético tras su digestión con PK idéntico a la semilla L-seeded-Dextran de la que procede. Esta nueva semilla se denominó BVo-Dextran-PMSA, y mantiene la misma movilidad electroforética que la procedente de PMCA L-seeded-Dextran tras su digestión con PK (figura 6 a). Para confirmar la estabilidad de la nueva semilla generada esta se sometió a 33 pases seriados de PMSA en dilución 1:1000 (dilución final de $1:10^{-100}$), no observándose cambios en la movilidad electroforética de la semilla tras su digestión con PK (figura 6b).

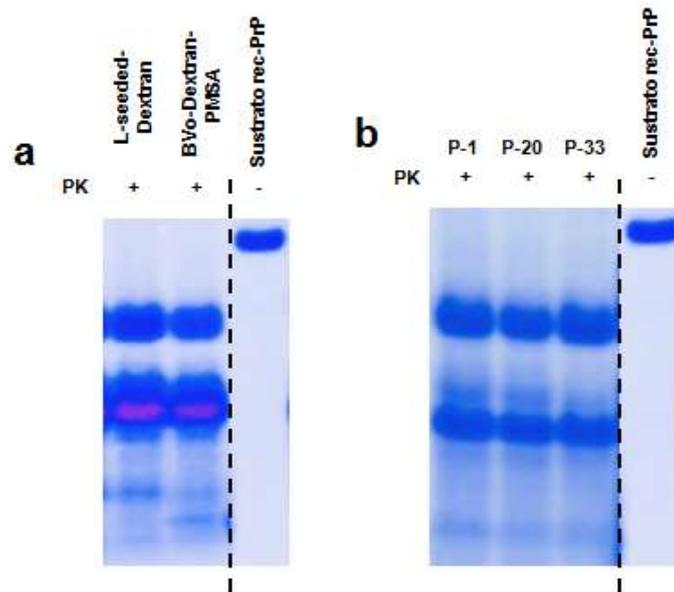


Figura 6. Imágenes de tinción de Coomassie de las semillas L-seeded-Dextran y Bvo-Dextran-PMSA. a) Imagen de tinción de Coomassie donde se muestran las semillas L-seeded-Dextran y BVo-Dextran-PMSA tras su digestión con PK (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de forma comparativa. Se puede observar que ambas semillas son idénticas, a pesar de provenir de sistemas de propagación diferentes. También se incluye un control de sustrato sin digerir para distinguir la diferencia de tamaño entre la PrP recombinante presente en el sustrato y la PrP^{res}. **b)** Imagen de tinción de Coomassie donde se muestran los pases seriados en dilución 1:100 de la semilla BVo-Dextran-PMSA tras su digestión con PK (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). También se incluye un control de sustrato sin digerir para distinguir la diferencia de tamaño entre la PrP recombinante presente en el sustrato y la PrP^{res}. P-1 corresponde a pase 1, P-20 corresponde a pase 20 y P-33 corresponde a pase 33. Incluso después de 33 pases la semilla mantiene el mismo patrón de movilidad electroforética.

La semilla resultante BVo-Dextran-PMSA fue inoculada intracerebralmente en modelos transgénicos murinos que expresan la PrP del topillo rojo I109I para determinar su infectividad. Se observaron los signos clínicos típicos de una EET con un 100 % de tasa de ataque, mostrando un periodo de incubación de 240 ± 14 d.p.i.. Este resultado confirma que ambas semillas, la original generada por PMCA y la propagada y mantenida por PMSA son altamente infecciosas y, acorde a los resultados histopatológicos, indistinguibles entre sí.

1.2 - Optimización del sistema de propagación

Una práctica común en PMCA, y que adoptamos para la PMSA, consiste en evaluar la eficiencia de propagación de diluciones seriadas de una semilla concreta en el sustrato deseado tras someterlas a un ciclo de 24 h de amplificación cíclica. La capacidad propagativa se cuantifica a través de la dilución máxima de semilla a la que se observa una propagación

detectable (320). Por ello, se prepararon 8 tubos con el sustrato recombinante de topillo rojo 109I con dextrano y la semilla adaptada (BVo-Dextran-PMSA) se sometió a diluciones seriadas 1:10: 1:10¹, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷, 1:10⁸. Tras 24 h de propagación en PMSA utilizando las condiciones iniciales descritas previamente (ciclos de 60 s de agitación y 5 min de incubación a 700 rpm y 38 °C en tubos de 0,2 ml con partículas de zirconio-sílice de 1 mm), se comprobaron los niveles de propagación mediante *Western Blot* después de su digestión con PK. En estas condiciones se consiguió detectar propagación de la semilla hasta la dilución 1:10³ (figura 7), lo que suponía una reducción significativa de la capacidad de propagación respecto a la semilla original sometida a 24 h de propagación en PMCA en el mismo sustrato.

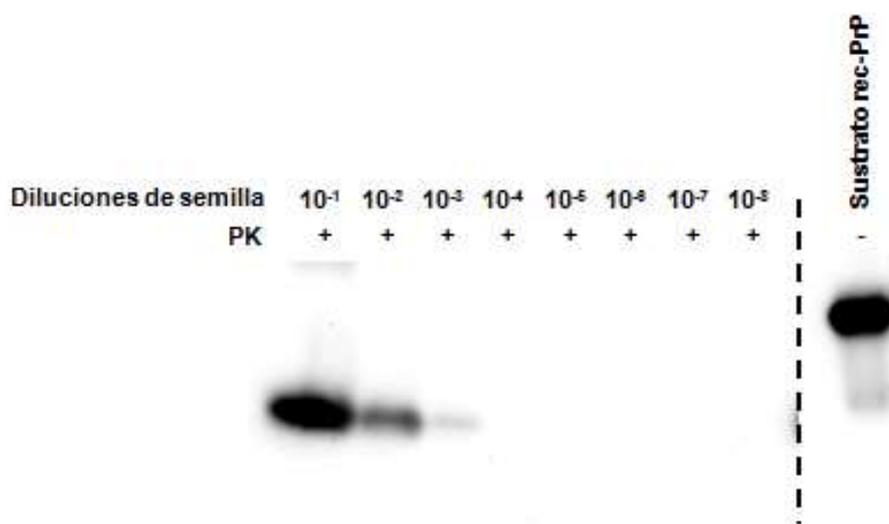


Figura 7. Estudio de la capacidad de propagación mediante PMSA de la semilla BVo-Dextran-PMSA sobre sustrato con PrP recombinante de topillo rojo con el polimorfismo 109I utilizando las condiciones iniciales. Imagen de *Western Blot* donde se muestran los niveles de propagación de la semilla BVo-Dextran-PMSA utilizando las condiciones de propagación iniciales (ciclos de 60 s de agitación y 5 min de incubación a 700 rpm y 38 °C en tubos de 0,2 ml con partículas de zirconio-sílice de 1 mm). La semilla fue diluida 1:10¹ – 1:10⁸ y sometida a una ronda de PMSA de 24 horas. También se incluye un control de sustrato sin digerir para distinguir la diferencia de tamaño entre la PrP recombinante presente en el sustrato y la PrP^{res}. Se divide con línea discontinua el sustrato no digerido, ya que no pertenece a la misma membrana. Revelado con el anticuerpo D18 (1:5000). Bajo estas condiciones iniciales únicamente conseguimos una propagación efectiva en las diluciones 1:10³ y menores.

Una alta eficiencia de propagación es crucial para el adecuado cribado masivo de compuestos, dado que la forma de seleccionar los compuestos de interés será a través de su capacidad de inhibir la propagación de diluciones seriadas de una semilla (1:10¹ - 1:10⁸) tras someterlas a 24 h de PMSA. Con el fin de cuantificar el grado de inhibición observado para cada uno de los compuestos utilizados, los niveles de propagación de un control que solo contiene el vehículo se compararán con los niveles de propagación obtenidos a partir de las diluciones de la semilla en presencia de los diferentes compuestos. Dada la variabilidad intrínseca o estocasticidad de los procesos de propagación *in vitro* de amiloides, una mayor eficiencia de propagación del control respecto a los tratados permitiría observar mayores variaciones entre compuestos sin capacidad de inhibición, con baja capacidad y con alta

capacidad de inhibición. Además, reduciría la posibilidad de falsos positivos al aumentar el margen de detección de inhibidores y establecer umbrales mínimos de inhibición (por ejemplo, considerando inhibidores, solo aquellos compuestos que reduzcan 1000 veces o más la eficiencia de propagación). Por todo ello, la PMSA se sometió a una serie de mejoras secuenciales con el objetivo de aumentar su eficiencia de propagación utilizando la semilla BVo-Dextran-PMSA.

El proceso de optimización consiste en el cambio de una de las variables involucradas en el proceso, manteniendo el resto sin modificar. De todas las variaciones evaluadas sobre esa variable se elige la que muestre una mayor eficacia de propagación utilizando el ensayo de diluciones seriadas. A continuación se fija esta condición como óptima y se varía otra nueva variable, manteniendo la condición óptima ya testada más el resto de iniciales.

Optimización de las condiciones de agitación

En primer lugar se decidió probar diferentes velocidades de agitación, manteniendo el resto de variables sin modificar. Utilizando el ensayo de diluciones seriadas se evaluó la eficiencia de propagación a cero, 400, 700, 1000 y 1200 rpm utilizando un *Thermomixer* y por triplicado. El resultado refleja claramente la implicación de la velocidad de agitación en la efectividad del proceso (figura 8 a). Las muestras no agitadas y agitadas a 400 rpm únicamente muestran niveles detectables de PrP malplegada (PrP^{res}) por *Western Blot* en la primera dilución, aunque es probable que la PrP^{res} observada sea la señal remanente de la propia semilla utilizada. A 700 rpm los niveles de PrP^{res} detectables no superan la dilución 1:10³, dato que concuerda con el explicado anteriormente, ya que estas serían las condiciones iniciales utilizadas para la obtención de la semilla BVo-Dextran-PMSA. Sin embargo, a 1000 rpm se observa una notable mejoría en la eficiencia del proceso, observándose una propagación eficiente hasta la dilución 1:10⁶ en uno de los triplicados. Finalmente, las diluciones testadas a 1200 rpm muestran una eficiencia algo menor que las sometidas a 1000 rpm, por lo que para posteriores pruebas se seleccionó una agitación a 1000 rpm.

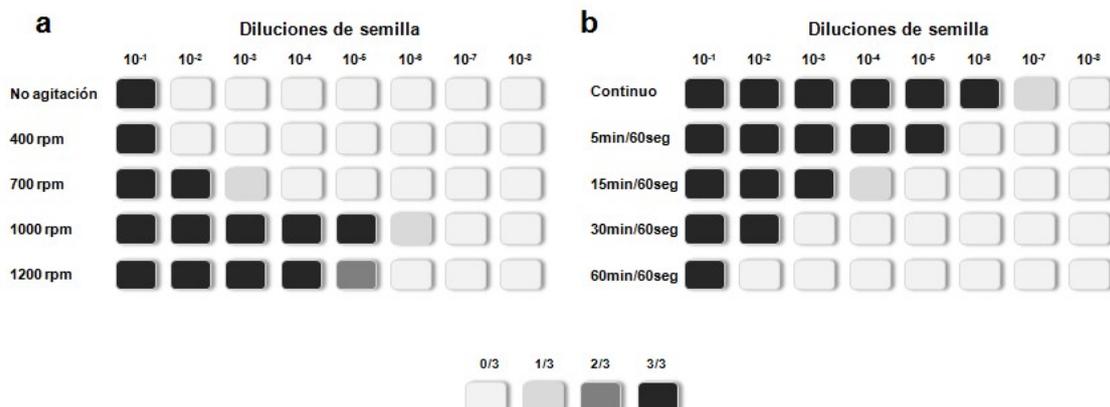


Figura 8. Estudio de la capacidad de propagación mediante PMSA de la semilla BVo-Dextran-PMSA sobre sustrato con PrP recombinante de topillo rojo con el polimorfismo 109I complementado con dextrano sulfatado modificando las condiciones de agitación. a) Gráfico donde se muestran los porcentajes de muestras positivas evaluadas tras digestión con PK y análisis por *Western Blot* de las muestras sometidas a diferentes velocidades de agitación. La semilla BVo-Dextran-PMSA fue diluida $1:10^1 - 1:10^8$ y sometida a una ronda de PMSA de 24 horas, realizándose tres repeticiones de cada una de las velocidades de agitación testadas. El resto de condiciones se mantuvieron como las utilizadas inicialmente (ciclos de 60 s de agitación y 5 min de incubación, 38°C en tubos de 0,2 ml con partículas de zirconio-sílice de 1 mm). El porcentaje de repeticiones positivas aparecen señaladas con distintas intensidades de grises, tal y como se muestra en la leyenda inferior de la figura. La velocidad de agitación más efectiva fue 1000 rpm, obteniéndose niveles detectables de PrPres hasta la dilución $1:10^7$. b) Gráfico donde se muestran los porcentajes de muestras positivas evaluadas tras digestión con PK y análisis por *Western Blot* de las muestras sometidas a diferentes ciclos de incubación/agitación. La semilla BVo-Dextran-PMSA fue diluida $1:10^1 - 1:10^8$ y sometida a una ronda de PMSA de 24 horas, realizándose tres repeticiones de cada una de los ciclos de incubación/agitación testados. El resto de condiciones utilizadas fueron: 1000 rpm de agitación, 38°C en tubos de 0,2 ml con partículas de zirconio-sílice de 1 mm. El porcentaje de repeticiones positivas aparecen señaladas con distintas intensidades de grises, tal y como se muestra en la leyenda inferior de la figura. El ciclo de incubación/agitación más efectivo fue la situación de agitación constante, obteniéndose niveles detectables de PrPres hasta la dilución $1:10^7$.

A continuación se variaron los ciclos de agitación/incubación, manteniendo los 1000 rpm como condición óptima junto con el resto de condiciones iniciales. Se testaron los siguientes ciclos: 60 s de agitación / 60 min de incubación, 60 s de agitación / 30 min de incubación, 60 s de agitación / 15 min de incubación, 60 s de agitación / 5 min de incubación y agitación continua. De nuevo, se realizaron tres réplicas. La condición óptima de propagación fue la agitación continua, obteniéndose niveles detectables de PrPres hasta la dilución $1:10^7$ (figura 8 b). A medida que se disminuía el tiempo de agitación, la eficiencia de propagación se redujo significativamente por lo que se eligió la agitación continua a 1000 rpm como condición óptima.

Optimización del tipo y tamaño de partículas esféricas

Otras de las variables que influyen notablemente en la eficiencia de propagación son el material y el tamaño de las partículas esféricas utilizadas en el sistema. Manteniendo la agitación continua a 1000 rpm, además de las condiciones iniciales de temperatura y concentración de proteína, se testaron las siguientes partículas: zirconio-sílice 1 mm, zirconio-sílice 0,7 mm, teflón 1 mm, acero 1 mm, vidrio 0,2-0,3 mm y ausencia de partículas esféricas. Se realizaron de nuevo tres réplicas de cada condición. Los resultados demuestran que las partículas de vidrio 0,2-0,3 mm son las mejores en cuanto a eficiencia de propagación (figura 9). Se consiguieron niveles de propagación similares utilizando las partículas de zirconio-sílice

de ambos tamaños, aunque algo menores. Por ello, se decidió seguir con las pruebas utilizando partículas esféricas de vidrio de 0,2-0,3 mm de diámetro.

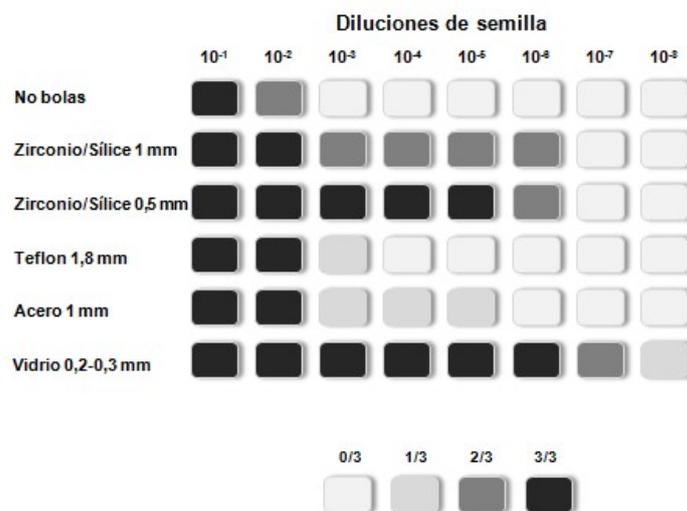


Figura 9. Estudio de la capacidad de propagación mediante PMSA de la semilla BVo-Dextran-PMSA sobre sustrato con PrP recombinante de topillo rojo con el polimorfismo 109I complementado con dextrano sulfatado modificando el tipo y tamaño de partículas esféricas. Gráfico donde se muestran los porcentajes de muestras positivas evaluadas tras digestión con PK y análisis por *Western Blot* de las muestras en presencia de diferentes tipos y tamaños de partículas esféricas. La semilla BVo-Dextran-PMSA fue diluida 1:10¹ – 1:10⁸ y sometida a una ronda de PMSA de 24 horas, realizándose tres repeticiones de cada uno de los tipos y tamaños de partículas testadas. El resto de condiciones utilizadas fueron: agitación continua a 1000 rpm y 38 °C en tubos de 0,2 ml. El porcentaje de repeticiones positivas aparecen señaladas con distintas intensidades de grises, tal y como se muestra en la leyenda inferior de la figura. Las partículas más efectivas promoviendo la propagación por PMSA en las condiciones utilizadas fueron las de vidrio con un diámetro de 0,2-0,3 mm, obteniéndose niveles detectables de PrPres hasta la dilución 1:10⁸.

Optimización de la temperatura

El siguiente paso de optimización se centró en la variación de la temperatura a la cual se llevaba a cabo el proceso de propagación. En este caso se mantuvieron las condiciones óptimas de 1000 rpm en agitación constante y partículas de vidrio de 0,2-0,3 mm, y se realizaron también tres réplicas utilizando un sistema *Thermomixer*. El proceso se llevó a cabo a 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C y 42 °C. Tras las 24 h de PMSA se midieron los niveles de propagación para las diferentes temperaturas. Las diferencias observadas fueron mínimas en el rango de temperaturas utilizado (figura 10). Dado que ninguna temperatura mostró diferencias significativas se seleccionó la temperatura media de todas las testadas, 39 °C.

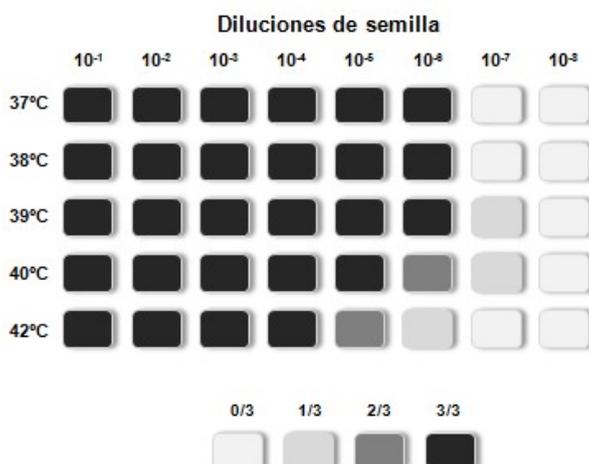


Figura 10. Estudio de la capacidad de propagación mediante PMSA de la semilla BVo-Dextran-PMSA sobre sustrato con PrP recombinante de topillo rojo con el polimorfismo 109I complementado con dextrano sulfatado modificando la temperatura. Gráfico donde se muestran los porcentajes de muestras positivas evaluadas tras digestión con PK y análisis por *Western Blot* de las muestras incubadas a diferentes temperaturas. La semilla BVo-Dextran-PMSA fue diluida $1:10^1 - 1:10^6$ y sometida a una ronda de PMSA de 24 horas, realizándose tres repeticiones de cada una de las temperaturas testadas. El resto de condiciones utilizadas fueron: agitación continua a 1000 rpm en tubos de 0,2 ml con partículas de vidrio de 0,2-0,3 mm. El porcentaje de repeticiones positivas aparecen señaladas con distintas intensidades de grises, tal y como se muestra en la leyenda inferior de la figura. Todas las temperaturas mostraron unos niveles de propagación similares.

Optimización de la concentración de PrP recombinante

La última condición evaluada fue la concentración de proteína PrP recombinante presente en el sustrato. La correcta elección de la concentración de proteína tiene una especial importancia, no solo porque afecta a la eficiencia de la propagación del sistema, sino porque determina la concentración a utilizar de los compuestos a testar. Debido a que el modo de acción más probable de los compuestos inhibidores de la propagación es mediante la interacción con las moléculas de PrP recombinante, el ratio molecular PrP:compuesto resulta un factor esencial para el desarrollo de un sistema de cribado masivo de compuestos. Para asegurar una acción máxima de los potenciales inhibidores de la propagación, durante el cribado masivo se pretende utilizar un ratio de al menos 1:50, existiendo 50 moléculas del compuesto a testar por cada molécula de PrP recombinante. De esta forma, se asegura la saturación incluso en situaciones donde la afinidad del compuesto por la PrP recombinante pudiera no ser muy alta. Como en los casos anteriores, utilizaremos las condiciones fijadas como óptimas hasta ahora: agitación continua a 1000 rpm, partículas de vidrio de 0,2-0,3 mm y 39 °C. Para determinar la mínima concentración de proteína posible (reduciendo la cantidad de compuesto necesario para el testado) se probaron las siguientes: 4, 2, 1, 0,5 y 0,25 μM , por triplicado y utilizando un *Thermomixer*. Las concentraciones más altas mantuvieron una propagación de la semilla eficiente, mostrando niveles de PrP malplegada hasta diluciones $1:10^6-1:10^7$ (figura 11). Aunque las concentraciones de PrP recombinante de 2 μM y de 4 μM mostraron niveles de propagación similares, se utilizará una concentración de 4 μM por ser ligeramente mejor aún sin mostrar diferencias significativas.

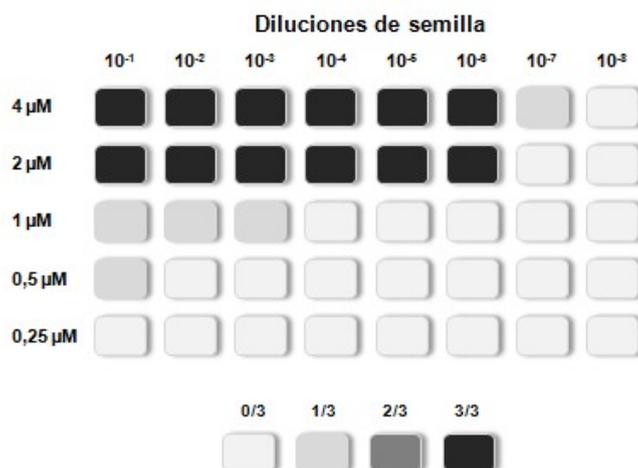


Figura 11. Estudio de la capacidad de propagación mediante PMSA de la semilla BVo-Dextran-PMSA sobre sustrato con PrP recombinante de topillo rojo con el polimorfismo 109I complementado con dextrano sulfatado modificando la concentración de PrP. Gráfico donde se muestran los porcentajes de muestras positivas evaluadas tras digestión con PK y análisis por *Western Blot* de las muestras incubadas a diferentes concentraciones de PrP recombinante. La semilla BVo-Dextran-PMSA fue diluida 1:10¹ – 1:10⁸ y sometida a una ronda de PMSA de 24 horas, realizándose tres repeticiones de cada una de las concentraciones testadas. El resto de condiciones utilizadas fueron: agitación continua a 1000 rpm y 39 °C en tubos de 0,2 ml con partículas de vidrio de 0,2-0,3 mm. El porcentaje de repeticiones positivas aparecen señaladas con distintas intensidades de grises, tal y como se muestra en la leyenda inferior de la figura. Tan solo las concentraciones más altas (2 y 4 μM) mantuvieron unos niveles de propagación altos.

Finalizado el proceso de optimización de las condiciones de PMSA utilizando la semilla BVo-Dextran-PMSA y el sustrato recombinante de topillo rojo 109I con dextrano, se seleccionaron las siguientes condiciones como óptimas para el testado masivo de compuestos: agitación continua a 1000 rpm, partículas de vidrio de 0,2-0,3 mm, 39 °C y una concentración de PrP recombinante de 4 μM. A partir de ahora, salvo que se indique lo contrario, todas las PMSA descritas se realizaron utilizando las condiciones óptimas. Bajo estas condiciones se esperan unos niveles detectables de PrP malplegada mediante *Western Blot* de entre 1:10⁵ y 1:10⁷, lo que asegura una sensibilidad suficiente a la hora de diferenciar compuestos inhibidores reales de las variaciones debidas a la estocasticidad intrínseca al proceso de propagación.

1.3 - Adaptación de la PMSA a un sistema de cribado masivo

A pesar de que el proceso de optimización de la propagación fue un primer paso clave hacia la validación del nuevo sistema para su uso como método de cribado masivo, la necesidad de medir los niveles de PrP malplegada mediante *Western Blot* seguía impidiendo que la PMSA pudiera usarse para este propósito, ya que incrementaría considerablemente el coste y el tiempo necesarios para el cribado. Por tanto, se decidió utilizar la espectrometría valiéndonos de la ThT cuya interacción con fibras amiloides, produce un aumento en la intensidad de fluorescencia de la molécula (303). La detección de fibras amiloides mediante ThT se usa, por ejemplo, en el sistema RT-QuIC, ya que proporciona información acerca de la formación de fibras amiloides en tiempo real. Sin embargo, en nuestro sistema utilizamos

la ThT para realizar medidas a punto final de la propagación con el fin de no alterar la reacción, ya que experimentos realizados con insulina demuestran que la ThT puede afectar al proceso de fibrilización (321), aunque otros datos apunten en la dirección contraria (322).

Basándonos en la bibliografía se decidió utilizar una concentración de ThT de 20 μM (303) para medir la formación de PrP malplegada tras el proceso de propagación por PMSA. Una vez finalizadas las 24 h de propagación, el producto resultante se mezcló en dilución 1:5 con una solución que contenía la ThT y se midió utilizando un fluorímetro. En nuestro caso se utilizaron placas de 96x pocillos y un aparato *Fluostar Optima* (BMG), de forma que se pudieran escalar fácilmente las mediciones, como requiere un sistema de cribado masivo. Además, se incluyeron en cada una de las mediciones ocho muestras no inoculadas sometidas a PMSA durante 24 h, midiendo así la autofluorescencia producida por la ThT en ausencia de fibras amiloides. Todas las muestras se midieron por duplicado. Una vez medidas las diluciones seriadas (1:10¹ - 1:10⁸) y los ocho controles no inoculados, se realizó una media del valor de fluorescencia de las diluciones y a continuación este valor se restó a la media de los controles no inoculados proporcionando la diferencia de unidades relativas de fluorescencia (ΔRFU , del inglés, *Relative Fluorescence Units*).

$$\Delta\text{RFU} = \text{Media de RFU de la muestra} - \text{Media de RFU del control no inoculado}$$

Dada la variabilidad propia del sistema de medición por fluorescencia, resultó necesario establecer una norma para distinguir inequívocamente los controles no inoculados de las diluciones seriadas. Esta norma se estableció basándose en mediciones empíricas comparando resultados obtenidos mediante *Western Blot* y obtenidos mediante medición con ThT, determinando la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} \text{Si } \Delta\text{RFU de la muestra} > 10 \% \text{ de la media de RFU del control no inoculado} &= \text{positivo} \\ \text{Si } \Delta\text{RFU de la muestra} \leq 10 \% \text{ de la media de RFU del control no inoculado} &= \text{negativo} \end{aligned}$$

Este sistema de medición por ThT permitió alcanzar una sensibilidad similar al *Western Blot* (figura 12), aunque a lo largo de las sucesivas repeticiones se observaron algunas muestras positivas en *Western Blot* que no se pudieron detectar utilizando la medición por ThT. Estas muestras, detectadas únicamente por *Western Blot*, contenían una cantidad mínima de PrP^{res} casi en el límite de detección de la técnica y se producían en las últimas diluciones seriadas positivas siendo relativamente infrecuentes, por lo que no repercutieron en la interpretación del resultado final. Estos datos implican que la sensibilidad de la medición por ThT es ligeramente inferior a la del *Western Blot*, aunque suficiente para ser utilizada en el testado masivo de nuestra biblioteca de compuestos.

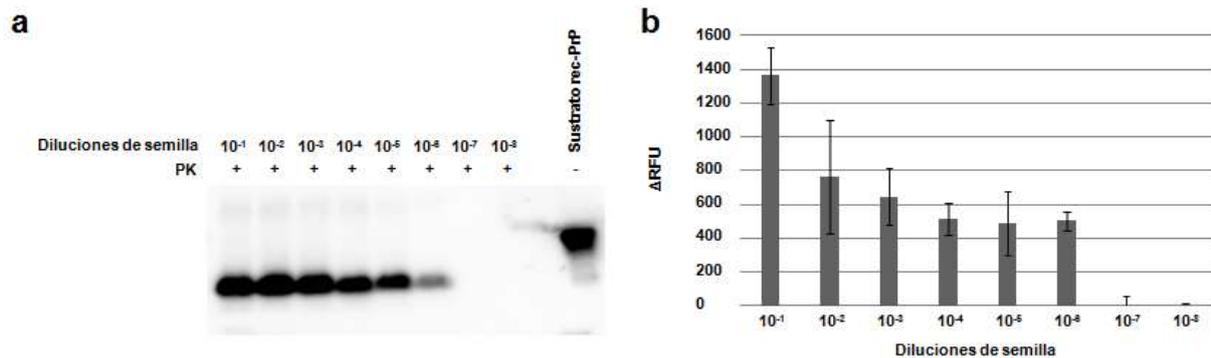


Figura 12. Comparación de la detección de PrP^{res} mediante las técnicas de *Western Blot* y espectrometría con ThT. a) Imagen de *Western Blot* donde se muestran los niveles de propagación de la semilla BVo-Dextran-PMSA utilizando las condiciones de propagación ideales (agitación continua a 1000 rpm y 39 °C en tubos de 0,2 ml con partículas de vidrio de 0,2-0,3 mm). La semilla fue diluida 1:10¹ – 1:10⁸ y sometida a una ronda de PMSA de 24 horas. También se incluye un control de sustrato sin digerir para distinguir la diferencia de tamaño entre la PrP recombinante presente en el sustrato y la PrP^{res}. Revelado con el anticuerpo D18 (1:5000). **b)** Gráfico de la ΔRFU donde se muestran los niveles de propagación medidos por espectrometría con ThT de la misma dilución seriada mostrada en el apartado **a** de esta figura. En ambos casos conseguimos detectar una propagación efectiva en las diluciones 1:10⁶ y menores.

Otro cambio importante respecto a la PMSA básica fue el uso de un *Monoshake* en lugar de un *Thermomixer* como sistema de agitación. Estos permitieron escalar el proceso de propagación fácilmente, al ser menos costosos que los *Thermomixer*, ya que no permiten controlar la temperatura de las muestras. Por esto, los *Monoshakes* se colocaron en el interior de un horno de laboratorio para controlar la temperatura. En nuestro caso se utilizaron tres sistemas *Monoshake* en un mismo horno de laboratorio durante todo el proceso de cribado de la biblioteca de compuestos. Para descartar cualquier diferencia en el proceso por el cambio de *Thermomixers* por *Monoshakes*, se realizaron diluciones seriadas que se sometieron a PMSA durante 24 h en ambos sistemas utilizando las condiciones óptimas descritas en el apartado anterior y se midieron los resultados con ThT. Los resultados demuestran que ambos sistemas funcionan de la misma forma, no observándose reducción en la eficiencia de propagación (figura 13). Además, con el objetivo de escalar el proceso sin necesidad de más equipos y aumentar el número de compuestos que se pudieran testar simultáneamente, se diseñaron unas gradillas especiales en litera que se obtuvieron mediante impresión 3D (IMES3D, Barcelona) (figura 14). Estas también fueron testadas utilizando diluciones seriadas en todas las posiciones posibles sin observarse cambios en la eficiencia de propagación (figura 15).

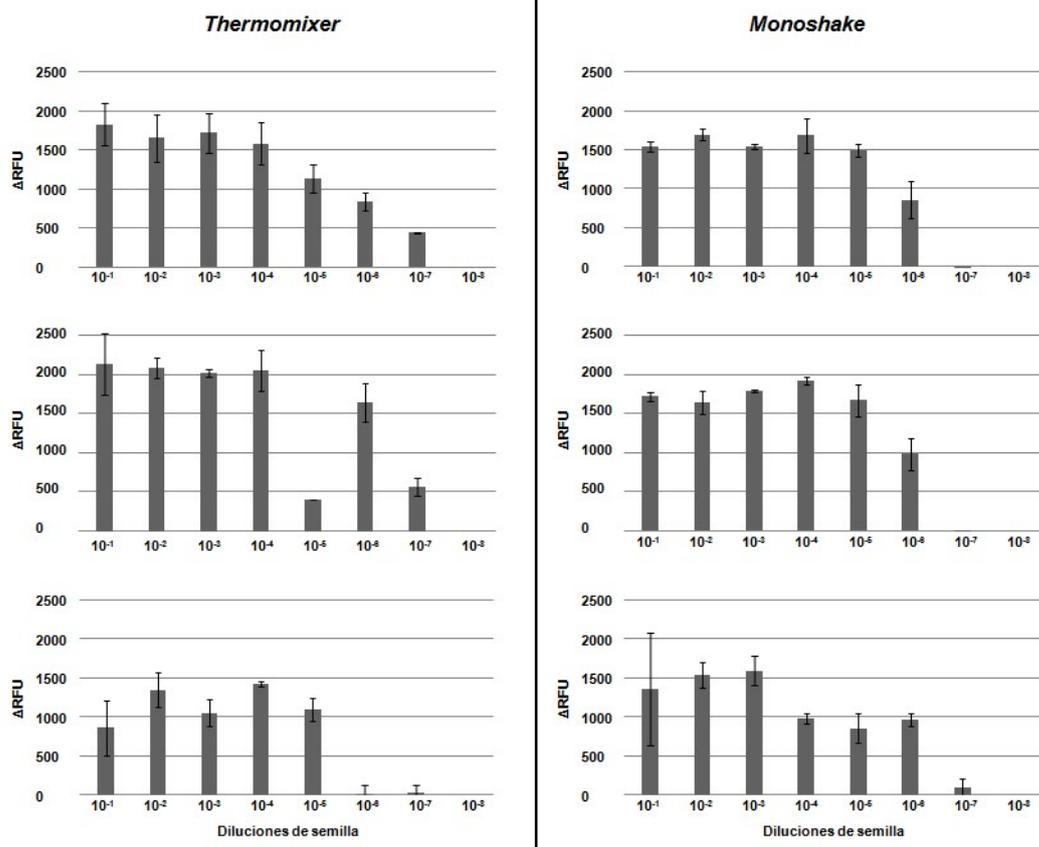


Figura 13. Estudio de la capacidad de propagación de la PMSA utilizando un sustrato con PrP recombinante de topillo rojo con el polimorfismo 109I complementado con dextrano sulfatado comparando el sistema *Thermomixer* y el sistema *Monoshake*. Gráfico de la Δ RFU donde se muestran los niveles de propagación de la semilla en el sistema *Thermomixer* y en el sistema *Monoshake* por triplicado. La semilla fue diluida $1:10^1 - 1:10^8$ y sometida a una ronda de PMSA de 24 horas utilizando ambos sistemas. Se muestran los resultados de las tres diluciones agitadas en cada uno de los sistemas. La cantidad de fibras amiloides presentes en las muestras se midieron mediante espectrometría con ThT. Independientemente del sistema utilizado se consiguieron los mismos niveles de propagación.



Figura 14. Imágenes de las gradillas especiales en litera.

Seguidamente, se comprobó la robustez del sistema PMSA adaptado al cribado masivo de compuestos en presencia de dimetilsulfóxido (DMSO) a diferentes concentraciones, ya que este es el vehículo más común de las bibliotecas de compuestos químicos disponibles comercialmente. Se utilizaron diluciones seriadas para comparar concentraciones de DMSO crecientes, desde un 1 % hasta un 8 %. En ningún caso se observaron cambios en la eficiencia

de propagación ni en la detección por ThT. También se sometió el sustrato de PMSA a varios ciclos de congelación/descongelación para determinar si una incorrecta manipulación del mismo podía afectar notablemente al sistema. En este caso tampoco se observaron cambios en la propagación ni en la detección por ThT, incluso realizando cuatro ciclos de congelación/descongelación, demostrando la robustez del método.

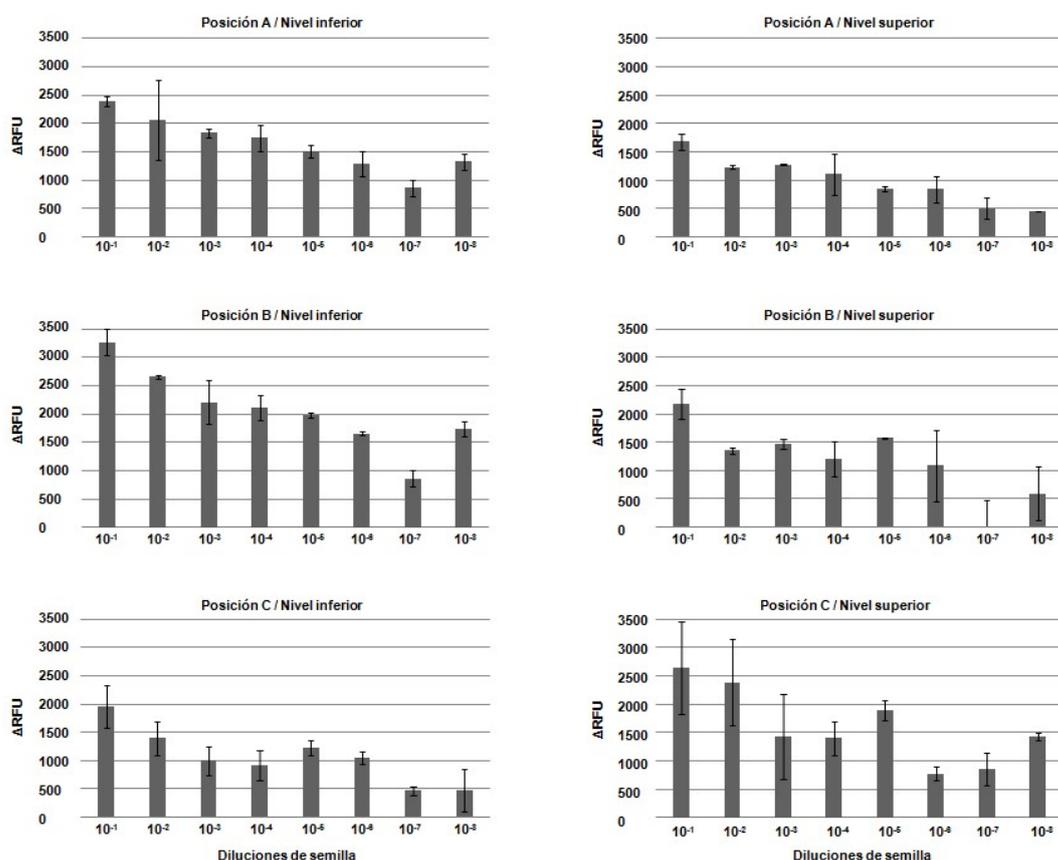


Figura 15. Estudio de la capacidad de propagación de la PMSA utilizando un sustrato con PrP recombinante de topillo rojo con el polimorfismo 109I complementado con dextrano sulfatado en diferentes posiciones de las gradillas especiales en litera. Gráfico de la Δ RFU donde se muestran los niveles de propagación de la semilla en diferentes posiciones dentro de la gradilla especial en litera. Las posiciones A, B y C aparecen referenciadas en la figura 14. La semilla fue diluida 1:10¹ – 1:10⁸ y sometida a una ronda de PMSA de 24 horas utilizando las gradillas especiales. La cantidad de fibras amiloides presentes en las muestras se midieron mediante espectrometría con ThT. Independientemente de la posición en la que se colocaron las diluciones seriadas en la litera especial se consiguieron los mismos niveles de propagación.

Por último, se testó el sistema utilizando dos compuestos químicos diferentes con actividad inhibitoria: TMPyP-FelIII, un inhibidor confirmado por diferentes técnicas de propagación *in vitro* e *in cellula* (Biasini 2016) y la Clorpromazina, un compuesto que actúa reduciendo la propagación en modelos celulares, pero que es inactiva en modelos de propagación *in vitro* (Stincardini 2017). Como control de vehículo utilizamos una concentración del 1 % de DMSO. La concentración final de ambos compuestos fue de 500 μ M, observándose una clara reducción (1×10^7 veces) en la dilución seriada en presencia del compuesto TMPyP-FelIII, mientras que el compuesto Clorpromazina no fue capaz de reducir los niveles de propagación respecto al control con vehículo (figura 16). Estos datos concuerdan con los obtenidos en

experimentos previos utilizando otros modelos de propagación, confirmando así la robustez de la PMSA como método de propagación *in vitro*.

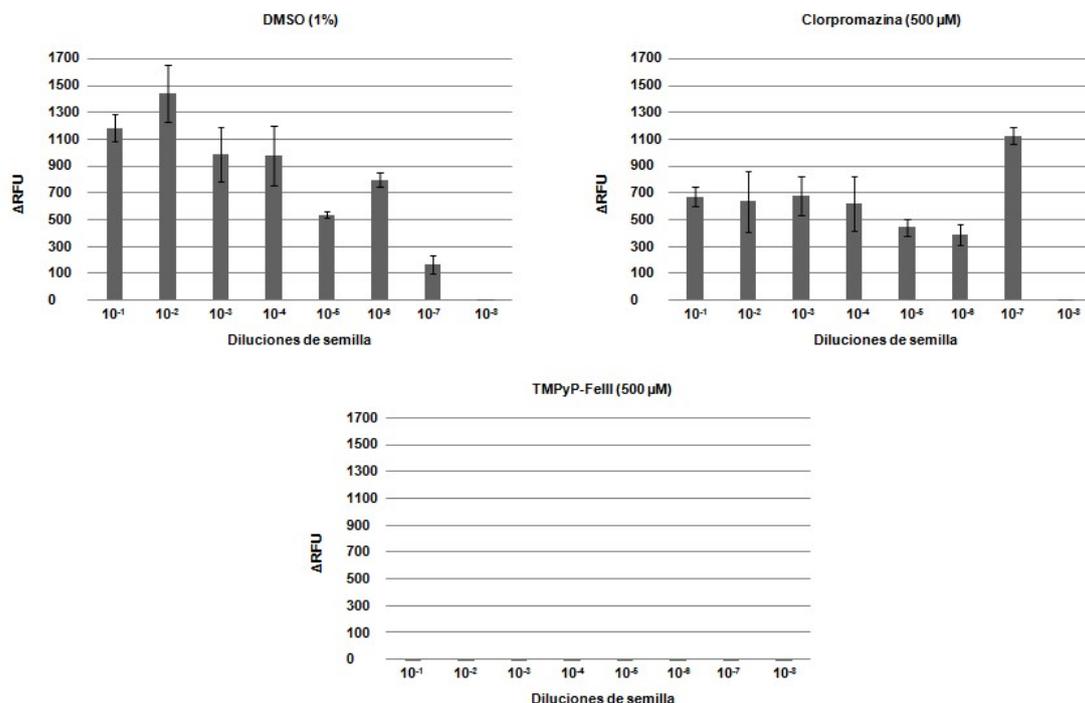


Figura 16. Estudio de la capacidad de inhibición mediante PMSA de los compuestos TMPyP-FelII y Clorpromazina sobre sustrato con PrP recombinante de topillo rojo con el polimorfismo 109I complementado con dextrano sulfatado. Gráfico de la Δ RFU donde se muestran los niveles de propagación de la semilla utilizando los inhibidores TMPyP-FelII y Clorpromazina a una concentración de 500 μ M y el vehículo DMSO (1%). La semilla fue diluida 1:10¹ – 1:10⁸ y sometida a una ronda de PMSA de 24 horas. La cantidad de fibras amiloides presentes en las muestras se midieron mediante espectrometría con ThT. Tan solo el compuesto TMPyP-FelII fue capaz de mostrar una inhibición efectiva de la propagación, mientras que el compuesto Clorpromazina no tuvo efecto sobre los niveles de propagación.

2 - Cribado de la biblioteca Ro3 Maybridge

Una vez optimizada la propagación de la PMSA y finalizada su adaptación para el cribado masivo de compuestos, el siguiente paso consistió en la elección y preparación de la biblioteca a testar como prueba de concepto. Se utilizó la biblioteca comercial R03 Maybridge, compuesta por químicos de pequeño tamaño y con alta diversidad estructural, lo que aseguraba el cribado de un gran número de farmacóforos diferentes. Además, los compuestos se caracterizan por su elevada solubilidad en DMSO y PBS, facilitando su manejo y almacenamiento. La librería está formada por 2500 compuestos preparados a 200 mM en DMSO, siendo uno de los objetivos principales de esta tesis doctoral el cribado de todos ellos a través del sistema PMSA. Debido a que los compuestos presentarán diferentes afinidades por la PrP, se utilizó un ratio PrP:compuesto alta (1:50) para asegurar así la unión de incluso los compuestos con menor afinidad por la PrP. En este sentido es importante tener en cuenta que se trata de compuestos muy pequeños, del orden de 100-200 Dalton, que podrían no ser muy efectivos por sí solos, pero sí en combinación con otros. Por ello resultaba primordial

detectar incluso los menos efectivos, ya que la información obtenida sería muy útil para futuros estudios de mejora farmacológica combinándolos o realizando pequeños cambios en su estructura.

Teniendo en cuenta que en el sustrato la concentración de PrP recombinante es de 4 μM , necesitábamos los compuestos a testar a una concentración final de 200 μM para cumplir con el ratio 1:50. También se debió tener en cuenta que no se podía aumentar el porcentaje de DMSO en el ensayo por encima del 8 %, ya que se podría ver afectada la eficiencia de propagación. Por este motivo, se prepararon los compuestos de la biblioteca a 10 mM con una concentración final del 50 % DMSO en PBS. De esta forma la concentración final de DMSO en el ensayo sería del 1 %.

Para asegurar la mayor reproducibilidad posible se usaron los mismos tres *Monoshakes*, las mismas gradillas en litera y el mismo horno de laboratorio durante todo el proceso de cribado. Teniendo en cuenta que en cada uno de los dos niveles de la litera se podían colocar doce diluciones seriadas 1:10¹ - 1:10⁸ y que se utilizaron tres *Monoshakes* con una litera cada uno, se pudieron testar setenta y dos diluciones diarias. Sin embargo, no todas ellas contenían compuestos de la librería, ya que cada día se colocaron ocho tubos con sustrato no inoculado como control para las mediciones con ThT, una dilución seriada con vehículo como control de propagación y una dilución seriada con TMPyP-FeIII como control positivo de compuesto inhibidor. Estos tres controles fueron cambiándose de posición entre los tres *Monoshakes* y los dos niveles de las literas de forma rotatoria, para asegurar así la mayor uniformidad posible en los datos durante todo el proceso. En cualquier caso, no se observaron variaciones en los controles a lo largo del proceso de cribado, obteniéndose niveles de propagación de entre 1:10⁶ y 1:10⁸ en los controles con DMSO (figura 17) y ausencia total de propagación en los controles de TMPyP-FeIII en todos los casos. Sin embargo, se observó de forma esporádica la formación de fibras amiloides espontáneas en algunos de los controles no inoculados, tema que se tratará en el apartado de Discusión.

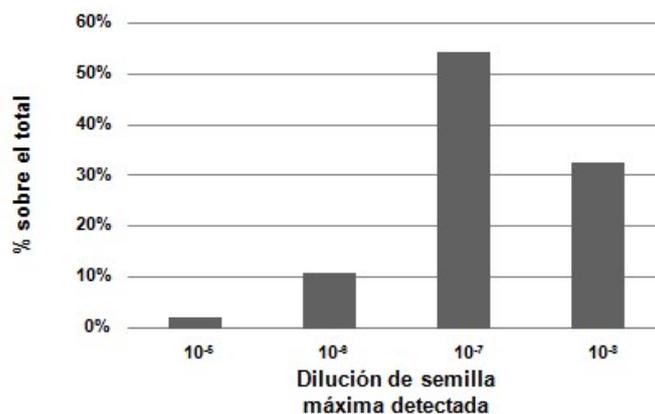


Figura 17. Porcentaje de diluciones seriadas con vehículo DMSO que han alcanzado una determinada dilución máxima detectada mediante la espectrometría con ThT durante el cribado de la biblioteca Ro3 Maybridge por PMSA. En el gráfico se incluyen todos los controles de vehículo de DMSO que se han realizado a lo largo del cribado masivo de la biblioteca Ro3 Maybridge. En total hay 46 diluciones seriadas, siendo la dilución máxima detectada por espectrometría con ThT más común 1:10⁷. Tan solo el 2 % de los controles tuvieron una dilución de semilla máxima detectada de 1:10⁵.

Teniendo en cuenta las variaciones intrínsecas al propio proceso de propagación, solo se aceptaron como posibles inhibidores aquellos compuestos que redujeron la propagación de la semilla 1000 veces o más respecto a la dilución seriada con vehículo utilizada ese mismo día. Se decidió aplicar este punto de corte al comprobar que, tras la repetición continuada de las diluciones seriadas con vehículo, salvo en un caso, no se observó entre ellas diferencias mayores de 1000 veces en los niveles de propagación (figura 17). Teniendo en cuenta el número total de controles con DMSO utilizados a lo largo del proceso de cribado este caso único representaría, aproximadamente, el 2 % del total. Con el propósito de no perder ningún posible inhibidor de la propagación se decidió mantener este filtro, a pesar de la posibilidad de obtener un 2 % de falsos positivos entre los inhibidores.

De los 2500 compuestos de la biblioteca R03 Maybridge, 118 redujeron los niveles de propagación 1000 veces o más respecto al control de vehículo, representando el 4.7 % del total (figura 18). Estos compuestos se sometieron a una ronda confirmatoria utilizando las mismas condiciones, aparatos y literas que en la primera fase del cribado con el objetivo de excluir de las siguientes fases los falsos positivos asociados a la estocasticidad intrínseca del sistema. De estos 118 compuestos, 42 se confirmaron como positivos teniendo en cuenta la regla de la reducción de 1000 o más veces en los niveles de propagación (figura 18). Este dato implica que 76 de los compuestos, un 3 % del total, resultaron ser falsos positivos, en concordancia con el 2 % esperado. La pequeña diferencia entre ambos porcentajes podría deberse a la disparidad en el número total de muestras sólo con vehículo o con inhibidores, habiéndose realizado 46 diluciones con DMSO frente a las más de 2600 diluciones del cribado.

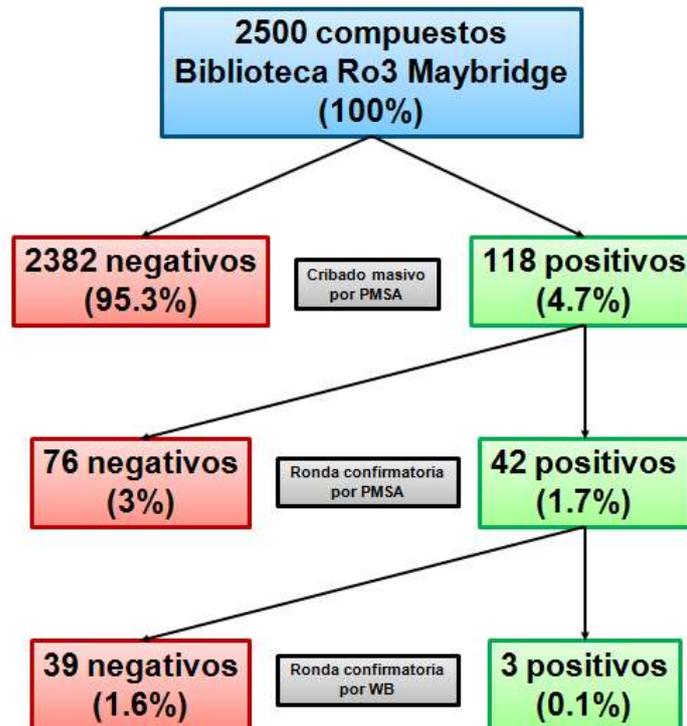


Figura 18. Esquema que muestra el flujo de trabajo realizado durante el cribado masivo de la biblioteca Ro3 Maybridge y los porcentajes de compuestos positivos o negativos en las sucesivas fases del cribado y rondas confirmatorias.

Otra potencial fuente de falsos positivos surge del fenómeno de desactivación fluorescente o *quenching* que puede sufrir la ThT durante la medición de la fluorescencia emitida. Este fenómeno se debe a la presencia durante la medición de compuestos químicos capaces de absorber luz a 480 nm, que es el espectro de emisión de la ThT. Al haber en la mezcla el doble de compuesto que de ThT la emisión de luz de esta quedaría enmascarada. Esto se plasmaría en nuestros datos como una inhibición del proceso de propagación que no es real, ya que no se podría ver la fluorescencia emitida por la ThT en presencia de fibras amiloides al absorberla el compuesto presente. Debido a este fenómeno se decidió realizar una segunda ronda confirmatoria en la que la presencia o ausencia de PrP^{res} en las muestras sometidas a PMSA fue comprobada por *Western Blot*. Para ello, los productos de las PMSA de la ronda de confirmación que ya habían sido medidos por ThT se digirieron con PK; tanto los controles con vehículo y TMPyP-FelII, como los 42 compuestos que inhibieron 1000 veces o más la propagación de la semilla, para comprobar si la inhibición observada mediante espectrofluorimetría era real o consecuencia de la desactivación de la fluorescencia (figura 18). De los 42 supuestos inhibidores, 39 resultaron ser falsos al no observarse una diferencia de 1000 veces o más en la inhibición de la propagación respecto al control con vehículo. Por tanto, 3 compuestos cumplían con todos los requisitos para ser considerados sin duda, inhibidores de la propagación de la semilla en el sistema PMSA. Estos 3 compuestos, llamados L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85, representan el 0,12 % del total de compuestos testados (figura 19).

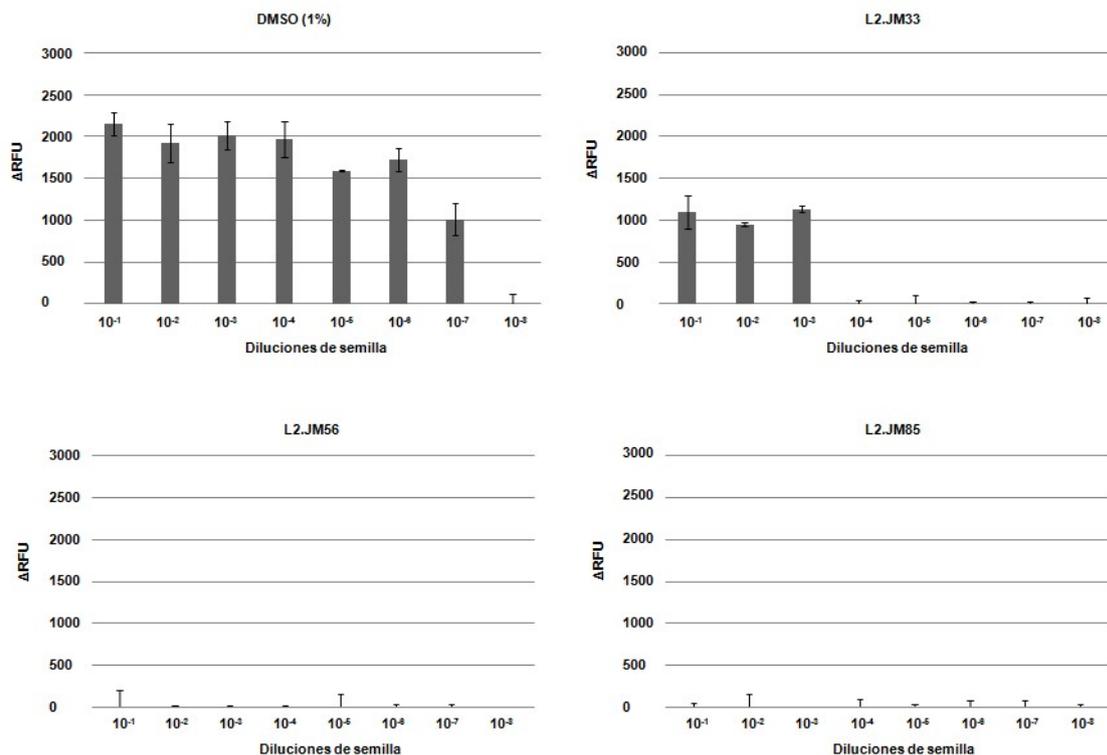


Figura 19. Resultado de propagación de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 mediante PMSA obtenidos en el cribado masivo de la biblioteca Ro3 Maybridge. Gráfico de la Δ RFU donde se muestran los niveles de propagación de la semilla utilizando los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 a una concentración de 200 μ M y el vehículo DMSO (1%). La semilla fue diluida 1:10¹ – 1:10⁸ y sometida a una ronda de PMSA de 24 horas. La cantidad de fibras amiloides presentes en las muestras se midieron mediante espectrometría con ThT. Los tres compuestos muestran una reducción en los niveles de propagación de 1000 veces o más.

3 - Confirmación de la capacidad inhibidora de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 mediante técnicas alternativas

Una vez identificados los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 como inhibidores de la propagación mediante el sistema de cribado *in vitro* basado en la PMSA, se quiso confirmar su actividad mediante otros sistemas de propagación, comprobando a su vez si la inhibición era exclusiva para la semilla y sustrato utilizados en el cribado o se daba también con otras cepas de priones y otras especies. Debido a nuestra experiencia previa, decidimos utilizar la PMCA como método de testado *in vitro* de los compuestos en diferentes especies, utilizando PrP recombinante humana 129M, de oveja ARQ y de topillo rojo 109I complementada con homogeneizado de encéfalo de pollo, con el fin de evaluar si la inhibición seguía siendo efectiva en presencia de todos los factores que pueden encontrarse en el SNC. Además, también se utilizaron como sustratos un homogeneizado de un modelo transgénico murino que sobre-expresa la PrP^C de oveja (Tg338) y otro que sobre-expresa (2x) la PrP^C de topillo rojo (TgVole), siendo estos unos modelos más parecidos a una situación *in vivo* al poseer PrP^C glicosilada y con GPI. Finalmente, se testaron los compuestos en el modelo celular de neuroblastoma de ratón N2a inoculado con la cepa murina RML, donde se comprobó la

toxicidad de los compuestos y se calculó su concentración inhibidora media (IC50, del inglés *half maximal inhibitory concentration*).

3.1 - Confirmación de la capacidad inhibidora de la propagación *in vitro* mediante PMCA

Para testar la capacidad inhibidora de los compuestos en diferentes especies mediante la PMCA se utilizaron diluciones seriadas de distintas semillas. En lugar de utilizar un sustrato basado en sales, detergentes y dextrano sulfatado se utilizó PrP recombinante complementada con homogeneizado de encéfalo de pollo (*Gallus gallus domesticus*). Diferentes experimentos realizados en nuestro laboratorio han demostrado una mayor eficiencia con este tipo de sustrato a la hora de promover la propagación de la semilla, en comparación con los sustratos basados en proteína recombinante complementadas con homogeneizado de encéfalo de ratón *PRNP*^{-/-}. Además, la PrP^C de pollo no es convertible, por lo que la presencia de esta no interfiere en el proceso de propagación (323). Las PrP recombinantes utilizadas fueron la humana con el polimorfismo 129M, la de oveja con polimorfismos 136A 154R 171Q y la de topillo rojo con el polimorfismo 109I. El tipo de dilución utilizada dependió de la proteína recombinante utilizada en cada sustrato y de la semilla seleccionada. La experiencia previa del laboratorio mostraba que cada semilla tiene eficiencias de propagación específicas. En todos los casos, una vez realizadas las diluciones seriadas de la semilla en el sustrato correspondiente, se añadieron los compuestos a una concentración final de 500 µM. Se utilizó una concentración mayor de compuesto que en el cribado masivo, donde se trabajó con 200 µM, debido a la mayor complejidad en composición del sustrato utilizado. A diferencia del sustrato complementado con dextrano sulfatado, en PMCA se utilizó homogeneizado de encéfalo de pollo como complemento de la PrP recombinante, por lo que se aumenta en gran medida la presencia de lípidos, ácidos nucleicos, proteínas y demás componentes celulares. Todos estos cofactores podrían alterar la interacción entre los compuestos químicos a testar y la PrP, por ejemplo, secuestrando las moléculas de compuesto. Además de la dilución seriada en la que se añadió el compuesto a testar, se realizaron dos diluciones idénticas como control a las que se añadió el vehículo DMSO y el compuesto TMPyP-FelII a una concentración de 500 µM.

En primer lugar se testaron los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 utilizando sustrato con PrP recombinante de topillo rojo 109I. Se utilizó este sustrato por ser el más parecido al utilizado durante el cribado masivo, ya que la proteína recombinante utilizada es idéntica en ambos casos. En cuanto a la semilla utilizada para realizar las diluciones seriadas, proviene de un experimento de espontaneidad en PMCA utilizando un sustrato basado en PrP recombinante de topillo rojo 109I complementado con encéfalo de ratón *PRNP*^{-/-} (319). Tras la realización de las diluciones seriadas (1:10⁵ - 1:10¹²) y la adición de los compuestos, el

vehículo DMSO y el inhibidor TMPyP-FelIII, las muestras se sometieron a una única ronda de PMCA de 24 h. Finalmente, los productos resultantes se digirieron con PK y la presencia o ausencia de propagación se comprobó por *Western Blot* utilizando el anticuerpo anti-PrP D18 (figura 20). El compuesto L2.JM56 dio lugar a una inhibición efectiva del proceso de propagación, reduciendo los niveles de la misma 1×10^8 veces. Sin embargo, el compuesto L2.JM33 mostró una capacidad de inhibición muy reducida, mientras que el compuesto L2.JM85 no produjo ninguna reducción en los niveles de propagación.

Seguidamente, se testaron los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 utilizando sustrato con PrP recombinante de oveja ARQ. Dado que el mecanismo de inhibición más probable de estos compuestos se deba a la estabilización de la PrP, independientemente de qué especie se trate, se quiso evaluar cómo influía la inhibición de la propagación en una cepa priónica de otra especie, cuyo origen tiene una gran relevancia en el área de priones. La

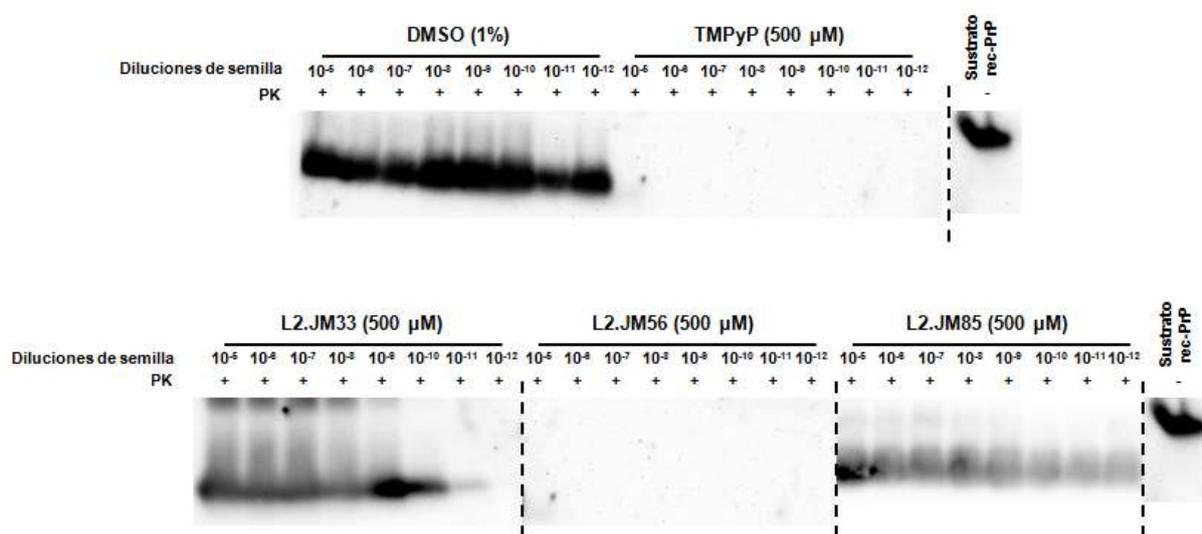


Figura 20. Estudio de la capacidad de inhibición mediante PMCA de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 sobre sustrato con PrP recombinante de topillo rojo con el polimorfismo 109I complementado con homogeneizado de encéfalo de pollo. Imagen de *Western Blot* donde se muestran los niveles de propagación de la semilla utilizando los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 a una concentración de 500 μM , el vehículo DMSO (1%) y el inhibidor TMPyP-FelIII (500 μM). La semilla fue diluida $1:10^5 - 1:10^{12}$ y sometida a una ronda de PMSA de 24 horas. También se incluye un control de sustrato sin digerir para distinguir la diferencia de tamaño entre la PrP recombinante presente en el sustrato y la PrP^{res}. Se divide con línea discontinua las diluciones y sustratos no digeridos procedentes de diferentes membranas. Revelado con el anticuerpo D18 (1:5000). Únicamente el compuesto L2.JM56 mostró unos niveles de inhibición similares a los del control TMPyP-FelIII mientras que el compuesto L2.JM33 redujo los niveles de propagación 10 veces.

semilla utilizada en este caso es una adaptación a la PMCA recombinante de un aislado de Scrapie conocido como Dawson. Tras la realización de las diluciones seriadas ($1:10^3 - 1:10^{10}$) y la adición de los compuestos, el vehículo DMSO y el inhibidor TMPyP-FelIII, las muestras se sometieron a una única ronda de PMCA de 48 h. Finalmente, las muestras se digirieron con PK y la presencia o ausencia de propagación se comprobó por *Western Blot* utilizando el anticuerpo anti-PrP D18 (figura 21). Tanto el compuesto L2.JM56 como el L2.JM85 mostraron una inhibición efectiva del proceso de propagación, siendo mucho más potente el compuesto L2.JM56, como ocurrió al utilizar el sustrato recombinante basado en la PrP del topillo rojo 109I. De nuevo, el compuesto L2.JM33 mostró unos niveles de inhibición muy reducidos.

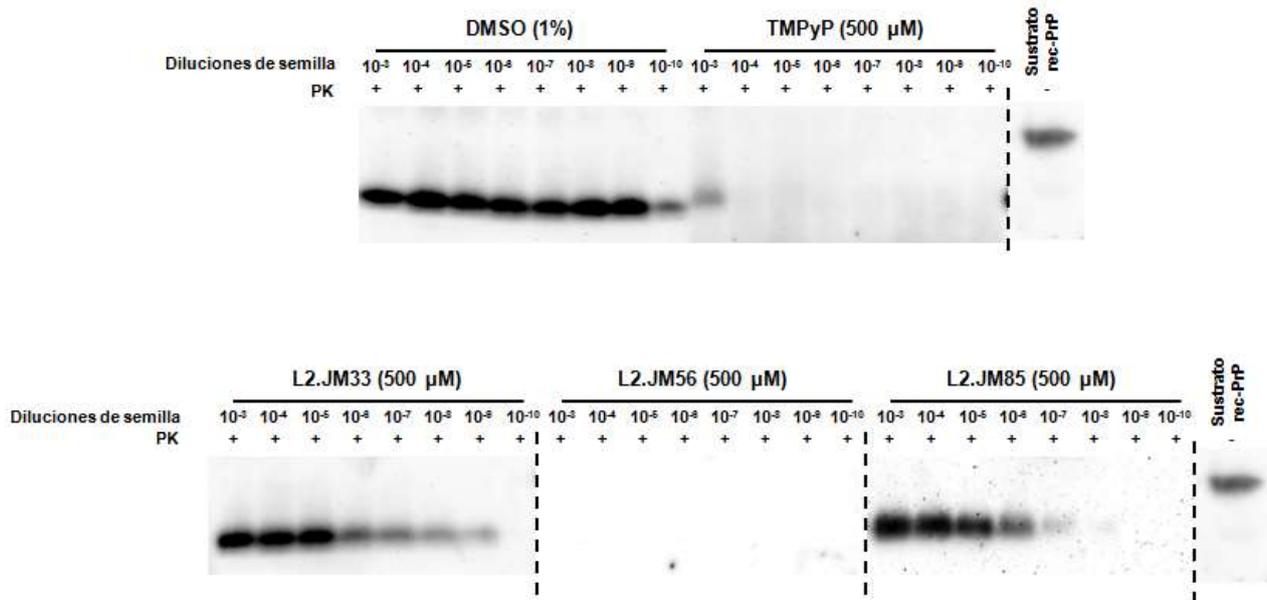


Figura 21. Estudio de la capacidad de inhibición mediante PMCA de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 sobre sustrato con PrP recombinante de oveja con el polimorfismo ARQ complementado con homogeneizado de encéfalo de pollo. Imagen de *Western Blot* donde se muestran los niveles de propagación de la semilla utilizando los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 a una concentración de 500 μM , el vehículo DMSO (1%) y el inhibidor TMPyP-FelII (500 μM). La semilla fue diluida 1:10³ – 1:10¹⁰ y sometida a una ronda de PMSA de 48 horas. También se incluye un control de sustrato sin digerir para distinguir la diferencia de tamaño entre la PrP recombinante presente en el sustrato y la PrP^{res}. Se divide con línea discontinua las diluciones y sustratos no digeridos procedentes de diferentes membranas. Revelado con el anticuerpo D18 (1:5000). Únicamente el compuesto L2.JM56 mostró unos niveles de inhibición similares a los del control TMPyP-FelII, mientras que los compuestos L2.JM33 y L2.JM85 redujeron los niveles de propagación 10 y 1000 veces, respectivamente.

Con el objetivo de testar los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 en un ambiente que mimetizara una infección por priones en un ser humano, se decidió utilizar un sustrato con PrP recombinante humana 129M. Como semilla se utilizó una proteína recombinante humana malplegada adaptada a la PMCA recombinante a partir de un homogeneizado de encéfalo humano con ECJ tipo MM1. Tras la realización de las diluciones seriadas (1:10³ - 1:10¹⁰) y la adición de los compuestos, el vehículo DMSO y el inhibidor TMPyP-FelIII, las muestras se sometieron a una única ronda de PMCA de 24 h. Por último, los productos de PMCA se digirieron con PK y la presencia o ausencia de propagación se comprobó por *Western Blot* utilizando el anticuerpo anti-PrP D18 (figura 22). Se observó una fuerte inhibición por parte del compuesto L2.JM56, reduciendo los niveles de propagación 1x10⁸ veces, de forma semejante a la observada en los sustratos basados en PrP recombinante de topillo rojo 109I y de oveja ARQ. Además, a diferencia de los otros sustratos testados anteriormente, el compuesto L2.JM33 mostró una mayor capacidad de inhibición en el sustrato humano (1x10³ veces), aunque sin llegar en ningún caso a la reducción en los niveles de propagación causada por el compuesto L2.JM56. El compuesto L2.JM85 no produjo ninguna reducción en los niveles de propagación.

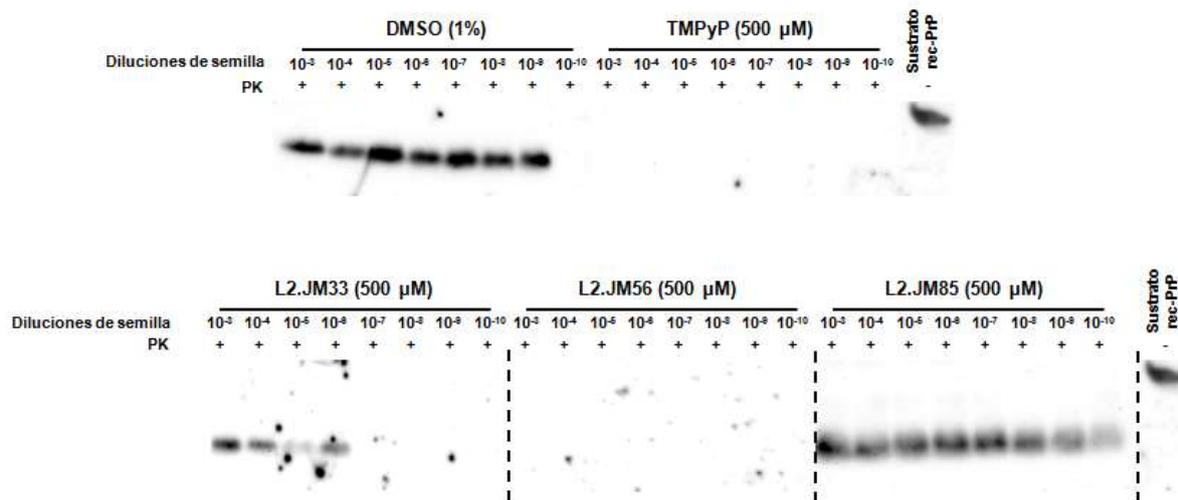


Figura 22. Estudio de la capacidad de inhibición mediante PMCA de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 sobre sustrato con PrP recombinante humana con el polimorfismo 129M complementado con homogeneizado de encéfalo de pollo. Imagen de *Western Blot* donde se muestran los niveles de propagación de la semilla utilizando los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 a una concentración de 500 μM , el vehículo DMSO (1%) y el inhibidor TMPyP-FeIII (500 μM). La semilla fue diluida 1:10³ – 1:10¹⁰ y sometida a una ronda de PMCA de 48 horas. También se incluye un control de sustrato sin digerir para distinguir la diferencia de tamaño entre la PrP recombinante presente en el sustrato y la PrP^{res}. Se divide con línea discontinua las diluciones y sustratos no digeridos procedentes de diferentes membranas. Revelado con el anticuerpo D18 (1:5000). Únicamente el compuesto L2.JM56 mostró unos niveles de inhibición similares a los del control TMPyP-FeIII, mientras que el compuesto L2.JM33 redujo los niveles de propagación 1000 veces.

A continuación se testaron los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 en un ambiente de encéfalo de ratón transgénico que sobre-expresa (8x) la PrP^C ovina (Tg338). En este caso, el objetivo fue testar los compuestos mediante PMCA en presencia de PrP^C de mamífero, lo que aporta un mayor valor al ensayo, ya que la PrP^C presenta todas las modificaciones post-traduccionales que se encuentran ausentes en un sustrato basado en PrP recombinante. Como semilla se utilizó la cepa Dawson de Scrapie adaptada a PMCA en este mismo sustrato. Tras la realización de las diluciones seriadas (1:10¹ - 1:10⁸) y la adición de los compuestos, el vehículo DMSO y el inhibidor TMPyP-FeIII, las muestras se sometieron a una única ronda de PMCA de 24 h. Por último, los productos de PMCA se digirieron con PK y la presencia o ausencia de propagación se comprobó por *Western Blot* utilizando también el anticuerpo anti-PrP D18 (figura 23). De nuevo, el compuesto L2.JM56 fue capaz de mostrar una inhibición del proceso de propagación clara, reduciendo los niveles de propagación 1x10⁴ veces. También se observa una reducción en los niveles de propagación de 100 veces en presencia del compuesto L2.JM85. Por el contrario, el compuesto L2.JM33 no tuvo ningún efecto sobre los niveles de propagación en este modelo murino.

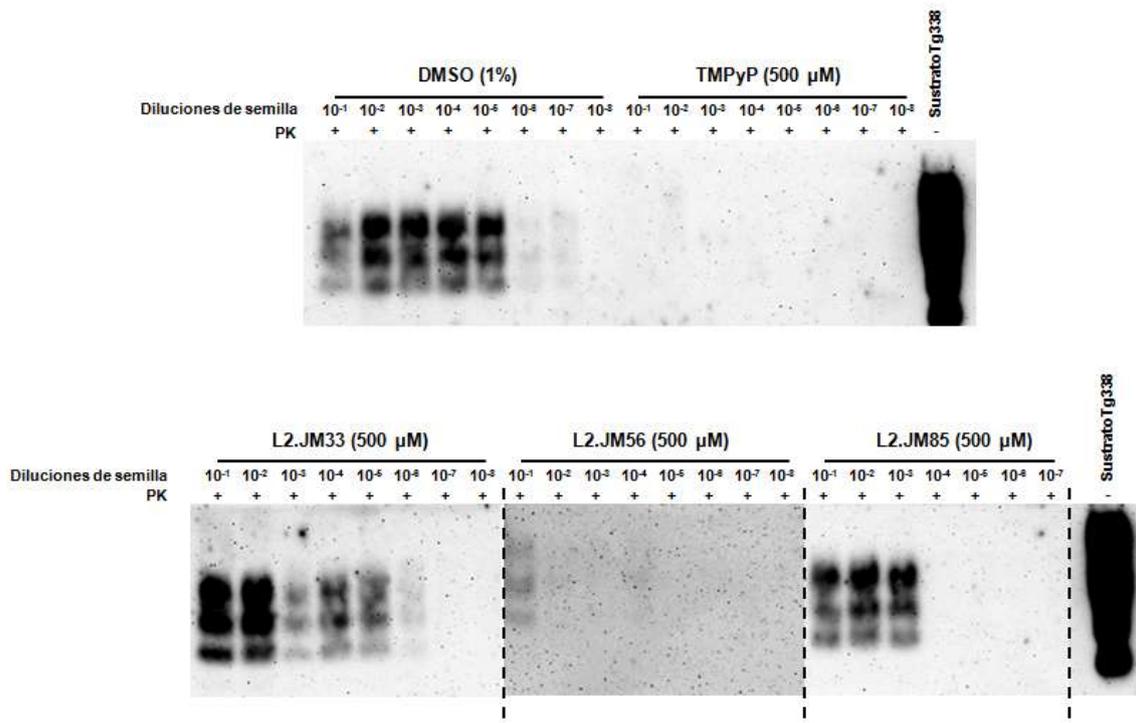


Figura 23. Estudio de la capacidad de inhibición mediante PMCA de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 sobre sustrato con homogeneizado de encéfalo del modelo murino Tg338. Imagen de *Western Blot* donde se muestran los niveles de propagación de la semilla utilizando los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 a una concentración de 500 μM, el vehículo DMSO (1%) y el inhibidor TMPyP-FelII (500 μM). La semilla fue diluida 1:10¹ – 1:10⁸ y sometida a una ronda de PMSA de 24 horas. También se incluye un control de sustrato sin digerir para distinguir la diferencia de tamaño entre la PrP^C presente en el sustrato y la PrP^{Sc}. Se divide con línea discontinua las diluciones y sustratos no digeridos procedentes de diferentes membranas. Revelado con el anticuerpo D18 (1:5000). Únicamente el compuesto L2.JM56 mostró unos niveles de inhibición similares a los del control TMPyP-FelII, mientras que el compuesto L2.JM85 redujo los niveles de propagación 100 veces.

Finalmente los compuestos detectados durante el cribado masivo se testaron en un ambiente de encéfalo de ratón transgénico que sobre-expresa (2x) la PrP^C de topillo rojo con el polimorfismo 109I (TgVole). De nuevo, el objetivo fue testar los compuestos en un ambiente de PrP^C de mamífero. Como semilla se utilizó un aislado procedente de EDC adaptada al topillo rojo con el polimorfismo 109I en sucesivos pases *in vivo*. Tras la realización de las diluciones seriadas (1:10¹ – 1:10⁸) y la adición de los compuestos, el vehículo DMSO y el inhibidor TMPyP-FelII, las muestras se sometieron a una única ronda de PMCA de 48 h. A continuación, los productos de PMCA se digirieron con PK y la presencia o ausencia de propagación se comprobó por *Western Blot* utilizando también el anticuerpo anti-PrP D18 (figura 24). El compuesto L2.JM56 fue de nuevo el inhibidor más potente de todos los testados, reduciendo los niveles de propagación 1x10⁴ veces. Por otro lado, los inhibidores L2.JM33 y L2.JM85 también mostraron cierto nivel de inhibición, reduciendo los niveles de propagación 100 y 10 veces, respectivamente.

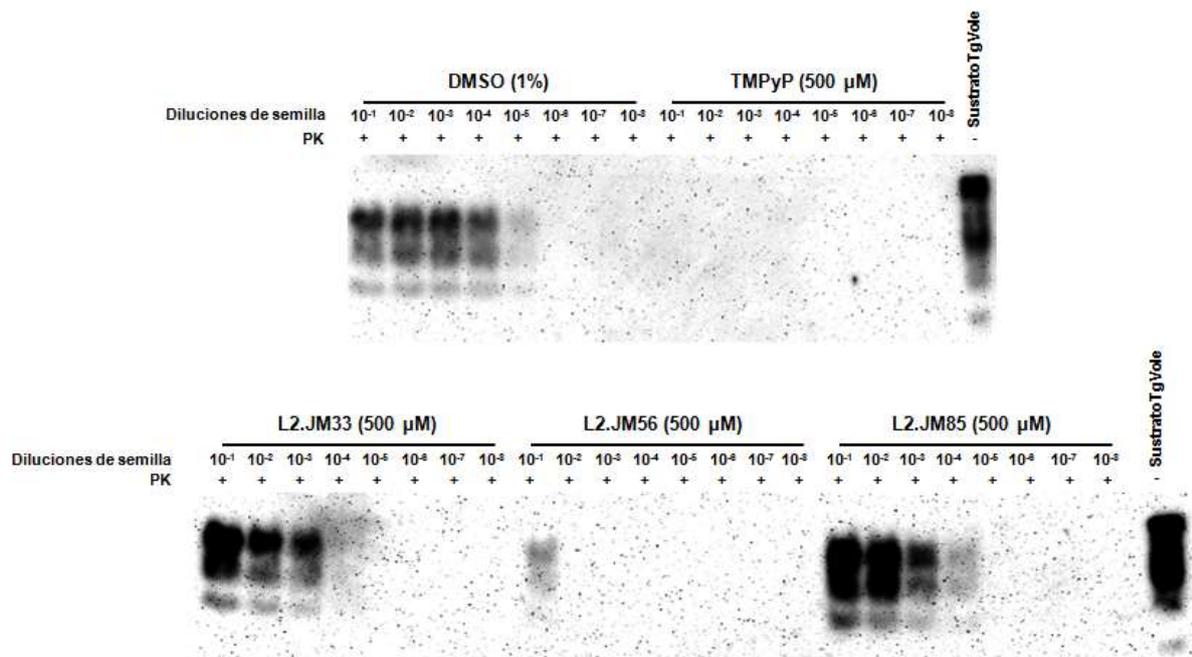


Figura 24. Estudio de la capacidad de inhibición mediante PMCA de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 sobre sustrato con homogeneizado de encéfalo del modelo murino TgVole. Imagen de *Western Blot* donde se muestran los niveles de propagación de la semilla utilizando los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 a una concentración de 500 μM , el vehículo DMSO (1%) y el inhibidor TMPyP-FelII (500 μM). La semilla fue diluida $1:10^1 - 1:10^8$ y sometida a una ronda de PMSA de 24 horas. También se incluye un control de sustrato sin digerir para distinguir la diferencia de tamaño entre la PrP^C presente en el sustrato y la PrP^{Sc}. Se divide con línea discontinua las diluciones y sustratos no digeridos procedentes de diferentes membrana. Revelado con el anticuerpo D18 (1:5000). Únicamente el compuesto L2.JM56 mostró unos niveles de inhibición similares a los del control TMPyP-FelII, mientras que los compuestos L2.JM33 y L2.JM85 redujeron los niveles de propagación 100 y 10 veces, respectivamente.

3.2 - Confirmación de la capacidad inhibidora de la propagación *in cellula*

Con el objetivo de testar la capacidad inhibidora de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 en un modelo más parecido al entorno *in vivo*, se decidió utilizar el modelo celular de neuroblastoma de ratón N2a inoculado con la cepa murina RML, también conocido como ScN2a (de Scrapie). Al respetarse el anclaje a GPI y la interacción entre células, estos modelos se consideran más cercanos a una infección *in vivo* que un modelo de propagación *in vitro*. La determinación de la inhibición del proceso de propagación se realizó midiendo los niveles de PrP^{Sc} en cultivos celulares incubados en presencia de los compuestos, comparando a continuación el resultado con los niveles de propagación del control sin compuesto incubado en presencia de vehículo DMSO.

Antes de testar el efecto de los compuestos sobre la propagación, se comprobó la toxicidad de los compuestos y del vehículo DMSO en el modelo celular ScN2a mediante el ensayo MTT, llamado así por el uso del compuesto MTT [del inglés *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*]. Mediante este ensayo se determinó el porcentaje de muerte celular al añadir diferentes componentes al medio de cultivo. En nuestro caso se utilizaron los tres compuestos identificados en el proceso de cribado, el vehículo DMSO y el inhibidor

TMPyP-FelII como controles. Este primer paso, previo al testado de la capacidad inhibitoria de los compuestos, permitió acotar las concentraciones máximas a utilizar durante el testado de la capacidad de inhibición y distinguir entre la reducción en los niveles de PrP^{Sc} en las células debida a la acción inhibitoria del compuesto o debida a su toxicidad, que se observaría como muerte celular. Las concentraciones testadas fueron de 100, 50, 10, 1, 0,1 y 0,01 μM , para los compuestos y el TMPyP-FelII, mientras que en el caso del DMSO se realizó una simulación de dilución para conseguir una concentración de vehículo idéntica a la presente en los cultivos celulares con cada una de las diferentes concentraciones de compuestos. Todas las pruebas se realizaron por cuadruplicado. Ninguno de los compuestos resultó tóxico a bajas concentraciones, registrándose una reducción estadísticamente significativa de la supervivencia celular únicamente a 100 μM (figura 25). El control TMPyP-FelII no mostró toxicidad alguna, incluso a la concentración más alta. Por esta razón, se fijó en 100 μM la concentración máxima utilizada en el ensayo de inhibición.

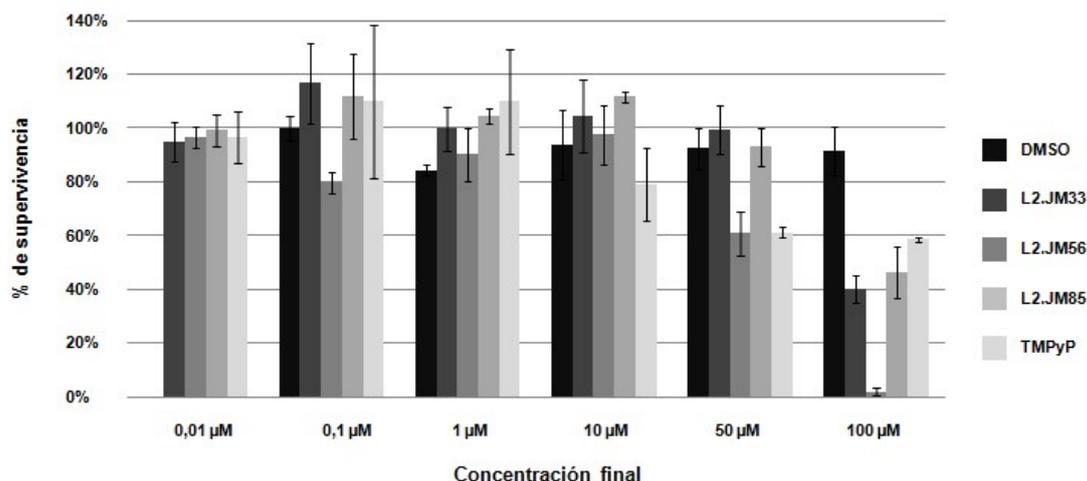


Figura 25. Estudio de toxicidad de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 mediante el ensayo MTT utilizando el modelo celular ScN2a inoculado con RML. Imagen que muestra los porcentajes de supervivencia de los cultivos celulares ScN2a en presencia de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 y del inhibidor TMPyP-FelII a las concentraciones indicadas en la figura tras 4 días de incubación a 37 °C. También se incluye un control del vehículo DMSO en el que se incluyen las mismas concentraciones de DMSO que en las concentraciones de compuesto correspondientes. No existe un control de DMSO que simula la concentración 0,01 μM , ya que la cantidad de DMSO en estos cultivos es despreciable. Los porcentajes se han normalizado teniendo en cuenta un 100 % de supervivencia en la muestra con la menor cantidad de DMSO, mientras que el 0 % de supervivencia estaba representado por un cuadruplicado al que se añadió un 5 % de DMSO como concentración final. Todas las condiciones se testaron por cuadruplicado. Todos los compuestos mostraron ciertos niveles de toxicidad a una concentración de 100 μM , salvo el TMPyP-FelII.

Una vez demostrada la baja toxicidad de los compuestos, se continuó con el testado de la capacidad inhibitoria de la propagación en el modelo ScN2a. Con el objetivo de identificar la IC50, se testaron diferentes concentraciones de estos, del vehículo DMSO y del inhibidor TMPyP-FelII. Las concentraciones utilizadas fueron: 100, 50, 10, 1, 0,1 y 0,01 μM para los compuestos, mientras que en el caso del DMSO de nuevo se realizó una simulación de dilución para conseguir una concentración idéntica a la presente en los cultivos celulares de las diferentes concentraciones de compuestos. Todas las pruebas se realizaron por cuadruplicado, como en el caso del ensayo MTT. El control de vehículo DMSO no alteró significativamente las cantidades de PrP^{Sc}, independientemente de la dilución utilizada.

Desafortunadamente, tampoco se observó reducción en los niveles de PrP^{Sc} para los compuestos L2.JM33 y L2.JM56 (figura 26) a ninguna de las concentraciones utilizadas, salvo en el caso de L2.JM56 a 100 μ M, cuya reducción podría estar relacionada con la toxicidad asociada al compuesto. Sin embargo, el compuesto L2.JM85, a pesar de ser uno de los inhibidores más débiles evaluados por PMCA, mostró una reducción en los niveles de PrP^{Sc} extraordinariamente significativa incluso a concentraciones de 1 μ M, siendo incluso más efectivo que el control TMPyP-FelII. De hecho, teniendo en cuenta estos resultados se calculó que su IC₅₀ es de 1,6 μ M, es decir, hasta 100 veces por debajo de los niveles tóxicos, mientras que la del control TMPyP-FelII fue de 4,2 μ M.

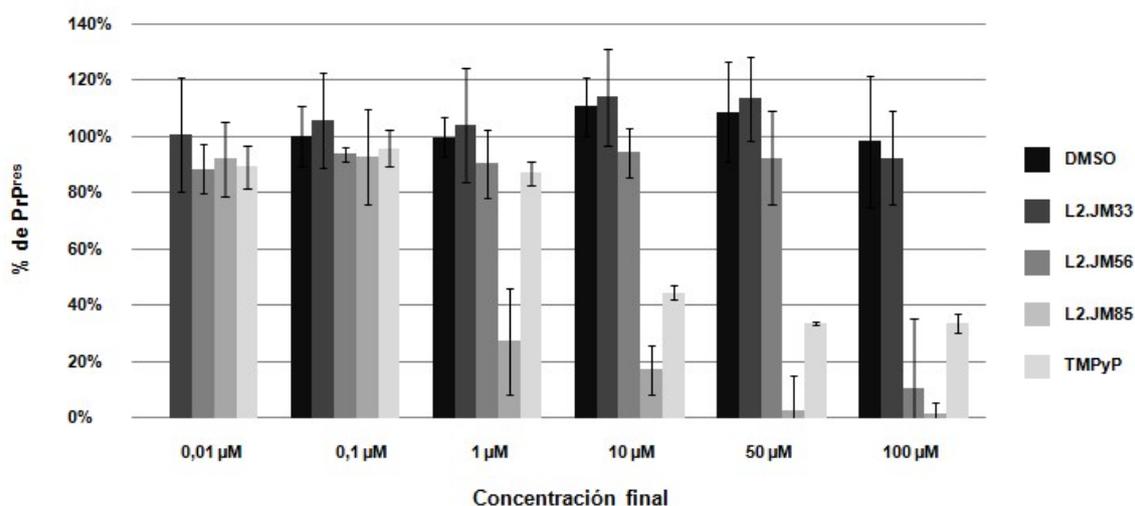


Figura 26. Estudio de la capacidad de inhibición de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 en el modelo celular de propagación ScN2a inoculado con RML. Imagen que muestra los porcentajes de PrP^{res} de los cultivos celulares ScN2a en presencia de los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 y del inhibidor TMPyP-FelII a las concentraciones indicadas en la figura tras 4 días de incubación a 37 °C. También se incluye un control del vehículo DMSO en el que se incluyen las mismas concentraciones de DMSO que en las concentraciones de compuesto correspondientes. No existe un control de DMSO que simula la concentración 0,01 μ M, ya que la cantidad de DMSO en estos cultivos es despreciable. Los porcentajes se han normalizado teniendo en cuenta un 100 % de PrP^{res} en la muestra con la menor cantidad de DMSO, mientras que el 0 % de PrP^{res} estaba representado por un cuadruplicado al que se añadió un 5 % de DMSO como concentración final. Todas las condiciones se testaron por cuadruplicado. Tras la digestión por PK (100 μ g/ml), las cantidades de PrP^{res} se calcularon utilizando la técnica de *Dot Blot*. Revelado con el anticuerpo 6D11 (1:5000). La cantidad de PrP^{res} en las diferentes condiciones se calculó por densitometría mediante el software *JImage* (NIH). Tan solo el compuesto L2.JM85 logró demostrar inhibición efectiva de la propagación en el modelo celular ScN2a inoculado con RML, calculándose una IC₅₀ de 1,6 μ M, siendo esta menor que la calculada para el inhibidor TMPyP-FelII en este modelo celular (4,2 μ M).

DISCUSIÓN

Las EET son un grupo de enfermedades neurodegenerativas incurables que, en todos los casos llevan al fallecimiento del paciente. Por esto, es de vital importancia la implementación de un tratamiento que, aunque no sea plenamente efectivo, permita ralentizar el desarrollo de la enfermedad y paliar sus consecuencias lo máximo posible. Una de las vías de investigación más explotadas en este sentido es la identificación de compuestos con capacidad inhibitoria de la propagación de los priones mediante diferentes sistemas *in vitro* e *in cellula* (40, 257). Sin embargo, en muchas ocasiones estos sistemas resultan complejos y presentan dificultades técnicas además de requerir experiencia en su manejo y grandes cantidades de tiempo y recursos. Teniendo estos datos en cuenta, el primer objetivo de esta tesis doctoral era el desarrollo de un sistema de propagación *in vitro* sencillo, barato y reproducible en cualquier laboratorio con un equipo mínimo, imitando la propagación del prion de la forma más fiel posible a la que ocurre en el SNC y que por tanto se pudiera utilizar para el cribado masivo de compuestos con posible actividad inhibitoria de la propagación de priones.

Debido a la experiencia previa del laboratorio en el uso de la PMCA, se decidió utilizar esta técnica como punto de partida. Ya que ha demostrado ser la única técnica de propagación *in vitro* capaz de reproducir fielmente varias de las características definitorias de la PrP^{Sc} y mantenerlas durante sucesivos pases (71, 318). Sin embargo, la necesidad de un sistema complejo de sonicación y el elevado coste del equipo necesario impiden su implementación como un sistema de cribado masivo de compuestos que se pueda utilizar en cualquier laboratorio. Por ello, se decidió modificar las condiciones para hacerla más sencilla y asequible, manteniendo su capacidad de propagar priones *bona fide* (con características biológicas similares a los priones presentes en el encéfalo de individuos afectados). El cambio principal respecto a la PMCA es el uso de un sistema de agitación en lugar de un sistema de sonicación como fuente de energía, utilizada comúnmente para la generación de fibras amiloides en el campo de estudio de las EET. Un ejemplo del uso de la agitación como fuente de energía para la detección de priones *in vitro* a través de su capacidad de promover la formación de fibras amiloides, es el sistema RT-QuIC (302), un sistema de propagación *in vitro* rápido y sencillo que permite analizar un elevado número de muestras en poca cantidad de tiempo, aunque las fibras generadas a partir de cantidades ínfimas de priones utilizados como semilla no son infectivas *in vivo* en ningún caso. Teniendo en cuenta la capacidad de mimetizar la propagación de priones *bona fide* del sistema PMCA y la rapidez y sencillez de la agitación como fuente de energía, se generó un nuevo sistema de propagación *in vitro* que se denominó amplificación de proteínas malplegadas mediante agitación (PMSA, del inglés *Protein Misfolding Shaking Amplification*).

Otro requisito imprescindible para el desarrollo de un sistema de cribado masivo de compuestos es el uso de una fuente de sustrato convertible a PrP^{res} prácticamente ilimitada y de bajo coste. En el caso de la PMCA, el sustrato utilizado habitualmente consiste en homogenado de encéfalo de la especie deseada (71), lo que dificulta mucho su empleo de forma masiva. Sin embargo, también es común el uso de sustratos conformados por PrP recombinante procedente de *E. coli* (319, 324) complementado con sales, detergentes, y diferentes cofactores. Estos priones, generados *in vitro* de forma artificial y utilizando PrP recombinante, poseen infectividad variable aunque algunas han demostrado claramente su capacidad de causar enfermedad en varias especies (72, 74, 75, 319, 325, 326). Debido a que la PrP recombinante reúne los requisitos necesarios para la generación de sustrato en gran cantidad de forma estable y permite la propagación de priones *bona fide* en condiciones adecuadas, se trata de una fuente de sustrato convertible a PrP^{res} ideal para un sistema de cribado masivo. En cuanto a la especie, se eligió la PrP recombinante de topillo rojo con el polimorfismo 109I. El topillo rojo ha cobrado importancia en los últimos años en el campo de las EET, ya que porta el polimorfismo natural 109I, isoleucina en la posición 109, que lo hace altamente susceptible a la propagación de priones procedentes de otras especies. Por ejemplo, la inoculación de topillos rojos que portan este polimorfismo con aislados de EDC y la realización de pases sucesivos en estos animales genera una cepa con un tiempo de incubación de tan solo 35 días, la más rápida conocida (327). También ha demostrado su susceptibilidad *in vivo* ante diferentes cepas humanas (328) y su capacidad de propagación ante un gran número de cepas humanas y animales en RT-QuIC, siendo calificada de sustrato universal (329).

Varios cofactores se han utilizado para la generación de priones infecciosos *in vitro* mediante PMCA, aunque también se ha descrito la generación de priones recombinantes *bona fide* en ausencia de cofactores. Sin embargo, estos poseen una capacidad infecciosa *in vivo* menor comparada con los generados en presencia de cofactores (74). Por ello, se decidió utilizar dextrano sulfatado como cofactor de la PrP recombinante de topillo rojo 109I a la hora de generar el sustrato para la PMSA, ya que previamente se habían generado en nuestro laboratorio priones recombinantes con alta infectividad mediante el sistema PMCA en presencia de dextrano sulfatado (319). En concreto, en este experimento se generaron priones recombinantes de topillo rojo utilizando sales y detergentes, además de los siguientes cofactores: ARN, ADN plasmídico y dextrano sulfatado. También se generaron priones infecciosos en ausencia de cofactor, pero estos presentaban niveles de infectividad más bajos que los generados en presencia de cofactores. Entre todos los priones recombinantes de topillo rojo generados por PMCA, el obtenido en presencia de dextrano fue uno de los más infecciosos. Al ser inoculado intracerebralmente en modelos murinos que expresan la PrP^C del topillo rojo con el polimorfismo 109I presentaron una tasa de ataque del 100% y un periodo

de incubación de 239 ± 46 d.p.i., observándose los signos típicos de una infección por priones. Esta semilla procedente de PMCA es la misma que adaptamos al nuevo sistema de propagación *in vitro* PMSA con el objetivo de mantener la propagación de priones *bona fide* en el nuevo sistema. Para ello, se realizaron 15 pases seriados de PMSA en dilución 1:10 con el objetivo de eliminar la semilla original de PMCA, obteniéndose así una nueva semilla adaptada al nuevo sistema de propagación. Al ser inoculada en modelos murinos que expresan la PrP^C del topillo rojo con el polimorfismo 109I se obtuvo una tasa de ataque del 100% y un periodo de incubación de 240 ± 14 d.p.i., lo que confirma que ambas semillas, tanto la procedente de PMCA como la adaptada y mantenida en PMSA, son altamente infecciosas e indistinguibles, de acuerdo también a los resultados histopatológicos. Este resultado implica la consecución de uno de los principales objetivos de esta tesis doctoral, que es el desarrollo de un nuevo sistema de malplegamiento *in vitro* capaz de mantener la propagación de priones recombinantes altamente infectivos *in vivo*.

Con todo esto, lo que se pretendía durante esta tesis doctoral era el desarrollo y la optimización de un nuevo sistema de propagación de priones *in vitro* aplicable al cribado masivo de compuestos químicos con posible actividad inhibidora de la propagación priónica. Varias técnicas biofísicas y sistemas de propagación se han utilizado con este fin en las últimas décadas. Algunos ejemplos de técnicas biofísicas serían la resonancia por plasmones superficiales (SPR, del inglés *Surface Plasmon Resonance*), que permite detectar compuestos capaces de unirse a la PrP recombinante, o el uso de fluoróforos que, al unirse a la PrP recombinante, sufren un cambio en la polarización de la luz emitida. Ambos sistemas se han utilizado con éxito para el cribado de compuestos con actividad inhibidora de la propagación (330, 331). Sin embargo, estos sistemas no son capaces de detectar una disminución en la propagación de priones de forma directa, ya que solo pueden detectar interacciones entre los compuestos y la PrP recombinante. Por el contrario, los sistemas de cribado basados en la propagación de priones sí son capaces de detectar disminuciones en los niveles de propagación de forma directa, por lo que están más cercanos a una situación de infección *in vivo*. Además, también serían capaces de identificar compuestos que interaccionen con la PrP malplegada, lo que no sería posible con los sistemas mencionados anteriormente. Entre ellos tenemos el sistema semi-automático libre de células (del inglés *semi-automated cell-free system*) y el RT-QuIC. Ambos sistemas han demostrado su eficiencia a la hora de identificar inhibidores de la propagación (312, 332), aunque la principal crítica hacia estos métodos de propagación es que los priones generados no son infectivos en ningún caso.

Una vez contamos con una semilla infecciosa *in vivo* adaptada a la PMSA, el siguiente paso consistió en la optimización de la capacidad propagativa de la misma en el nuevo

sistema. Debido a la variabilidad intrínseca al proceso de propagación, una baja eficiencia de malplegamiento no nos permitiría diferenciar entre compuestos con escasa actividad inhibidora de los no inhibidores, por lo que un proceso de optimización de la propagación fue necesario antes de comenzar con el cribado de compuestos. Para ello se fueron modificando las siguientes condiciones: velocidad y tiempo de agitación, tipo de partículas esféricas, temperatura y concentración de proteína; seleccionándose finalmente las condiciones de propagación más eficientes en cada caso. La primera condición que se modificó fue la velocidad y tiempo de agitación, observándose cómo un aumento en la velocidad o en el tiempo de agitación se traduce en un incremento en la eficiencia de propagación. Esta mejora podría deberse a la mayor energía que las muestras reciben según se aumenta la velocidad y tiempo de agitación. Durante el proceso de malplegamiento se producen una serie de cambios en la estructura secundaria de la proteína que implican un salto de barrera energética entre ambas estructuras (333). Por tanto, al aumentar la energía que aportamos a nuestra proteína, el cambio hacia una estructura malplegada se ve favorecido. Sin embargo, esta relación no parece ser directamente proporcional en todos los casos, ya que a velocidades muy altas la eficiencia de propagación empieza a decrecer. Por ejemplo, en PMSA se ha comprobado que a una velocidad de 1000 rpm la eficiencia de propagación es superior que a 1200 rpm. Este fenómeno podría deberse a una mayor dificultad de la PrP recombinante para interactuar con la PrP malplegada presente en la muestra, ya que un exceso de agitación podría entorpecer esta interacción, reduciendo ligeramente la eficiencia de propagación bajo esas condiciones.

La siguiente condición evaluada fue el tipo y tamaño de partículas esféricas utilizadas. Estas se utilizan en PMCA con el objetivo de aumentar la reproducibilidad de los resultados y mejorar la eficiencia de propagación (334-336). Sin embargo, a pesar de que se han demostrado estos efectos sobre la propagación de forma empírica, todavía se desconoce cómo la presencia de partículas esféricas en la PMCA puede aumentar la reproducibilidad y eficiencia de propagación. Se ha propuesto que las partículas podrían aumentar el fraccionamiento de las fibras amiloides, creándose más núcleos de propagación y aumentando la eficiencia del proceso (334). Sin embargo, esto no explicaría las diferencias que se han observado durante el proceso de optimización al utilizar diferentes tipos y tamaños de partículas esféricas. En el caso de la PMSA, se determinó que las partículas esféricas más eficientes a la hora de promover la propagación de la semilla fueron las de vidrio con un diámetro de 0,2-0,3 mm. Estas fueron las partículas testadas más pequeñas, por lo que se podría relacionar el aumento en la superficie con el aumento en la eficiencia. Al estar compuestas estas partículas por vidrio, su superficie está recubierta de cargas negativas, que inevitablemente interactúan con la PrP recombinante y con la semilla. Varios autores apuntan a una relación directa entre los polianiones y la eficiencia de propagación (337),

actuando estos como un andamiaje molecular que favorecería el malplegamiento de la PrP. Este fenómeno de interacción y cambio de estructura ha sido demostrado utilizando como polianión el ARN (338), un cofactor que se utiliza en PMCA y que, en conjunción con sales, detergentes, lípidos y PrP recombinante de ratón genera un prion *bona fide* con características muy similares a las descritas en los priones procedentes de encéfalo. De una forma parecida actuaría el dextrano sulfatado que hemos utilizado como cofactor, un polianión de gran tamaño que actuaría como andamio, favoreciendo el cambio de estructura de la PrP recombinante presente en el sustrato y aumentando la eficiencia de propagación.

La temperatura fue la siguiente condición en la que nos centramos con el objetivo de mejorar el proceso de propagación. En este caso, un aumento de temperatura también se podría relacionar con un aumento en la energía suministrada a las muestras y, por tanto, una disminución en la barrera de energía necesaria para malplegar la proteína. Sin embargo, no se observaron diferencias importantes en el rango de temperaturas testadas (37-42 °C), por lo que se determinó que la temperatura no influye de forma crítica en la PMSA, a diferencia de la PMCA, donde mantener una temperatura adecuada y de forma constante es muy importante para mantener los niveles de propagación estables (339).

Por último, testamos diferentes concentraciones de proteína con el objetivo de utilizar la menor cantidad posible, manteniendo los niveles de propagación en condiciones óptimas. Tan solo las concentraciones más altas, 2 y 4 μM , fueron capaces de mantener la eficiencia de propagación a niveles óptimos. Sin embargo, el sustrato preparado con 4 μM de PrP recombinante fue ligeramente mejor aún sin mostrar diferencias significativas. Esta concentración de proteína es común a otros métodos de propagación *in vitro*, como la PMCA (340) o el RT-QuIC (302).

Una vez mejorada la eficiencia de propagación de la PMSA, lo que permitía disponer de una ventana adecuada para evaluar el efecto de los compuestos con posible actividad antiprionica, se trabajó sobre el sistema de detección, otra de las limitaciones importantes para su utilización como sistema de cribado masivo de compuestos. Debido a que la detección de PrP^{res} en PMCA se realizaba habitualmente mediante la técnica de *Western Blot*, la evaluación del efecto sobre la propagación de miles de compuestos sería inviable dado el coste y tiempo necesarios para la visualización de los resultados del cribado. Por ello, se decidió utilizar la espectrometría valiéndonos de la ThT, un fluoróforo capaz de unirse de forma específica a las fibras amiloides y cuya interacción con las mismas se traduce en un aumento en la intensidad de luz emitida (303). La adaptación a este sistema de detección fue posible gracias a la composición del sustrato utilizado, ya que la turbidez de los sustratos basados en homogenado de encéfalo que se usan habitualmente en PMCA dificulta la

medición de la luz emitida y la presencia de todo tipo de componentes celulares podría alterar la interacción entre la ThT y las fibras amiloides. Varias técnicas de propagación utilizan la ThT como método de detección de fibras amiloides, entre ellas el RT-QuIC (302). Sin embargo, a diferencia de nuestro sistema, durante el ensayo RT-QuIC la ThT se encuentra presente durante todo el proceso de propagación. Experimentos realizados con insulina han demostrado que la ThT puede afectar al proceso de fibrilización (321), aunque no existen datos sobre si esta interacción puede afectar a la propagación de los priones. En cualquier caso, se decidió no utilizar la ThT como parte del sustrato para evitar interacciones indeseadas entre esta y las fibras amiloides que podrían alterar la infectividad de la cepa obtenida y también posibles interferencias con los compuestos que se pretendían testar.

Debido a la variabilidad propia al sistema de medición, se estableció una norma para diferenciar los controles no inoculados de las diluciones seriadas. Para ello se realizaron varias comparaciones de resultados de *Western Blot* y de medición con ThT. En un principio se determinó como muestras positivas las que tuvieran una Δ RFU superior a la desviación estándar de la media de RFU de los ocho controles no inoculados multiplicada por tres. Sin embargo, al comparar los resultados por *Western Blot* descubrimos que muchas de las muestras negativas utilizando esta regla resultaban positivas en *Western Blot*, indicando una menor sensibilidad de la medición por ThT. Por esto, finalmente se determinó que todas las muestras con una Δ RFU mayor que el 10 % de la media de RFU de los controles no inoculados eran positivas, obteniéndose así una sensibilidad de detección muy cercana a la obtenida por digestión con PK y posterior detección de PrP^{res} por *Western Blot*.

Cabe mencionar un fenómeno que hemos observado consistentemente a lo largo del proceso de cribado, la aparición espontánea de PrP^{res} en los controles no inoculados. Ya se había descrito la aparición de priones espontáneos asociados a diferentes EET en PMCA utilizando sustratos conformados por PrP recombinante (324, 341, 342). En concreto, utilizando sustrato basado en la PrP recombinante de topillo rojo 109I y dextrano sulfatado como cofactor también se ha descrito la aparición de PrP^{res} de forma espontánea, aunque en ningún caso en tan solo 24 horas de propagación (319). De hecho, en el experimento realizado por Fernández-Borges y colaboradores solo se consiguió el malplegamiento espontáneo de la PrP recombinante de topillo rojo 109I en presencia de dextrano sulfatado tras 28 rondas seriadas de PMCA de 24 horas de duración. Esta diferencia podría explicarse como una mayor eficiencia en la generación de núcleos iniciales de propagación de forma espontánea en la PMSA. En este caso, la sonicación se ha intercambiado por la agitación, por lo que, aunque la semilla que estamos propagando no vea afectada su estructura ni características definitorias al cambiar de sistema de propagación *in vitro*, sí podría explicarse la existencia de cambios en la velocidad de aparición de los núcleos espontáneos iniciales.

Tras la adaptación de la PMSA a un sistema de cribado de compuestos con posible actividad anti-priónica, se procedió a la selección de una biblioteca adecuada para ser utilizada como prueba de concepto. Se decidió utilizar la biblioteca Maybridge Ro3, formada por 2500 compuestos de pequeño tamaño con alta diversidad estructural, lo que permitió el cribado de un gran número de farmacóforos diferentes. Con el objetivo de asegurar la interacción con la PrP de todos los compuestos con cierta afinidad por la proteína, se aumentó lo más posible el ratio molecular PrP:compuesto, de forma que incluso los compuestos con menor afinidad pudieran unirse a la PrP y ejercer su función inhibidora de la propagación. Tan sólo tres compuestos de la biblioteca, el 0,12 %, se consideraron inhibidores de la propagación tras el cribado de la biblioteca. Este porcentaje puede parecer bajo, sin embargo no es extraña la identificación de un reducido número de compuestos efectivos tras la realización de un cribado masivo de compuestos, independientemente de la técnica biofísica o del método de propagación utilizado (331, 343). Además, la alta variedad de farmacóforos presentes en la biblioteca no permite la repetición de estos en varios de las moléculas testadas, lo que reduce la posibilidad de identificar varios compuestos con farmacóforos idénticos o similares.

Una vez identificados los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 mediante el sistema de cribado masivo por PMSA, estos se testaron en PMCA para confirmar su capacidad inhibidora de la propagación. En este caso, en lugar de utilizar un sustrato basado en PrP recombinante complementada con sales, detergentes y dextrano sulfatado se utilizó PrP recombinante complementada con homogeneizado de encéfalo de pollo (*Gallus gallus domesticus*). Diferentes experimentos previos realizados en nuestro laboratorio habían demostrado la eficiencia de este tipo de sustrato a la hora de promover la propagación de la semilla. Las PrP recombinantes utilizadas fueron la humana con el polimorfismo 129M, la de oveja ARQ y la de topillo rojo con el polimorfismo 109I. Además del cambio de sustrato mencionado, también se aumentó la concentración de compuesto en el ensayo debido a la mayor complejidad en composición del sustrato utilizado.

Los resultados demuestran que el compuesto L2.JM56 es el más eficiente a la hora de inhibir la propagación, ya que es capaz de reducirlo al menos 1×10^8 veces respecto al control de vehículo DMSO en todos los sustratos recombinantes testados por PMCA. Este resultado es similar al obtenido con TMPyP-FeIII, un inhibidor clásico de la propagación priónica (288). Por el contrario, los otros dos inhibidores detectados en el cribado han mostrado niveles de inhibición dispares en las diferentes especies testadas, sin llegar en ningún caso al nivel del compuesto L2.JM56. El compuesto L2.JM33 muestra unos niveles de inhibición muy bajos en los sustratos de topillo rojo y de oveja, mientras que en el caso de la PrP recombinante humana se ha demostrado una reducción de 1000 veces en los niveles de propagación. Esta

diferencia en los resultados obtenidos podría deberse a una mayor afinidad del compuesto por la PrP recombinante humana, dato muy positivo de cara a un futuro uso de este farmacóforo como parte de un tratamiento para las EET humanas. En cuanto al compuesto L2.JM85, los resultados demuestran que únicamente es capaz de reducir los niveles de propagación en el sustrato compuesto por PrP recombinante de oveja ARQ, pudiéndose observar una reducción en los niveles de propagación de 1000 veces. Por el contrario, en los otros dos sustratos testados no se pudo observar inhibición. En este caso la disparidad en los resultados se podría explicar de nuevo por una mayor afinidad de este compuesto por la PrP de oveja, comparada con la de las otras especies testadas.

Un dato sorprendente de los resultados obtenidos tras testar los tres compuestos por PMCA utilizando PrP recombinante fue la escasa o ausente inhibición de los compuestos L2.JM33 y L2.JM85 en el sustrato conformado por PrP recombinante de topillo rojo 109I. Debido a que fuimos capaces de determinar la inhibición de estos compuestos por PMSA utilizando un sustrato conformado por esta proteína, se esperaría que estos compuestos también redujeran los niveles de propagación de forma semejante en PMCA. Sin embargo, ambos sustratos presentan una composición totalmente diferente, ya que en el caso del sustrato complementado con homogeneizado de encéfalo de pollo la cantidad de ácidos nucleicos, lípidos y proteínas es totalmente diferente a la del sustrato utilizado para el cribado, donde el dextrano sulfatado es el único cofactor presente. Este hecho podría reducir en gran medida la acción inhibidora de los compuestos, que sólo han sido capaces de demostrar su capacidad de inhibición cuando son testados en presencia de otras PrP recombinantes por las que muestran mayor afinidad. Además, la presencia de la PrP^C de pollo podría perjudicar el proceso de inhibición al unirse a las moléculas de compuesto, impidiendo así su unión a la PrP recombinante. Por este motivo se testaron los compuestos en un sustrato conformado por PrP recombinante de estas mismas especies complementado con homogeneizado de encéfalo de ratón *PRNP*^{-/-}. No obstante, los resultados fueron los mismos, observándose escasa o nula inhibición en los niveles propagación, lo que descarta la influencia de la PrP^C de pollo en el resultado.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en PMCA utilizando sustratos basados en PrP recombinante se decidió testar los compuestos presencia de PrP^C de mamífero, lo que aporta un mayor valor al ensayo, ya que esta PrP presenta todas las modificaciones post-traduccionales que se encuentran ausentes en un sustrato basado en PrP recombinante y pueden propagar priones obtenidos de encéfalos de animales, en lugar de priones sintéticos generados *in vitro*. Para ello, utilizamos un homogenado de encéfalo de dos tipos diferentes de modelos murinos transgénicos como sustrato. Los modelos murinos utilizados fueron el modelo Tg338, que sobre-expresa (8x respecto al nivel de expresión de PrP endógena de un

ratón) la PrP^C de oveja con el polimorfismo VRQ y el modelo TgVole, que sobre-expresa (2x respecto al nivel de expresión de PrP endógena de un ratón) la PrP^C de topillo rojo con el polimorfismo 109I. En ambos casos, y al igual que en las PMCA realizadas con PrP recombinante, el compuesto L2.JM56 fue el más eficiente, reduciendo los niveles de propagación a niveles casi indetectables por *Western Blot*. Con estos resultados podemos afirmar que este compuesto es el inhibidor de la propagación de priones más eficiente de todos los detectados en el cribado masivo de la biblioteca Ro3, al ser altamente efectivo en todas las especies testadas por PMCA. Por otro lado, el compuesto L2.JM33 no mostró inhibición en el modelo Tg338, dato que concuerda con la escasa inhibición mostrada en la PMCA realizada en presencia de PrP recombinante de oveja. Sin embargo, sí mostró cierto nivel de inhibición en el modelo TgVole, reduciendo los niveles de propagación 100 veces, confirmando a este compuesto como inhibidor de la propagación. Por último, el compuesto L2.JM85 mostró unos niveles de inhibición similares en el modelo Tg338 a los observados en la PMCA con PrP recombinante de oveja, confirmando la mayor afinidad de este compuesto por la PrP^C de oveja, al igual que había ocurrido con la PrP recombinante. De nuevo, la inhibición de este compuesto en el modelo TgVole es muy escasa, como había ocurrido con la PMCA basada en sustrato recombinante de topillo rojo.

Teniendo en cuenta los datos de propagación obtenidos mediante PMCA en presencia de los compuestos detectados durante el cribado masivo de la biblioteca Ro3, se puede confirmar que estos son inhibidores de la propagación de los priones tanto en modelos basados en PrP recombinante como en modelos basados en PrP^C procedente de encéfalo. Por tanto, podemos concluir que la PMSA es un método de cribado masivo de compuestos efectivo, ya que es capaz de detectar compuestos con verdadera actividad inhibidora de la propagación priónica demostrada en otros modelos de propagación *in vitro*. Tal es así, que tanto los inhibidores más débiles como los más potentes, a juzgar por los resultados de PMCA, han podido ser identificados por el sistema desarrollado en esta tesis doctoral, indicando gran especificidad y sensibilidad.

Con el objetivo de completar los resultados obtenidos en los métodos de propagación *in vitro* utilizados, decidimos testar los compuestos L2.JM33, L2.JM56 y L2.JM85 en el modelo celular de neuroblastoma de ratón N2a inoculado con la cepa murina RML, también conocido como ScN2a (344). Al respetarse el anclaje a GPI y la interacción entre células los modelos celulares se consideran más cercanos a una infección *in vivo* que los modelos *in vitro*. En primer lugar se midió la toxicidad de los compuestos a testar y del control TMPyP-FeIII mediante el ensayo MTT, no detectándose niveles de toxicidad significativos a concentraciones medias y bajas. Además, los resultados de toxicidad del TMPyP-FeIII son similares a los registrados en otros experimentos utilizando el mismo modelo celular inoculado

con la cepa murina 22L (288). Los niveles de supervivencia registrados en las muestras con vehículo se mantienen estables en todas las concentraciones testadas, rondando un 100% de supervivencia en todos los casos. Este resultado indica que los cambios que observemos en los niveles de PrP^{res} de las muestras son reales y no debidos a la variabilidad en la supervivencia de las células. Seguidamente, las células inoculadas se incubaron en presencia de los tres compuestos detectados en el cribado y el TMPyP-FelII a las mismas concentraciones utilizadas en el ensayo de supervivencia. Los compuestos L2.JM33 y L2.JM56 no mostraron ninguna reducción en los niveles de propagación de la semilla RML en este modelo celular. Solo el compuesto L2.JM56 mostró cierta inhibición de la propagación a 100 μ M, pero los resultados de toxicidad indican que esta reducción podría estar relacionada con la muerte celular causada por la toxicidad del compuesto. Este resultado es especialmente llamativo, ya que este compuesto fue el que mostró mayor capacidad inhibidora en PMCA. Esta diferencia podría deberse a las diferencias existentes entre ambos modelos, donde las interacciones entre las células y la presencia de anclaje a GPI podrían modificar el proceso de propagación. Sin embargo, el resultado más sorprendente e inesperado corresponde a los niveles de PrP^{res} registrados en los cultivos celulares incubados en presencia del compuesto L2.JM85, ya que a diferencia de los resultados observados en PMCA, logró reducir la propagación de forma altamente significativa a concentraciones incluso menores que el control TPMyP-FelII. De hecho, la IC50 del compuesto L2.JM85 registrada en este modelo fue de 1,6 μ M, muy por debajo de los niveles tóxicos, mientras que la del TMPyP-FelII fue de 4,2 μ M. Este resultado podría indicar un mecanismo de acción del compuesto diferente a la inhibición de la propagación por unión directa a la PrP. Un posible mecanismo alternativo podría ser la alteración de la localización celular de la PrP, impidiendo su malplegamiento. Un fenómeno similar se ha registrado con el inhibidor clorpromazina, donde no se pudo observar inhibición mediante modelos de propagación *in vitro*, pero sí una disminución drástica de la propagación en el modelo celular N2a inoculado con RML y 22L (282).

Por tanto, a lo largo de esta tesis doctoral, se ha desarrollado y optimizado un novedoso sistema de propagación de priones infecciosos *in vitro* aplicable al testado masivo de compuestos anti-priónicos, tal y como demuestra el cribado realizado con una librería de 2500 compuestos. Aunque ofrece claras ventajas respecto a otros sistemas de cribado *in vitro*, cuenta con ciertas limitaciones tal y como queda reflejado por la disparidad de los resultados obtenidos utilizando un sistema *in cellula*. No obstante, dichas limitaciones se observan en cualquier sistema de cribado masivo *in vitro* y evidencian la necesidad de métodos complementarios para validar la efectividad de los compuestos detectados. En este sentido, cabe destacar que se seguirá trabajando tanto en la mejora del sistema de cribado, como en los compuestos detectados en el primer cribado con la intención de descifrar sus mecanismos

de actuación y testar su eficacia en modelos animales. Si a diferencia de muchos otros compuestos que mostraron capacidad de inhibición de la propagación *in vitro* pero fueron ineficaces en animales, éstos mostraran cierto efecto sobre el desarrollo de la enfermedad priónica, estaríamos frente a una de las primeras opciones terapéuticas reales para hacer frente a estas devastadoras enfermedades. Y en caso de que no demuestren efectividad *in vivo*, se habrá establecido una metodología válida para seguir la búsqueda de opciones terapéuticas mediante el cribado de librerías de compuestos distintas y de mayor tamaño.

CONCLUSIONES

1. Se ha ideado un nuevo sistema de propagación *in vitro* de priones infecciosos basado en la PMCA aplicable al cribado masivo de compuestos.
2. Se ha obtenido un prion recombinante altamente infeccioso con capacidad de propagar en el nuevo sistema manteniendo sus propiedades bioquímicas y biológicas.
3. Se ha optimizado la eficiencia de propagación de este prion para su uso en el cribado masivo de compuestos.
4. Se ha adaptado un método de detección de priones que permite la visualización de los niveles de propagación de forma automatizable.
5. Se ha testado una biblioteca de 2500 compuestos con alta diversidad química que ha permitido además demostrar la utilidad del sistema desarrollado.
6. Se han detectado 3 compuestos inhibidores de la propagación de priones infecciosos *in vitro*.
7. Se ha confirmado la actividad anti-priónica de los 3 compuestos utilizando sistemas alternativos de propagación *in vitro*. Los compuestos L2.JM33 y L2.JM85 mostraron especificidad en la inhibición, mientras que el compuesto L2.JM56 presentó un espectro de acción más amplio.
8. Se ha observado que únicamente el compuesto L2.JM85 inhibía la propagación de priones en un modelo celular.
9. El sistema de propagación *in vitro* desarrollado ha demostrado ser una herramienta de gran utilidad para la detección de compuestos anti-priónicos potencialmente convertibles en una terapia. Además, se ha establecido una metodología válida que permitirá el cribado de librerías de mayor tamaño.

REFERENCIAS

1. **Will RG, Ironside JW.** 2017. Sporadic and Infectious Human Prion Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med* **7**.
2. **Windl O, Dawson M.** 2012. Animal prion diseases. *Subcell Biochem* **65**:497-516.
3. **Haley NJ, Hoover EA.** 2015. Chronic wasting disease of cervids: current knowledge and future perspectives. *Annu Rev Anim Biosci* **3**:305-325.
4. **Soto C.** 2011. Prion hypothesis: the end of the controversy? *Trends Biochem Sci* **36**:151-158.
5. **Igel-Egalon A, Beringue V, Rezaei H, Sibille P.** 2018. Prion Strains and Transmission Barrier Phenomena. *Pathogens* **7**.
6. **Liberski PP.** 2012. Historical overview of prion diseases: a view from afar. *Folia Neuropathol* **50**:1-12.
7. **Brown P.** 2009. Reflections on a half-century in the field of transmissible spongiform encephalopathy. *Folia Neuropathol* **47**:95-103.
8. **Cuille J, Chelle P.** 1936. La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *CR Acad Sci* **203**:1552-1554.
9. **Creutzfeldt H.** 1920. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Gesamte Neurol Psychiatr* **57**:1-19.
10. **Jakob A.** 1921. Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde. (Spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Z Gesamte Neurol Psychiatr* **64**:147-228.
11. **Liberski PP, Sikorska B, Brown P.** 2012. Kuru: the first prion disease. *Adv Exp Med Biol* **724**:143-153.
12. **Gajdusek DC.** 1967. Slow-virus infections of the nervous system. *N Engl J Med* **276**:392-400.
13. **Hadlow WJ.** 2008. Kuru likened to scrapie: the story remembered. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363**:3644.
14. **Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr., Alpers M.** 1967. Transmission and passage of experimental "kuru" to chimpanzees. *Science* **155**:212-214.
15. **Klatzo I, Gajdusek DC, Zigas V.** 1959. Pathology of Kuru. *Lab Invest* **8**:799-847.
16. **Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM, Matthews WB.** 1968. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* **161**:388-389.
17. **Boellaard JW, Schlote W.** 1980. [Subacute spongiform encephalopathy with multiform plaque formation. "Peculiar familial-hereditary disease of CNS [spinocerebellar atrophy with dementia, plaques, and plaque-like deposits in cerebellum and cerebrum" (Gerstmann, Straussler, Scheinker)] (author's transl)]. *Acta Neuropathol* **49**:205-212.
18. **Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, Westaway D, Ott J, Prusiner SB.** 1989. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature* **338**:342-345.
19. **Lugaresi E, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A, Tinuper P, Zucconi M, Gambetti P.** 1986. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* **315**:997-1003.
20. **Medori R, Tritschler HJ, LeBlanc A, Villare F, Manetto V, Chen HY, Xue R, Leal S, Montagna P, Cortelli P, et al.** 1992. Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med* **326**:444-449.

21. **Masters CL, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr.** 1981. Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Straussler syndrome with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain* **104**:559-588.
22. **Barlow RM.** 1972. Transmissible mink encephalopathy: pathogenesis and nature of the aetiological agent. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* **6**:102-109.
23. **Williams ES, Young S.** 1980. Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis* **16**:89-98.
24. **Aldhous P.** 1990. BSE: spongiform encephalopathy found in cat. *Nature* **345**:194.
25. **Kirkwood JK, Cunningham AA, Austin AR, Wells GA, Sainsbury AW.** 1994. Spongiform encephalopathy in a greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*) introduced into an affected group. *Vet Rec* **134**:167-168.
26. **Gajdusek C, Gibbs C, Alpers M.** 1966. Experimental transmission of kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* **209**:794-796.
27. **Gajdusek DC.** 1972. Spongiform virus encephalopathies. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* **6**:78-83.
28. **Gajdusek DC.** 1973. Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease. Experimental models of noninflammatory degenerative slow virus disease of the central nervous system. *Ann Clin Res* **5**:254-261.
29. **Zlotnik I, Grant DP.** 1975. The occurrence of vacuolated neurons in the brains of hamsters affected with subacute sclerosing encephalitis following measles or Langkat virus infection. *Br J Exp Pathol* **56**:72-76.
30. **Pattison IH, Millson GC.** 1961. Further experimental observations on scrapie. *J Comp Pathol* **71**:350-359.
31. **Chandler RL.** 1961. Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* **1**:1378-1379.
32. **Chandler RL, Fisher J.** 1963. Experimental Transmission of Scrapie to Rats. *Lancet* **2**:1165.
33. **Morris JA, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr.** 1965. Spread of scrapie from inoculated to uninoculated mice. *Proc Soc Exp Biol Med* **120**:108-110.
34. **Latarjet R, Muel B, Haig DA, Clarke MC, Alper T.** 1970. Inactivation of the scrapie agent by near monochromatic ultraviolet light. *Nature* **227**:1341-1343.
35. **Alper T.** 1972. The nature of the scrapie agent. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* **6**:154-155.
36. **Griffith JS.** 1967. Self-replication and scrapie. *Nature* **215**:1043-1044.
37. **Prusiner SB.** 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**:136-144.
38. **Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB.** 1982. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**:1309-1311.
39. **Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Iqbal K.** 1981. Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol* **54**:63-74.
40. **Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, Glenner GG.** 1983. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* **35**:349-358.
41. **Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, et al.** 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**:735-746.
42. **Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C.** 1986. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**:417-428.
43. **Borchelt DR, Scott M, Taraboulos A, Stahl N, Prusiner SB.** 1990. Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol* **110**:743-752.

44. **Caughey B, Raymond GJ.** 1991. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem* **266**:18217-18223.
45. **Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, Prusiner SB.** 1993. Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* **32**:1991-2002.
46. **Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, et al.** 1993. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:10962-10966.
47. **Pergami P, Jaffe H, Safar J.** 1996. Semipreparative chromatographic method to purify the normal cellular isoform of the prion protein in nondenatured form. *Anal Biochem* **236**:63-73.
48. **Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB.** 1986. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:2310-2314.
49. **Cohen FE, Prusiner SB.** 1998. Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biochem* **67**:793-819.
50. **Fraser H, Bruce M.** 1973. Argyrophilic plaques in mice inoculated with scrapie from particular sources. *Lancet* **1**:617-618.
51. **Zou WQ, Puoti G, Xiao X, Yuan J, Qing L, Cali I, Shimoji M, Langeveld JP, Castellani R, Notari S, Crain B, Schmidt RE, Geschwind M, Dearmond SJ, Cairns NJ, Dickson D, Honig L, Torres JM, Mastrianni J, Capellari S, Giaccone G, Belay ED, Schonberger LB, Cohen M, Perry G, Kong Q, Parchi P, Tagliavini F, Gambetti P.** 2010. Variably protease-sensitive prionopathy: a new sporadic disease of the prion protein. *Ann Neurol* **68**:162-172.
52. **Brown K, Mastrianni JA.** 2010. The prion diseases. *J Geriatr Psychiatry Neurol* **23**:277-298.
53. **Fraser H, Bruce ME, Chree A, McConnell I, Wells GA.** 1992. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice. *J Gen Virol* **73 (Pt 8)**:1891-1897.
54. **Kitamoto T, Tateishi J, Sawa H, Doh-Ura K.** 1989. Positive transmission of Creutzfeldt-Jakob disease verified by murine kuru plaques. *Lab Invest* **60**:507-512.
55. **Kimberlin RH, Walker CA.** 1978. Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture. *J Gen Virol* **39**:487-496.
56. **Kimberlin RH, Walker CA.** 1986. Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly. *J Gen Virol* **67 (Pt 2)**:255-263.
57. **Palmiter RD, Chen HY, Brinster RL.** 1982. Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell* **29**:701-710.
58. **Scott M, Foster D, Mirenda C, Serban D, Coufal F, Walchli M, Torchia M, Groth D, Carlson G, DeArmond SJ, Westaway D, Prusiner SB.** 1989. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* **59**:847-857.
59. **Hsiao KK, Scott M, Foster D, Groth DF, DeArmond SJ, Prusiner SB.** 1990. Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science* **250**:1587-1590.
60. **Nazor KE, Kuhn F, Seward T, Green M, Zwald D, Purro M, Schmid J, Biffiger K, Power AM, Oesch B, Raeber AJ, Telling GC.** 2005. Immunodetection of disease-associated mutant PrP, which accelerates disease in GSS transgenic mice. *EMBO J* **24**:2472-2480.
61. **Torres JM, Castilla J, Pintado B, Gutierrez-Adan A, Andreoletti O, Aguilar-Calvo P, Arroba AI, Parra-Arrondo B, Ferrer I, Manzanares J, Espinosa JC.** 2013. Spontaneous generation of infectious prion disease in transgenic mice. *Emerg Infect Dis* **19**:1938-1947.
62. **Jackson WS, Borkowski AW, Watson NE, King OD, Faas H, Jasanoff A, Lindquist S.** 2013. Profoundly different prion diseases in knock-in mice carrying single PrP codon substitutions associated with human diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:14759-14764.

63. **Watts JC, Giles K, Stohr J, Oehler A, Bhardwaj S, Grillo SK, Patel S, DeArmond SJ, Prusiner SB.** 2012. Spontaneous generation of rapidly transmissible prions in transgenic mice expressing wild-type bank vole prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:3498-3503.
64. **Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C.** 1993. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**:1339-1347.
65. **Bueler H, Raeber A, Sailer A, Fischer M, Aguzzi A, Weissmann C.** 1994. High prion and PrP^{Sc} levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol Med* **1**:19-30.
66. **Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, Brandner S, Aguzzi A, Weissmann C.** 1996. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* **15**:1255-1264.
67. **Manuelidis L, Sklaviadis T, Akowitz A, Fritch W.** 1995. Viral particles are required for infection in neurodegenerative Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:5124-5128.
68. **Kocisko DA, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, Caughey B.** 1994. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* **370**:471-474.
69. **Saborio GP, Permanne B, Soto C.** 2001. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* **411**:810-813.
70. **Castilla J, Saa P, Soto C.** 2005. Detection of prions in blood. *Nat Med* **11**:982-985.
71. **Castilla J, Morales R, Saa P, Barria M, Gambetti P, Soto C.** 2008. Cell-free propagation of prion strains. *EMBO J* **27**:2557-2566.
72. **Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB.** 2004. Synthetic mammalian prions. *Science* **305**:673-676.
73. **Makarava N, Kovacs GG, Bocharova O, Savtchenko R, Alexeeva I, Budka H, Rohwer RG, Baskakov IV.** 2010. Recombinant prion protein induces a new transmissible prion disease in wild-type animals. *Acta Neuropathol* **119**:177-187.
74. **Kim JI, Cali I, Surewicz K, Kong Q, Raymond GJ, Atarashi R, Race B, Qing L, Gambetti P, Caughey B, Surewicz WK.** 2010. Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors. *J Biol Chem* **285**:14083-14087.
75. **Wang F, Wang X, Yuan CG, Ma J.** 2010. Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* **327**:1132-1135.
76. **Magnusson K, Simon R, Sjölander D, Sigurdson C, Hammarström P, Nilsson K.** 2014. Multimodal fluorescence microscopy of prion strain specific PrP deposits stained by thiophene-based amyloid ligands. *Prion* **8**:319-329.
77. **Caughey B, Raymond GJ, Bessen RA.** 1998. Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J Biol Chem* **273**:32230-32235.
78. **Mo H, Moore RC, Cohen FE, Westaway D, Prusiner SB, Wright PE, Dyson HJ.** 2001. Two different neurodegenerative diseases caused by proteins with similar structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:2352-2357.
79. **Noble GP, Wang DW, Walsh DJ, Barone JR, Miller MB, Nishina KA, Li S, Supattapone S.** 2015. A Structural and Functional Comparison Between Infectious and Non-Infectious Autocatalytic Recombinant PrP Conformers. *PLoS Pathog* **11**:e1005017.
80. **Wickner RB, Shewmaker FP, Bateman DA, Edskes HK, Gorkovskiy A, Dayani Y, Bezsonov EE.** 2015. Yeast prions: structure, biology, and prion-handling systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**:1-17.
81. **Si K, Lindquist S, Kandel ER.** 2003. A neuronal isoform of the aplysia CPEB has prion-like properties. *Cell* **115**:879-891.
82. **Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX, Chen ZJ.** 2011. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* **146**:448-461.

83. **Chakrabortee S, Kayatekin C, Newby GA, Mendillo ML, Lancaster A, Lindquist S.** 2016. Luminidependens (LD) is an Arabidopsis protein with prion behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**:6065-6070.
84. **Yuan AH, Hochschild A.** 2017. A bacterial global regulator forms a prion. *Science* **355**:198-201.
85. **Gelpi E, Kovacs GG, Strobel T, Koperek O, Voigtlander T, Liberski PP, Budka H.** 2005. Prion disease with a 144 base pair insertion: unusual cerebellar prion protein immunoreactivity. *Acta Neuropathol* **110**:513-519.
86. **Goldfarb LG, Brown P, McCombie WR, Goldgaber D, Swergold GD, Wills PR, Cervenakova L, Baron H, Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC.** 1991. Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:10926-10930.
87. **Jansen C, Voet W, Head MW, Parchi P, Yull H, Verrips A, Wesseling P, Meulstee J, Baas F, van Gool WA, Ironside JW, Rozemuller AJ.** A novel seven-octapeptide repeat insertion in the prion protein gene (PRNP) in a Dutch pedigree with Gerstmann-Straussler-Scheinker disease phenotype: comparison with similar cases from the literature. *Acta Neuropathol* **121**:59-68.
88. **Skworc KH, Windl O, Schulz-Schaeffer WJ, Giese A, Bergk J, Nagele A, Vieregge P, Zerr I, Poser S, Kretzschmar HA.** 1999. Familial Creutzfeldt-Jakob disease with a novel 120-bp insertion in the prion protein gene. *Ann Neurol* **46**:693-700.
89. **Brown P, Brandel JP, Sato T, Nakamura Y, MacKenzie J, Will RG, Ladogana A, Pocchiari M, Leschek EW, Schonberger LB.** 2012. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, final assessment. *Emerg Infect Dis* **18**:901-907.
90. **Bonda DJ, Manjila S, Mehndiratta P, Khan F, Miller BR, Onwuzulike K, Puoti G, Cohen ML, Schonberger LB, Cali I.** 2016. Human prion diseases: surgical lessons learned from iatrogenic prion transmission. *Neurosurg Focus* **41**:E10.
91. **Ironside JW.** 2012. Variant Creutzfeldt-Jakob disease: an update. *Folia Neuropathol* **50**:50-56.
92. **Cassard H, Torres JM, Lacroux C, Douet JY, Benestad SL, Lantier F, Lugan S, Lantier I, Costes P, Aron N, Reine F, Herzog L, Espinosa JC, Beringue V, Andreoletti O.** 2014. Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. *Nat Commun* **5**:5821.
93. **Comoy EE, Mikol J, Luccantoni-Freire S, Correia E, Lescoutra-Etcheagaray N, Durand V, Dehen C, Andreoletti O, Casalone C, Richt JA, Greenlee JJ, Baron T, Benestad SL, Brown P, Deslys JP.** 2015. Transmission of scrapie prions to primate after an extended silent incubation period. *Sci Rep* **5**:11573.
94. **Brown P, Cathala F, Raubertas RF, Gajdusek DC, Castaigne P.** 1987. The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15-year investigation in France and review of the world literature. *Neurology* **37**:895-904.
95. **van Duijn CM, Delasnerie-Laupretre N, Masullo C, Zerr I, de Silva R, Wientjens DP, Brandel JP, Weber T, Bonavita V, Zeidler M, Alperovitch A, Poser S, Granieri E, Hofman A, Will RG.** 1998. Case-control study of risk factors of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe during 1993-95. European Union (EU) Collaborative Study Group of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). *Lancet* **351**:1081-1085.
96. **Prusiner SB.** 1998. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13363-13383.
97. **Aguzzi A, Calella AM.** 2009. Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev* **89**:1105-1152.
98. **Belay ED.** 1999. Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annu Rev Microbiol* **53**:283-314.
99. **Brown P.** 1993. Infectious cerebral amyloidosis: clinical spectrum, risks and remedies. *Dev Biol Stand* **80**:91-101.
100. **Hope J, Ritchie L, Farquhar C, Somerville R, Hunter N.** 1989. Bovine spongiform encephalopathy: a scrapie-like disease of British cattle. *Prog Clin Biol Res* **317**:659-667.

101. **Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, Doey LJ, Lantos P.** 1997. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**:448-450, 526.
102. **Mok T, Jaunmuktane Z, Joiner S, Campbell T, Morgan C, Wakerley B, Golestani F, Rudge P, Mead S, Jäger HR, Wadsworth JD, Brandner S, Collinge J.** 2017. Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in a Patient with Heterozygosity at PRNP Codon 129. *New England Journal of Medicine* **376**:292-294.
103. **Mead S, Poulter M, Uphill J, Beck J, Whitfield J, Webb TE, Campbell T, Adamson G, Deriziotis P, Tabrizi SJ, Hummerich H, Verzilli C, Alpers MP, Whittaker JC, Collinge J.** 2009. Genetic risk factors for variant Creutzfeldt-Jakob disease: a genome-wide association study. *Lancet Neurol* **8**:57-66.
104. **Diack AB, Head MW, McCutcheon S, Boyle A, Knight R, Ironside JW, Manson JC, Will RG.** 2014. Variant CJD. *Prion* **8**:286-295.
105. **Gill ON, Spencer Y, Richard-Loendt A, Kelly C, Dabaghian R, Boyes L, Linehan J, Simmons M, Webb P, Bellerby P, Andrews N, Hilton DA, Ironside JW, Beck J, Poulter M, Mead S, Brandner S.** 2013. Prevalent abnormal prion protein in human appendixes after bovine spongiform encephalopathy epizootic: large scale survey. *BMJ* **347**:f5675.
106. **Hoinville L, McLean AR, Hoek A, Gravenor MB, Wilesmith J.** 1999. Scrapie occurrence in Great Britain. *Vet Rec* **145**:405-406.
107. **Schreuder BE.** 1993. General aspects of transmissible spongiform encephalopathies and hypotheses about the agents. *Vet Q* **15**:167-174.
108. **Caramelli M, Ru G, Casalone C, Bozzetta E, Acutis PL, Calella A, Forloni G.** 2001. Evidence for the transmission of scrapie to sheep and goats from a vaccine against *Mycoplasma agalactiae*. *Vet Rec* **148**:531-536.
109. **Mathiason CK.** 2017. Scrapie, CWD, and Transmissible Mink Encephalopathy. *Prog Mol Biol Transl Sci* **150**:267-292.
110. **Williams ES, Young S.** 1992. Spongiform encephalopathies in Cervidae. *Rev Sci Tech* **11**:551-567.
111. **Kim TY, Shon HJ, Joo YS, Mun UK, Kang KS, Lee YS.** 2005. Additional cases of Chronic Wasting Disease in imported deer in Korea. *J Vet Med Sci* **67**:753-759.
112. **Benestad SL, Mitchell G, Simmons M, Ytrehus B, Vikoren T.** 2016. First case of chronic wasting disease in Europe in a Norwegian free-ranging reindeer. *Vet Res* **47**:88.
113. **Haley NJ, Mathiason CK, Zabel MD, Telling GC, Hoover EA.** 2009. Detection of sub-clinical CWD infection in conventional test-negative deer long after oral exposure to urine and feces from CWD+ deer. *PLoS One* **4**:e7990.
114. **Tamguney G, Miller MW, Wolfe LL, Sirochman TM, Glidden DV, Palmer C, Lemus A, DeArmond SJ, Prusiner SB.** 2009. Asymptomatic deer excrete infectious prions in faeces. *Nature* **461**:529-532.
115. **Gilch S, Chitoor N, Taguchi Y, Stuart M, Jewell JE, Schatzl HM.** 2011. Chronic wasting disease. *Top Curr Chem* **305**:51-77.
116. **Johnson CJ, Phillips KE, Schramm PT, McKenzie D, Aiken JM, Pedersen JA.** 2006. Prions adhere to soil minerals and remain infectious. *PLoS Pathog* **2**:e32.
117. **Nichols TA, Pulford B, Wyckoff AC, Meyerett C, Michel B, Gertig K, Hoover EA, Jewell JE, Telling GC, Zabel MD.** 2009. Detection of protease-resistant cervid prion protein in water from a CWD-endemic area. *Prion* **3**:171-183.
118. **Race B, Meade-White KD, Miller MW, Barbian KD, Rubenstein R, LaFauci G, Cervenakova L, Favara C, Gardner D, Long D, Parnell M, Striebel J, Priola SA, Ward A, Williams ES, Race R, Chesebro B.** 2009. Susceptibilities of nonhuman primates to chronic wasting disease. *Emerg Infect Dis* **15**:1366-1376.
119. **Sandberg MK, Al-Doujaily H, Sigurdson CJ, Glatzel M, O'Malley C, Powell C, Asante EA, Linehan JM, Brandner S, Wadsworth JD, Collinge J.** 2010. Chronic wasting disease prions are not transmissible to transgenic mice overexpressing human prion protein. *J Gen Virol* **91**:2651-2657.

120. **Marsh RF, Kincaid AE, Bessen RA, Bartz JC.** 2005. Interspecies transmission of chronic wasting disease prions to squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J Virol* **79**:13794-13796.
121. **Race B, Williams K, Orru CD, Hughson AG, Lubke L, Chesebro B.** 2018. Lack of Transmission of Chronic Wasting Disease to *Cynomolgus* Macaques. *J Virol* doi:10.1128/JVI.00550-18.
122. **Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, Cohen FE.** 1998. Prion protein biology. *Cell* **93**:337-348.
123. **Gabriel JM, Oesch B, Kretzschmar H, Scott M, Prusiner SB.** 1992. Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:9097-9101.
124. **Rivera-Milla E, Stuermer CA, Malaga-Trillo E.** 2003. An evolutionary basis for scrapie disease: identification of a fish prion mRNA. *Trends Genet* **19**:72-75.
125. **Strumbo B, Ronchi S, Bolis LC, Simonic T.** 2001. Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Lett* **508**:170-174.
126. **Simonic T, Duga S, Strumbo B, Asselta R, Cecilian F, Ronchi S.** 2000. cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS Lett* **469**:33-38.
127. **Malaga-Trillo E, Salta E, Figueras A, Panagiotidis C, Sklaviadis T.** 2011. Fish models in prion biology: underwater issues. *Biochim Biophys Acta* **1812**:402-414.
128. **Westergard L, Christensen HM, Harris DA.** 2007. The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**:629-644.
129. **Zahn R.** 2003. The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site. *J Mol Biol* **334**:477-488.
130. **Vital A, Laplanche JL, Bastard JR, Xiao X, Zou WQ, Vital C.** 2011. A case of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with a novel six octapeptide repeat insertion. *Neuropathol Appl Neurobiol* **37**:554-559.
131. **Walter ED, Chattopadhyay M, Millhauser GL.** 2006. The affinity of copper binding to the prion protein octarepeat domain: evidence for negative cooperativity. *Biochemistry* **45**:13083-13092.
132. **Lloyd S, Mead S, Collinge J.** 2011. Genetics of prion disease. *Top Curr Chem* **305**:1-22.
133. **Calzolari L, Lysek DA, Perez DR, Guntert P, Wuthrich K.** 2005. Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:651-655.
134. **Lysek DA, Schorn C, Nivon LG, Esteve-Moya V, Christen B, Calzolari L, von Schroetter C, Fiorito F, Herrmann T, Guntert P, Wuthrich K.** 2005. Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:640-645.
135. **Katorcha E, Makarava N, Savtchenko R, D'Azzo A, Baskakov IV.** 2014. Sialylation of prion protein controls the rate of prion amplification, the cross-species barrier, the ratio of PrP^{Sc} glycoform and prion infectivity. *PLoS Pathog* **10**:e1004366.
136. **Katorcha E, Daus ML, Gonzalez-Montalban N, Makarava N, Lasch P, Beekes M, Baskakov IV.** 2016. Reversible off and on switching of prion infectivity via removing and reinstalling prion sialylation. *Sci Rep* **6**:33119.
137. **Srivastava S, Katorcha E, Daus ML, Lasch P, Beekes M, Baskakov IV.** 2017. Sialylation Controls Prion Fate in Vivo. *J Biol Chem* **292**:2359-2368.
138. **Puig B, Altmeyen H, Glatzel M.** 2014. The GPI-anchoring of PrP. *Prion* **8**:11-18.
139. **Marshall KE, Hughson A, Vascellari S, Priola SA, Sakudo A, Onodera T, Baron GS.** 2017. PrP Knockout Cells Expressing Transmembrane PrP Resist Prion Infection. *J Virol* **91**.
140. **Chesebro B, Race B, Meade-White K, Lacasse R, Race R, Klingeborn M, Striebel J, Dorward D, McGovern G, Jeffrey M.** 2010. Fatal transmissible amyloid encephalopathy: a new type of prion disease associated with lack of prion protein membrane anchoring. *PLoS Pathog* **6**:e1000800.
141. **Richt JA, Kasinathan P, Hamir AN, Castilla J, Sathiyaseelan T, Vargas F, Sathiyaseelan J, Wu H, Matsushita H, Koster J, Kato S, Ishida I, Soto C, Robl JM, Kuroiwa Y.** 2007. Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol* **25**:132-138.

142. **Brandner S, Raeber A, Sailer A, Blattler T, Fischer M, Weissmann C, Aguzzi A.** 1996. Normal host prion protein (PrPC) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:13148-13151.
143. **Sarell CJ, Quarterman E, Yip DC, Terry C, Nicoll AJ, Wadsworth JDF, Farrow MA, Walsh DM, Collinge J.** 2017. Soluble Abeta aggregates can inhibit prion propagation. *Open Biol* **7**.
144. **Younan ND, Chen KF, Rose RS, Crowther DC, Viles JH.** 2018. Prion protein stabilizes amyloid-beta (Abeta) oligomers and enhances Abeta neurotoxicity in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **293**:13090-13099.
145. **Nieznanska H, Bandyszewska M, Surewicz K, Zajkowski T, Surewicz WK, Nieznanski K.** 2018. Identification of prion protein-derived peptides of potential use in Alzheimer's disease therapy. *Biochim Biophys Acta* **1864**:2143-2153.
146. **Ferreira DG, Temido-Ferreira M, Vicente Miranda H, Batalha VL, Coelho JE, Szego EM, Marques-Morgado I, Vaz SH, Rhee JS, Schmitz M, Zerr I, Lopes LV, Outeiro TF.** 2017. alpha-synuclein interacts with PrP(C) to induce cognitive impairment through mGluR5 and NMDAR2B. *Nat Neurosci* **20**:1569-1579.
147. **Nicolas O, Gavin R, del Rio JA.** 2009. New insights into cellular prion protein (PrPc) functions: the "ying and yang" of a relevant protein. *Brain Res Rev* **61**:170-184.
148. **Doepfner TR, Kaltwasser B, Schlechter J, Jaschke J, Kilic E, Bahr M, Hermann DM, Weise J.** 2015. Cellular prion protein promotes post-ischemic neuronal survival, angiogenesis and enhances neural progenitor cell homing via proteasome inhibition. *Cell Death Dis* **6**:e2024.
149. **Salvesen O, Reiten MR, Kamstra JH, Bakkebo MK, Espenes A, Tranulis MA, Ersdal C.** 2017. Goats without Prion Protein Display Enhanced Proinflammatory Pulmonary Signaling and Extracellular Matrix Remodeling upon Systemic Lipopolysaccharide Challenge. *Front Immunol* **8**:1722.
150. **Ashok A, Karmakar S, Chandel R, Ravikumar R, Dalal S, Kong Q, Singh N.** 2018. Prion protein modulates iron transport in the anterior segment: Implications for ocular iron homeostasis and prion transmission. *Exp Eye Res* **175**:1-13.
151. **Ashok A, Singh N.** 2018. Prion protein modulates glucose homeostasis by altering intracellular iron. *Sci Rep* **8**:6556.
152. **Parrie LE, Crowell JAE, Telling GC, Bessen RA.** 2018. The cellular prion protein promotes olfactory sensory neuron survival and axon targeting during adult neurogenesis. *Dev Biol* **438**:23-32.
153. **Biasini E, Harris DA.** 2012. Targeting the cellular prion protein to treat neurodegeneration. *Future Med Chem* **4**:1655-1658.
154. **Martin-Lannere S, Halliez S, Hirsch TZ, Hernandez-Rapp J, Passet B, Tomkiewicz C, Villa-Diaz A, Torres JM, Launay JM, Beringue V, Vilotte JL, Mouillet-Richard S.** 2017. The Cellular Prion Protein Controls Notch Signaling in Neural Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells* **35**:754-765.
155. **Bremer J, Baumann F, Tiberi C, Wessig C, Fischer H, Schwarz P, Steele AD, Toyka KV, Nave KA, Weis J, Aguzzi A.** 2010. Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat Neurosci* **13**:310-318.
156. **Kuffer A, Lakkaraju AK, Mogha A, Petersen SC, Airich K, Doucerain C, Marpakwar R, Bakirci P, Senatore A, Monnard A, Schiavi C, Nuvolone M, Grosshans B, Hornemann S, Bassilana F, Monk KR, Aguzzi A.** 2016. The prion protein is an agonistic ligand of the G protein-coupled receptor Adgrg6. *Nature* **536**:464-468.
157. **Requena JR, Wille H.** 2014. The structure of the infectious prion protein. *Prion* **8**:60-66.
158. **Groveman BR, Dolan MA, Taubner LM, Kraus A, Wickner RB, Caughey B.** 2014. Parallel in-register intermolecular beta-sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids. *J Biol Chem* **289**:24129-24142.
159. **Bartz JC.** 2016. Prion Strain Diversity. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**.

160. **Gabizon R, McKinley MP, Prusiner SB.** 1987. Purified prion proteins and scrapie infectivity copartition into liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:4017-4021.
161. **Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, Caughey B.** 2005. The most infectious prion protein particles. *Nature* **437**:257-261.
162. **Meier P, Genoud N, Prinz M, Maissen M, Rulicke T, Zurbriggen A, Raeber AJ, Aguzzi A.** 2003. Soluble dimeric prion protein binds PrP(Sc) in vivo and antagonizes prion disease. *Cell* **113**:49-60.
163. **Prusiner SB, Scott M, Foster D, Pan KM, Groth D, Mirinda C, Torchia M, Yang SL, Serban D, Carlson GA, et al.** 1990. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* **63**:673-686.
164. **Horiuchi M, Priola SA, Chabry J, Caughey B.** 2000. Interactions between heterologous forms of prion protein: binding, inhibition of conversion, and species barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:5836-5841.
165. **Kocisko DA, Priola SA, Raymond GJ, Chesebro B, Lansbury PT, Jr., Caughey B.** 1995. Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:3923-3927.
166. **Zukas AA, Bruederle CE, Carter JM.** 2008. Sonication induced intermediate in prion protein conversion. *Protein Pept Lett* **15**:206-211.
167. **Masel J, Jansen VA.** 2001. The measured level of prion infectivity varies in a predictable way according to the aggregation state of the infectious agent. *Biochim Biophys Acta* **1535**:164-173.
168. **McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB.** 1983. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* **35**:57-62.
169. **Diaz-Espinoza R, Soto C.** 2012. High-resolution structure of infectious prion protein: the final frontier. *Nat Struct Mol Biol* **19**:370-377.
170. **Diringer H, Beekes M, Ozel M, Simon D, Queck I, Cardone F, Pocchiari M, Ironside JW.** 1997. Highly infectious purified preparations of disease-specific amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleic acids of viral size. *Intervirology* **40**:238-246.
171. **Sevillano AM, Fernandez-Borges N, Younas N, Wang F, S RE, Bravo S, Vazquez-Fernandez E, Rosa I, Erana H, Gil D, Veiga S, Vidal E, Erickson-Beltran ML, Guitian E, Silva CJ, Nonno R, Ma J, Castilla J, J RR.** 2018. Recombinant PrPSc shares structural features with brain-derived PrPSc: Insights from limited proteolysis. *PLoS Pathog* **14**:e1006797.
172. **Peretz D, Williamson RA, Matsunaga Y, Serban H, Pinilla C, Bastidas RB, Rozenshteyn R, James TL, Houghten RA, Cohen FE, Prusiner SB, Burton DR.** 1997. A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform. *J Mol Biol* **273**:614-622.
173. **McKinley MP, Braunfeld MB, Bellinger CG, Prusiner SB.** 1986. Molecular characteristics of prion rods purified from scrapie-infected hamster brains. *J Infect Dis* **154**:110-120.
174. **Sim VL, Caughey B.** 2009. Ultrastructures and strain comparison of under-glycosylated scrapie prion fibrils. *Neurobiol Aging* **30**:2031-2042.
175. **Vazquez-Fernandez E, Vos MR, Afanasyev P, Cebey L, Sevillano AM, Vidal E, Rosa I, Renault L, Ramos A, Peters PJ, Fernandez JJ, van Heel M, Young HS, Requena JR, Wille H.** 2016. The Structural Architecture of an Infectious Mammalian Prion Using Electron Cryomicroscopy. *PLoS Pathog* **12**:e1005835.
176. **Eanes E, Glenner G.** 1968. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J Histochem Cytochem* **16**:673-677.
177. **Govaerts C, Wille H, Prusiner SB, Cohen FE.** 2004. Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:8342-8347.

178. **Theint T, Nadaud PS, Aucoin D, Helmus JJ, Pondaven SP, Surewicz K, Surewicz WK, Jaroniec CP.** 2017. Species-dependent structural polymorphism of Y145Stop prion protein amyloid revealed by solid-state NMR spectroscopy. *Nat Commun* **8**:753.
179. **Muller H, Brener O, Andreoletti O, Piechatzek T, Willbold D, Legname G, Heise H.** 2014. Progress towards structural understanding of infectious sheep PrP-amyloid. *Prion* **8**:344-358.
180. **Aucoin D, Xia Y, Theint T, Nadaud PS, Surewicz K, Surewicz WK, Jaroniec CP.** 2018. Protein-solvent interfaces in human Y145Stop prion protein amyloid fibrils probed by paramagnetic solid-state NMR spectroscopy. *J Struct Biol* doi:10.1016/j.jsb.2018.04.002.
181. **Smirnovas V, Baron GS, Offerdahl DK, Raymond GJ, Caughey B, Surewicz WK.** 2011. Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deuterium exchange. *Nat Struct Mol Biol* **18**:504-506.
182. **Downing DT, Lazo ND.** 1999. Molecular modelling indicates that the pathological conformations of prion proteins might be beta-helical. *Biochem J* **343 Pt 2**:453-460.
183. **Choi JH, Govaerts C, May BC, Cohen FE.** 2008. Analysis of the sequence and structural features of the left-handed beta-helical fold. *Proteins* **73**:150-160.
184. **Wille H, Bian W, McDonald M, Kendall A, Colby DW, Bloch L, Ollesch J, Borovinskiy AL, Cohen FE, Prusiner SB, Stubbs G.** 2009. Natural and synthetic prion structure from X-ray fiber diffraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:16990-16995.
185. **Cobb NJ, Sonnichsen FD, McHaourab H, Surewicz WK.** 2007. Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register beta-structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:18946-18951.
186. **Theint T, Nadaud PS, Surewicz K, Surewicz WK, Jaroniec CP.** 2017. (13)C and (15)N chemical shift assignments of mammalian Y145Stop prion protein amyloid fibrils. *Biomol NMR Assign* **11**:75-80.
187. **Nguyen JT, Inouye H, Baldwin MA, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB, Kirschner DA.** 1995. X-ray diffraction of scrapie prion rods and PrP peptides. *J Mol Biol* **252**:412-422.
188. **Serpell LC, Sunde M, Blake CC.** 1997. The molecular basis of amyloidosis. *Cell Mol Life Sci* **53**:871-887.
189. **Wan W, Wille H, Stohr J, Kendall A, Bian W, McDonald M, Tiggelaar S, Watts JC, Prusiner SB, Stubbs G.** 2015. Structural studies of truncated forms of the prion protein PrP. *Biophys J* **108**:1548-1554.
190. **Silva CJ, Vazquez-Fernandez E, Onisko B, Requena JR.** 2015. Proteinase K and the structure of PrP^{Sc}: The good, the bad and the ugly. *Virus Res* **207**:120-126.
191. **Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguett M, Weissmann C.** 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**:577-582.
192. **Mallucci GR, White MD, Farmer M, Dickinson A, Khatun H, Powell AD, Brandner S, Jefferys JG, Collinge J.** 2007. Targeting cellular prion protein reverses early cognitive deficits and neurophysiological dysfunction in prion-infected mice. *Neuron* **53**:325-335.
193. **Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y, Marino S, Weissmann C, Aguzzi A.** 1996. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* **379**:339-343.
194. **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, Oldstone M.** 2005. Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* **308**:1435-1439.
195. **Hsiao K, Scott M, Foster D, DeArmond SJ, Groth D, Serban H, Prusiner SB.** 1991. Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with prion protein codon 101 proline---leucine substitution. *Ann N Y Acad Sci* **640**:166-170.
196. **Owen F, Poulter M, Shah T, Collinge J, Lofthouse R, Baker H, Ridley R, McVey J, Crow TJ.** 1990. An in-frame insertion in the prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res Mol Brain Res* **7**:273-276.

197. **Simoneau S, Rezaei H, Sales N, Kaiser-Schulz G, Lefebvre-Roque M, Vidal C, Fournier JG, Comte J, Wopfner F, Grosclaude J, Schatzl H, Lasmezas CI.** 2007. In vitro and in vivo neurotoxicity of prion protein oligomers. *PLoS Pathog* **3**:e125.
198. **Donaldson DS, Sehgal A, Rios D, Williams IR, Mabbott NA.** 2016. Increased Abundance of M Cells in the Gut Epithelium Dramatically Enhances Oral Prion Disease Susceptibility. *PLoS Pathog* **12**:e1006075.
199. **Marshall A, Bradford BM, Clarke AR, Manson JC, Mabbott NA.** 2018. Oral prion neuroinvasion occurs independently of PrP(C) expression in the gut epithelium. *J Virol* doi:10.1128/JVI.01010-18.
200. **Wathne GJ, Mabbott NA.** 2012. The diverse roles of mononuclear phagocytes in prion disease pathogenesis. *Prion* **6**:124-133.
201. **Felten D, Felten S, Carlson S, Olschowka J, Livnat S.** 1985. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *The Journal of Immunology* **135**:755-765.
202. **Prinz M, Heikenwalder M, Junt T, Schwarz P, Glatzel M, Heppner FL, Fu YX, Lipp M, Aguzzi A.** 2003. Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. *Nature* **425**:957-962.
203. **Fraser H, Dickinson AG.** 1970. Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen. *Nature* **226**:462-463.
204. **Pattison IH, Millson GC.** 1962. Distribution of the scrapie agent in the tissues of experimentally inoculated goats. *J Comp Pathol* **72**:233-244.
205. **Cashman NR, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascsak RJ, Bolton DC, Bendheim PE.** 1990. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* **61**:185-192.
206. **Kitamoto T, Muramoto T, Mohri S, Doh-Ura K, Tateishi J.** 1991. Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol* **65**:6292-6295.
207. **Aguzzi A.** 2001. Peripheral prion pursuit. *J Clin Invest* **108**:661-662.
208. **Kraus A, Groveman BR, Caughey B.** 2013. Prions and the potential transmissibility of protein misfolding diseases. *Annu Rev Microbiol* **67**:543-564.
209. **Heppner FL, Prinz M, Aguzzi A.** 2001. Pathogenesis of prion diseases: possible implications of microglial cells. *Prog Brain Res* **132**:737-750.
210. **Carroll JA, Race B, Williams K, Striebel J, Chesebro B.** 2018. Microglia Are Critical in Host Defense Against Prion Disease. *J Virol* doi:10.1128/JVI.00549-18.
211. **Sisakhtnezhad S, Khosravi L.** 2015. Emerging physiological and pathological implications of tunneling nanotubes formation between cells. *Eur J Cell Biol* **94**:429-443.
212. **Gousset K, Zurzolo C.** 2009. Tunnelling nanotubes: a highway for prion spreading? *Prion* **3**:94-98.
213. **Vilette D, Courte J, Peyrin JM, Coudert L, Schaeffer L, Andreoletti O, Leblanc P.** 2018. Cellular mechanisms responsible for cell-to-cell spreading of prions. *Cell Mol Life Sci* doi:10.1007/s00018-018-2823-y.
214. **Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G.** 2004. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:9683-9688.
215. **Bruce ME, Fraser H.** 1991. Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol* **172**:125-138.
216. **Bruce ME.** 2003. TSE strain variation. *Br Med Bull* **66**:99-108.
217. **Bessen RA, Marsh RF.** 1992. Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *J Gen Virol* **73 (Pt 2)**:329-334.
218. **Bessen RA, Marsh RF.** 1994. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* **68**:7859-7868.
219. **Race RE, Raines A, Baron TG, Miller MW, Jenny A, Williams ES.** 2002. Comparison of abnormal prion protein glycoform patterns from transmissible spongiform encephalopathy agent-infected deer, elk, sheep, and cattle. *J Virol* **76**:12365-12368.

220. **Tagliavini F, Lievens PM, Tranchant C, Warter JM, Mohr M, Giaccone G, Perini F, Rossi G, Salmona M, Piccardo P, Ghetti B, Beavis RC, Bugiani O, Frangione B, 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. *J Biol Chem* **276**:6009-6015.
221. **Gambetti P, Dong Z, Yuan J, Xiao X, Zheng M, Alshekhlee A, Castellani R, Cohen M, Barria MA, Gonzalez-Romero D, Belay ED, Schonberger LB, Marder K, Harris C, Burke JR, Montine T, Wisniewski T, Dickson DW, Soto C, Hulette CM, Mastrianni JA, Kong Q, Zou WQ.** 2008. A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Ann Neurol* **63**:697-708.
222. **Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schonheit J, Tranulis MA, Bratberg B.** 2003. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec* **153**:202-208.
223. **Balkema-Buschmann A, Fast C, Kaatz M, Eiden M, Ziegler U, McIntyre L, Keller M, Hills B, Groschup MH.** 2011. Pathogenesis of classical and atypical BSE in cattle. *Prev Vet Med* **102**:112-117.
224. **Mahal SP, Baker CA, Demczyk CA, Smith EW, Julius C, Weissmann C.** 2007. Prion strain discrimination in cell culture: the cell panel assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:20908-20913.
225. **Fernández-Borges N, Di Bari MA, Erana H, Sanchez-Martin M, Pirisinu L, Parra B, Elezgarai SR, Vanni I, Lopez-Moreno R, Vaccari G, Venegas V, Charco JM, Gil D, Harrathi C, D'Agostino C, Agrimi U, Mayoral T, Requena JR, Nonno R, Castilla J.** 2017. Cofactors influence the biological properties of infectious recombinant prions. *Acta Neuropathol* doi:10.1007/s00401-017-1782-y.
226. **Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF.** 1996. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* **383**:685-690.
227. **Collinge J.** 2001. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* **24**:519-550.
228. **Weissmann C, Aguzzi A.** 1997. Bovine spongiform encephalopathy and early onset variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Curr Opin Neurobiol* **7**:695-700.
229. **Dickinson AG.** 1976. Scrapie in sheep and goats. *Front Biol* **44**:209-241.
230. **Kimberlin RH, Cole S, Walker CA.** 1987. Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters. *J Gen Virol* **68 (Pt 7)**:1875-1881.
231. **Kimberlin RH, Walker CA, Fraser H.** 1989. The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. *J Gen Virol* **70 (Pt 8)**:2017-2025.
232. **Carlson GA, Goodman PA, Lovett M, Taylor BA, Marshall ST, Peterson-Torchia M, Westaway D, Prusiner SB.** 1988. Genetics and polymorphism of the mouse prion gene complex: control of scrapie incubation time. *Mol Cell Biol* **8**:5528-5540.
233. **Collinge J, Palmer MS, Sidle KC, Gowland I, Medori R, Ironside J, Lantos P.** 1995. Transmission of fatal familial insomnia to laboratory animals. *Lancet* **346**:569-570.
234. **David AS, Grant R, Ballantyne JP.** 1984. Unsuccessful treatment of Creutzfeldt-Jakob disease with acyclovir. *Lancet* **1**:512-513.
235. **Terzano MG, Montanari E, Calzetti S, Mancina D, Lechi A.** 1983. The effect of amantadine on arousal and EEG patterns in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* **40**:555-559.
236. **Kovanen J, Tiilikainen A, Haltia M.** 1980. Histocompatibility antigens in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Sci* **45**:317-321.
237. **Furlow TWJ, Whitley RJ, Wilmes FJ.** 1982. Repeated suppression of Creutzfeldt-Jakob disease with vidarabine. *Lancet* **2**:564-565.

238. **Otto M, Cepek L, Ratzka P, Doehlinger S, Boekhoff I, Wiltfang J, Irle E, Pergande G, Ellers-Lenz B, Windl O, Kretzschmar HA, Poser S, Prange H.** 2004. Efficacy of flupirtine on cognitive function in patients with CJD: A double-blind study. *Neurology* **62**:714-718.
239. **Imperiale D, Bortolotto S, Cucatto A, Schiffer P, Cassano D, Buffa C.** 2003. Levetiracetam control of myoclonus in a patient with Creutzfeldt-Jakob disease. *Eur Neurol* **49**:189-190.
240. **Heppner FL, Musahl C, Arrighi I, Klein MA, Rulicke T, Oesch B, Zinkernagel RM, Kalinke U, Aguzzi A.** 2001. Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science* **294**:178-182.
241. **Gilch S, Wopfner F, Renner-Muller I, Kremmer E, Bauer C, Wolf E, Brem G, Groschup MH, Schatzl HM.** 2003. Polyclonal anti-PrP auto-antibodies induced with dimeric PrP interfere efficiently with PrPSc propagation in prion-infected cells. *J Biol Chem* **278**:18524-18531.
242. **Sigurdsson EM, Brown DR, Daniels M, Kascsak RJ, Kascsak R, Carp R, Meeker HC, Frangione B, Wisniewski T.** 2002. Immunization delays the onset of prion disease in mice. *Am J Pathol* **161**:13-17.
243. **White AR, Hawke SH.** 2003. Immunotherapy as a therapeutic treatment for neurodegenerative disorders. *J Neurochem* **87**:801-808.
244. **Xanthopoulos K, Lagoudaki R, Kontana A, Kyratsous C, Panagiotidis C, Grigoriadis N, Yiangou M, Sklaviadis T.** 2013. Immunization with recombinant prion protein leads to partial protection in a murine model of TSEs through a novel mechanism. *PLoS One* **8**:e59143.
245. **Taschuk R, Scruten E, Woodbury M, Cashman N, Potter A, Griebel P, Tikoo SK, Napper S.** 2017. Induction of PrP(Sc)-specific systemic and mucosal immune responses in white-tailed deer with an oral vaccine for chronic wasting disease. *Prion* **11**:368-380.
246. **Pankiewicz JE, Sanchez S, Kirshenbaum K, Kascsak RB, Kascsak RJ, Sadowski MJ.** 2018. Anti-prion Protein Antibody 6D11 Restores Cellular Proteostasis of Prion Protein Through Disrupting Recycling Propagation of PrP(Sc) and Targeting PrP(Sc) for Lysosomal Degradation. *Mol Neurobiol* doi:10.1007/s12035-018-1208-4.
247. **Reimann RR, Aguzzi A.** 2018. Intrinsic Toxicity of Antibodies to the Globular Domain of the Prion Protein. *Biol Psychiatry* **84**:e51-e52.
248. **Kaneko K, Wille H, Mehlhorn I, Zhang H, Ball H, Cohen FE, Baldwin MA, Prusiner SB.** 1997. Molecular properties of complexes formed between the prion protein and synthetic peptides. *J Mol Biol* **270**:574-586.
249. **Perrier V, Kaneko K, Safar J, Vergara J, Tremblay P, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB, Wallace AC.** 2002. Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:13079-13084.
250. **Crozet C, Lin YL, Mettling C, Mourton-Gilles C, Corbeau P, Lehmann S, Perrier V.** 2004. Inhibition of PrPSc formation by lentiviral gene transfer of PrP containing dominant negative mutations. *J Cell Sci* **117**:5591-5597.
251. **Toupet K, Compan V, Crozet C, Mourton-Gilles C, Mestre-Frances N, Ibos F, Corbeau P, Verdier JM, Perrier V.** 2008. Effective gene therapy in a mouse model of prion diseases. *PLoS One* **3**:e2773.
252. **White MD, Farmer M, Mirabile I, Brandner S, Collinge J, Mallucci GR.** 2008. Single treatment with RNAi against prion protein rescues early neuronal dysfunction and prolongs survival in mice with prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:10238-10243.
253. **Pfeifer A, Eigenbrod S, Al-Khadra S, Hofmann A, Mitteregger G, Moser M, Bertsch U, Kretzschmar H.** 2006. Lentivector-mediated RNAi efficiently suppresses prion protein and prolongs survival of scrapie-infected mice. *J Clin Invest* **116**:3204-3210.
254. **Gill AC, Castle AR.** 2018. The cellular and pathologic prion protein. *Handb Clin Neurol* **153**:21-44.

255. **Korth C, May BC, Cohen FE, Prusiner SB.** 2001. Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:9836-9841.
256. **Forloni G, Iussich S, Awan T, Colombo L, Angeretti N, Girola L, Bertani I, Poli G, Caramelli M, Grazia Bruzzone M, Farina L, Limido L, Rossi G, Giaccone G, Ironside JW, Bugiani O, Salmona M, Tagliavini F.** 2002. Tetracyclines affect prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:10849-10854.
257. **Priola SA, Raines A, Caughey WS.** 2000. Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science* **287**:1503-1506.
258. **Haik S, Brandel JP, Salomon D, Sazdovitch V, Delasnerie-Laupretre N, Laplanche JL, Faucheux BA, Soubrie C, Boher E, Belorgey C, Hauw JJ, Alperovitch A.** 2004. Compassionate use of quinacrine in Creutzfeldt-Jakob disease fails to show significant effects. *Neurology* **63**:2413-2415.
259. **Collinge J, Gorham M, Hudson F, Kennedy A, Keogh G, Pal S, Rossor M, Rudge P, Siddique D, Spyer M, Thomas D, Walker S, Webb T, Wroe S, Darbyshire J.** 2009. Safety and efficacy of quinacrine in human prion disease (PRION-1 study): a patient-preference trial. *Lancet Neurol* **8**:334-344.
260. **Geschwind MD, Kuo AL, Wong KS, Haman A, Devereux G, Raudabaugh BJ, Johnson DY, Torres-Chae C, Finley R, Garcia P, Thai JN, Cheng HQ, Neuhaus JM, Forner SA, Duncan JL, Possin KL, Dearmond SJ, Prusiner SB, Miller BL.** 2013. Quinacrine treatment trial for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* **81**:2015-2023.
261. **Herrmann US, Schütz AK, Shirani H, Huang D, Saban D, Nuvolone M, Li B, Ballmer B, Aslund A, Mason JJ, Rushing E, Budka H, Nystrom S, Hammarström P, Bockmann A, Cafilisch A, Meier BH, Nilsson KP, Hornemann S, Aguzzi A.** 2015. Structure-based drug design identifies polythiophenes as antiprion compounds. *Sci Transl Med* **7**.
262. **Sigurdson CJ, Nilsson KP, Hornemann S, Manco G, Polymenidou M, Schwarz P, Leclerc M, Hammarstrom P, Wuthrich K, Aguzzi A.** 2007. Prion strain discrimination using luminescent conjugated polymers. *Nat Methods* **4**:1023-1030.
263. **Sim VL.** 2012. Prion disease: chemotherapeutic strategies. *Infect Disord Drug Targets* **12**:144-160.
264. **Kamatari YO, Hayano Y, Yamaguchi K, Hosokawa-Muto J, Kuwata K.** 2013. Characterizing antiprion compounds based on their binding properties to prion proteins: implications as medical chaperones. *Protein Sci* **22**:22-34.
265. **Tatzelt J, Prusiner SB, Welch WJ.** 1996. Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J* **15**:6363-6373.
266. **Vieira TC, Cordeiro Y, Caughey B, Silva JL.** 2014. Heparin binding confers prion stability and impairs its aggregation. *FASEB J* **28**:2667-2676.
267. **Ma B, Yamaguchi K, Fukuoka M, Kuwata K.** 2016. Logical design of anti-prion agents using NAGARA. *Biochem Biophys Res Commun* **469**:930-935.
268. **Caughey WS, Raymond LD, Horiuchi M, Caughey B.** 1998. Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:12117-12122.
269. **Muth C, Schrock K, Madore C, Hartmann K, Fanek Z, Butovsky O, Glatzel M, Krasemann S.** 2017. Activation of microglia by retroviral infection correlates with transient clearance of prions from the brain but does not change incubation time. *Brain Pathol* **27**:590-602.
270. **Ertmer A, Gilch S, Yun SW, Flechsig E, Klebl B, Stein-Gerlach M, Klein MA, Schatzl HM.** 2004. The tyrosine kinase inhibitor STI571 induces cellular clearance of PrP^{Sc} in prion-infected cells. *J Biol Chem* **279**:41918-41927.
271. **Heiseke A, Aguib Y, Riemer C, Baier M, Schatzl HM.** 2009. Lithium induces clearance of protease resistant prion protein in prion-infected cells by induction of autophagy. *J Neurochem* **109**:25-34.

272. **Cortes CJ, Qin K, Cook J, Solanki A, Mastrianni JA.** 2012. Rapamycin delays disease onset and prevents PrP plaque deposition in a mouse model of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *J Neurosci* **32**:12396-12405.
273. **Karapetyan YE, Sferrazza GF, Zhou M, Ottenberg G, Spicer T, Chase P, Fallahi M, Hodder P, Weissmann C, Lasmezas CI.** 2013. Unique drug screening approach for prion diseases identifies tacrolimus and astemizole as anti-prion agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:7044-7049.
274. **Axten JM, Medina JR, Feng Y, Shu A, Romeril SP, Grant SW, Li WH, Heerding DA, Minthorn E, Mencken T, Atkins C, Liu Q, Rabindran S, Kumar R, Hong X, Goetz A, Stanley T, Taylor JD, Sigethy SD, Tomberlin GH, Hassell AM, Kahler KM, Shewchuk LM, Gampe RT.** 2012. Discovery of 7-methyl-5-(1-([3-(trifluoromethyl)phenyl]acetyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a potent and selective first-in-class inhibitor of protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). *J Med Chem* **55**:7193-7207.
275. **Moreno JA, Radford H, Peretti D, Steinert JR, Verity N, Martin MG, Halliday M, Morgan J, Dinsdale D, Ortori CA, Barrett DA, Tsaytler P, Bertolotti A, Willis AE, Bushell M, Mallucci GR.** 2012. Sustained translational repression by eIF2alpha-P mediates prion neurodegeneration. *Nature* **485**:507-511.
276. **Atkin JD, Farg MA, Walker AK, McLean C, Tomas D, Horne MK.** 2008. Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* **30**:400-407.
277. **Abisambra JF, Jinwal UK, Blair LJ, O'Leary JC, 3rd, Li Q, Brady S, Wang L, Guidi CE, Zhang B, Nordhues BA, Cockman M, Suntharalingham A, Li P, Jin Y, Atkins CA, Dickey CA.** 2013. Tau accumulation activates the unfolded protein response by impairing endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Neurosci* **33**:9498-9507.
278. **Kohler C, Dinekov M, Gotz J.** 2014. Granulovacuolar degeneration and unfolded protein response in mouse models of tauopathy and Abeta amyloidosis. *Neurobiol Dis* **71**:169-179.
279. **Moreno J, Halliday M, Molloy C, Radford H, Verity N, Axten JM, Ortori CA, Willis AE, Fischer PM, Barrett DA, Mallucci G.** 2013. Oral Treatment Targeting the Unfolded Protein Response Prevents Neurodegeneration and Clinical Disease in Prion-Infected Mice. *Sci Transl Med* **5**.
280. **Krauss S, Vorberg I.** 2013. Prions Ex Vivo: What Cell Culture Models Tell Us about Infectious Proteins. *Int J Cell Biol* **2013**:704546.
281. **Benito-Leon J.** 2004. Combined quinacrine and chlorpromazine therapy in fatal familial insomnia. *Clin Neuropharmacol* **27**:201-203.
282. **Stincardini C, Massignan T, Biggi S, Elezgarai SR, Sangiovanni V, Vanni I, Pancher M, Adami V, Moreno J, Stravalaci M, Maietta G, Gobbi M, Negro A, Requena JR, Castilla J, Nonno R, Biasini E.** 2017. An antipsychotic drug exerts anti-prion effects by altering the localization of the cellular prion protein. *PLoS One* **12**:e0182589.
283. **Hetz C, Russelakis-Carneiro M, Maundrell K, Castilla J, Soto C.** 2003. Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *EMBO J* **22**:5435-5445.
284. **Kristiansen M, Messenger MJ, Klohn PC, Brandner S, Wadsworth JD, Collinge J, Tabrizi SJ.** 2005. Disease-related prion protein forms aggregates in neuronal cells leading to caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem* **280**:38851-38861.
285. **Faris R, Moore RA, Ward A, Sturdevant DE, Priola SA.** 2017. Mitochondrial Respiration Is Impaired during Late-Stage Hamster Prion Infection. *J Virol* **91**.
286. **Kim Y, Han B, Titlow W, Mays CE, Kwon M, Ryou C.** 2009. Utility of RNAi-mediated prnp gene silencing in neuroblastoma cells permanently infected by prions: potentials and limitations. *Antiviral Res* **84**:185-193.

287. **Barret A, Tagliavini F, Forloni G, Bate C, Salmona M, Colombo L, De Luigi A, Limido L, Suardi S, Rossi G, Auvre F, Adjou KT, Sales N, Williams A, Lasmezas C, Deslys JP.** 2003. Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases. *J Virol* **77**:8462-8469.
288. **Massignan T, Cimini S, Stincardini C, Cerovic M, Vanni I, Elezgarai SR, Moreno J, Stravalaci M, Negro A, Sangiovanni V, Restelli E, Riccardi G, Gobbi M, Castilla J, Borsello T, Nonno R, Biasini E.** 2016. A cationic tetrapyrrole inhibits toxic activities of the cellular prion protein. *Sci Rep* **6**:23180.
289. **Cortez LM, Campeau J, Norman G, Kalayil M, Van der Merwe J, McKenzie D, Sim VL.** 2015. Bile Acids Reduce Prion Conversion, Reduce Neuronal Loss, and Prolong Male Survival in Models of Prion Disease. *J Virol* **89**:7660-7672.
290. **Kocisko DA, Baron GS, Rubenstein R, Chen J, Kuizon S, Caughey B.** 2003. New inhibitors of scrapie-associated prion protein formation in a library of 2000 drugs and natural products. *J Virol* **77**:10288-10294.
291. **Beranger F, Mange A, Solassol J, Lehmann S.** 2001. Cell culture models of transmissible spongiform encephalopathies. *Biochem Biophys Res Commun* **289**:311-316.
292. **Raymond GJ, Bossers A, Raymond LD, O'Rourke KI, McHolland LE, Bryant PK, 3rd, Miller MW, Williams ES, Smits M, Caughey B.** 2000. Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle and sheep to chronic wasting disease. *EMBO J* **19**:4425-4430.
293. **Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C.** 2005. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* **121**:195-206.
294. **Saa P, Castilla J, Soto C.** 2005. Cyclic amplification of protein misfolding and aggregation. *Methods Mol Biol* **299**:53-65.
295. **Castilla J, Saa P, Morales R, Abid K, Maundrell K, Soto C.** 2006. Protein misfolding cyclic amplification for diagnosis and prion propagation studies. *Methods Enzymol* **412**:3-21.
296. **Saa P, Castilla J, Soto C.** 2006. Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification. *J Biol Chem* **281**:35245-35252.
297. **Castilla J, Gonzalez-Romero D, Saa P, Morales R, De Castro J, Soto C.** 2008. Crossing the species barrier by PrP(Sc) replication in vitro generates unique infectious prions. *Cell* **134**:757-768.
298. **Soto C, Saborio GP, Anderes L.** 2002. Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends Neurosci* **25**:390-394.
299. **Zhang Y, Wang F, Wang X, Zhang Z, Xu Y, Yu G, Yuan C, Ma J.** 2014. Comparison of 2 synthetically generated recombinant prions. *Prion* **8**:215-220.
300. **Deleault NR, Piro JR, Walsh DJ, Wang F, Ma J, Geoghegan JC, Supattapone S.** 2012. Isolation of phosphatidylethanolamine as a solitary cofactor for prion formation in the absence of nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:8546-8551.
301. **Wagner J, Ryazanov S, Leonov A, Levin J, Shi S, Schmidt F, Prix C, Pan-Montojo F, Bertsch U, Mitteregger-Kretzschmar G, Geissen M, Eiden M, Leidel F, Hirschberger T, Deeg AA, Krauth JJ, Zinth W, Tavan P, Pilger J, Zweckstetter M, Frank T, Bahr M, Weishaupt JH, Uhr M, Urlaub H, Teichmann U, Samwer M, Botzel K, Groschup M, Kretzschmar H, Griesinger C, Giese A.** 2013. Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* **125**:795-813.
302. **Wilham JM, Orru CD, Bessen RA, Atarashi R, Sano K, Race B, Meade-White KD, Taubner LM, Timmes A, Caughey B.** 2010. Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog* **6**:e1001217.
303. **Xue C, Lin TY, Chang D, Guo Z.** 2017. Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *R Soc Open Sci* **4**:160696.
304. **McGuire LI, Poleggi A, Poggiolini I, Suardi S, Grznarova K, Shi S, de Vil B, Sarros S, Satoh K, Cheng K, Cramm M, Fairfoul G, Schmitz M, Zerr I, Cras P, Equestre M, Tagliavini F, Atarashi R, Knox D, Collins S, Haik S, Parchi P, Pocchiari M, Green A.**

2016. Cerebrospinal fluid real-time quaking-induced conversion is a robust and reliable test for sporadic creutzfeldt-jakob disease: An international study. *Ann Neurol* **80**:160-165.
305. **Foutz A, Appleby BS, Hamlin C, Liu X, Yang S, Cohen Y, Chen W, Blevins J, Fausett C, Wang H, Gambetti P, Zhang S, Hughson A, Tatsuoka C, Schonberger LB, Cohen ML, Caughey B, Safar JG.** 2017. Diagnostic and prognostic value of human prion detection in cerebrospinal fluid. *Ann Neurol* **81**:79-92.
306. **Orru CD, Bongianni M, Tonoli G, Ferrari S, Hughson AG, Groveman BR, Fiorini M, Pocchiari M, Monaco S, Caughey B, Zanusso G.** 2014. A test for Creutzfeldt-Jakob disease using nasal brushings. *N Engl J Med* **371**:519-529.
307. **John TR, Schatzl HM, Gilch S.** 2013. Early detection of chronic wasting disease prions in urine of pre-symptomatic deer by real-time quaking-induced conversion assay. *Prion* **7**:253-258.
308. **Cheng YC, Hannaoui S, John TR, Dudas S, Czub S, Gilch S.** 2016. Early and Non-Invasive Detection of Chronic Wasting Disease Prions in Elk Feces by Real-Time Quaking Induced Conversion. *PLoS One* **11**:e0166187.
309. **Henderson DM, Denkers ND, Hoover CE, Garbino N, Mathiason CK, Hoover EA.** 2015. Longitudinal Detection of Prion Shedding in Saliva and Urine by Chronic Wasting Disease-Infected Deer by Real-Time Quaking-Induced Conversion. *J Virol* **89**:9338-9347.
310. **Redaelli V, Bistaffa E, Zanusso G, Salzano G, Sacchetto L, Rossi M, De Luca CM, Di Bari M, Portaleone SM, Agrimi U, Legname G, Roiter I, Forloni G, Tagliavini F, Moda F.** 2017. Detection of prion seeding activity in the olfactory mucosa of patients with Fatal Familial Insomnia. *Sci Rep* **7**:46269.
311. **Haley NJ, Sieper C, Hoon-Hanks LL, Mitchell G, Walter WD, Manca M, Monello RJ, Powers JG, Wild MA, Hoover EA, Caughey B, Richt JA.** 2016. Seeded Amplification of Chronic Wasting Disease Prions in Nasal Brushings and Recto-anal Mucosa-Associated Lymphoid Tissues from Elk by Real-Time Quaking-Induced Conversion. *J Clin Microbiol* **54**:1117-1126.
312. **Hyeon JW, Kim SY, Lee SM, Lee J, An SS, Lee MK, Lee YS.** 2017. Anti-Prion Screening for Acridine, Dextran, and Tannic Acid using Real Time-Quaking Induced Conversion: A Comparison with PrPSc-Infected Cell Screening. *PLoS One* **12**:e0170266.
313. **Ferreira NC, Ascari LM, Hughson AG, Cavalheiro GR, Goes CF, Fernandes PN, Hollister JR, da Conceicao RA, Silva DS, Souza AMT, Barbosa MLC, Lara FA, Martins RAP, Caughey B, Cordeiro Y.** 2018. A Promising Antiprion Trimethoxychalcone Binds to the Globular Domain of the Cellular Prion Protein and Changes Its Cellular Location. *Antimicrob Agents Chemother* **62**.
314. **Schmitz M, Cramm M, Llorens F, Candelise N, Muller-Cramm D, Varges D, Schulz-Schaeffer WJ, Zafar S, Zerr I.** 2016. Application of an in vitro-amplification assay as a novel pre-screening test for compounds inhibiting the aggregation of prion protein scrapie. *Sci Rep* **6**:28711.
315. **Berrow NS, Alderton D, Sainsbury S, Nettleship J, Assenberg R, Rahman N, Stuart DI, Owens RJ.** 2007. A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. *Nucleic Acids Res* **35**:e45.
316. **Inoue H, Nojima H, Okayama H.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-28.
317. **Fernandez-Borges N, de Castro J, Castilla J.** 2009. In vitro studies of the transmission barrier. *Prion* **3**:220-223.
318. **Gonzalez-Romero D, Barria MA, Leon P, Morales R, Soto C.** 2008. Detection of infectious prions in urine. *FEBS Lett* **582**:3161-3166.
319. **Fernandez-Borges N, Di Bari MA, Erana H, Sanchez-Martin M, Pirisinu L, Parra B, Elezgarai SR, Vanni I, Lopez-Moreno R, Vaccari G, Venegas V, Charco JM, Gil D, Harrathi C, D'Agostino C, Agrimi U, Mayoral T, Requena JR, Nonno R, Castilla J.** 2017.

- Cofactors influence the biological properties of infectious recombinant prions. *Acta Neuropathol* doi:10.1007/s00401-017-1782-y.
320. **Erana H, Fernandez-Borges N, Elezgarai SR, Harrathi C, Charco JM, Chianini F, Dagleish MP, Ortega G, Millet O, Castilla J.** 2017. In Vitro Approach To Identify Key Amino Acids in Low Susceptibility of Rabbit Prion Protein to Misfolding. *J Virol* **91**.
 321. **Manno M, Craparo EF, Podesta A, Bulone D, Carrotta R, Martorana V, Tiana G, San Biagio PL.** 2007. Kinetics of different processes in human insulin amyloid formation. *J Mol Biol* **366**:258-274.
 322. **Nielsen D, Gyllberg H, Ostlund P, Bergman T, Bedecs K.** 2004. Increased levels of insulin and insulin-like growth factor-1 hybrid receptors and decreased glycosylation of the insulin receptor alpha- and beta-subunits in scrapie-infected neuroblastoma N2a cells. *Biochem J* **380**:571-579.
 323. **Fernandez-Borges N, Erana H, Elezgarai SR, Harrathi C, Venegas V, Castilla J.** 2017. A Quick Method to Evaluate the Effect of the Amino Acid Sequence in the Misfolding Proneness of the Prion Protein. *Methods Mol Biol* **1658**:205-216.
 324. **Elezgarai SR, Fernández-Borges N, Erana H, Sevillano A, Moreno J, Harrathi C, Saá P, Gil D, Kong Q, Requena JR, Andreoletti O, Castilla J.** 2017. Generation of a new infectious recombinant prion: a model to understand Gerstmann–Sträussler–Scheinker syndrome. *Sci Rep* doi:10.1038/s41598-017-09489-3.
 325. **Deleault NR, Kasczak R, Geoghegan JC, Supattapone S.** 2010. Species-dependent differences in cofactor utilization for formation of the protease-resistant prion protein in vitro. *Biochemistry* **49**:3928-3934.
 326. **Makarava N, Ostapchenko VG, Savtchenko R, Baskakov IV.** 2009. Conformational switching within individual amyloid fibrils. *J Biol Chem* **284**:14386-14395.
 327. **Di Bari MA, Nonno R, Castilla J, D'Agostino C, Pirisinu L, Riccardi G, Conte M, Richt J, Kunkle R, Langeveld J, Vaccari G, Agrimi U.** 2013. Chronic wasting disease in bank voles: characterisation of the shortest incubation time model for prion diseases. *PLoS Pathog* **9**:e1003219.
 328. **Pirisinu L, Di Bari MA, D'Agostino C, Marcon S, Riccardi G, Poleggi A, Cohen ML, Appleby BS, Gambetti P, Ghetti B, Agrimi U, Nonno R.** 2016. Gerstmann-Straussler-Scheinker disease subtypes efficiently transmit in bank voles as genuine prion diseases. *Sci Rep* **6**:20443.
 329. **Orru CD, Groveman BR, Raymond LD, Hughson AG, Nonno R, Zou W, Ghetti B, Gambetti P, Caughey B.** 2015. Bank Vole Prion Protein As an Apparently Universal Substrate for RT-QuIC-Based Detection and Discrimination of Prion Strains. *PLoS Pathog* **11**:e1004983.
 330. **Kocisko DA, Bertholet N, Moore RA, Caughey B, Vaillant A.** 2007. Identification of prion inhibitors by a fluorescence-polarization-based competitive binding assay. *Anal Biochem* **363**:154-156.
 331. **Kawatake S, Nishimura Y, Sakaguchi S, Iwaki T, Doh-ura K.** 2006. Surface plasmon resonance analysis for the screening of anti-prion compounds. *Biol Pharm Bull* **29**:927-932.
 332. **Breydo L, Bocharova OV, Baskakov IV.** 2005. Semiautomated cell-free conversion of prion protein: applications for high-throughput screening of potential antiprion drugs. *Anal Biochem* **339**:165-173.
 333. **Guest WC, Cashman NR, Plotkin SS.** 2010. Electrostatics in the stability and misfolding of the prion protein: salt bridges, self energy, and solvation. *Biochem Cell Biol* **88**:371-381.
 334. **Gonzalez-Montalban N, Makarava N, Ostapchenko VG, Savtchenko R, Alexeeva I, Rohwer RG, Baskakov IV.** 2011. Highly efficient protein misfolding cyclic amplification. *PLoS Pathog* **7**:e1001277.
 335. **Pritzkow S, Wagenfuhr K, Daus ML, Boerner S, Lemmer K, Thomzig A, Mielke M, Beekes M.** 2011. Quantitative detection and biological propagation of scrapie seeding activity in vitro facilitate use of prions as model pathogens for disinfection. *PLoS One* **6**:e20384.

336. **Johnson CJ, Aiken JM, McKenzie D, Samuel MD, Pedersen JA.** 2012. Highly efficient amplification of chronic wasting disease agent by protein misfolding cyclic amplification with beads (PMCAb). *PLoS One* **7**:e35383.
337. **Groveman BR, Kraus A, Raymond LD, Dolan MA, Anson KJ, Dorward DW, Caughey B.** 2015. Charge neutralization of the central lysine cluster in prion protein (PrP) promotes PrP(Sc)-like folding of recombinant PrP amyloids. *J Biol Chem* **290**:1119-1128.
338. **Alred EJ, Lodangco I, Gallaher J, Hansmann UHE.** 2018. Mutations Alter RNA-Mediated Conversion of Human Prions. *ACS Omega* **3**:3936-3944.
339. **Fernández-Borges N, Erana H, Elezgarai SR, Harrathi C, Venegas V, Castilla J.** 2017. A quick method to evaluate the effect of the amino acid sequence in the misfolding proneness of the prion protein. *In* Lawson VA (ed), *Prions: Methods and Protocols*. Springer.
340. **Atarashi R, Moore RA, Sim VL, Hughson AG, Dorward DW, Onwubiko HA, Priola SA, Caughey B.** 2007. Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein. *Nat Methods* **4**:645-650.
341. **Abdallah A, Wang P, Richt JA, Sreevatsan S.** 2012. Y145Stop is sufficient to induce de novo generation prions using protein misfolding cyclic amplification. *Prion* **6**:81-88.
342. **Barria MA, Mukherjee A, Gonzalez-Romero D, Morales R, Soto C.** 2009. De novo generation of infectious prions in vitro produces a new disease phenotype. *PLoS Pathog* **5**:e1000421.
343. **Risse E, Nicoll AJ, Taylor WA, Wright D, Badoni M, Yang X, Farrow MA, Collinge J.** 2015. Identification of a Compound That Disrupts Binding of Amyloid-beta to the Prion Protein Using a Novel Fluorescence-based Assay. *J Biol Chem* **290**:17020-17028.
344. **Greenwood AD, Horsch M, Stengel A, Vorberg I, Lutzny G, Maas E, Schadler S, Erfle V, Beckers J, Schatzl H, Leib-Mosch C.** 2005. Cell line dependent RNA expression profiles of prion-infected mouse neuronal cells. *J Mol Biol* **349**:487-500.

LISTA DE PUBLICACIONES

-**"A cationic tetrapyrrole inhibits toxic activities of the cellular prion protein"** Massignan T, Cimini S, Stincardini C, Cerovic M, Vanni I, Elezgarai SR, Moreno J, Stravalaci M, Negro A, Sangiovanni V, Restelli E, Riccardi G, Gobbi M, Castilla J, Borsello T, Nonno R, Biasini E. *Scientific reports*. 2016 Mar 15;6:23180.

-**"Prion-like disorders and Transmissible Spongiform Encephalopathies: An overview of the mechanistic features that are shared by the various disease-related misfolded proteins"** Eraña H, Venegas V, Moreno J, Castilla J. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017 Feb 19;483(4): 1125-1136.

-**"An antipsychotic drug exerts anti-prion effects by altering the localization of the cellular prion protein"** Stincardini C, Massignan T, Biggi S, Elezgarai SR, Sangiovanni V, Vanni I, Pancher M, Adami V, Moreno J, Stravalaci M, Maietta G, Gobbi M, Negro A, Requena JR, Castilla J, Nonno R, Biasini E. *PLoS One*. 2017 Aug 7;12(8):e0182589.

-**"Generation of a new infectious recombinant prion: a model to understand Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome"** Elezgarai SR, Fernández-Borges N, Eraña H, Sevillano AM, Charco JM, Harrathi C, Saá P, Kong Q, Requena JR, Andréoletti O, Castilla J. *Scientific Reports*. 2017 Aug 28;7(1):9584.

-**"An in vitro approach to identify the key amino acids in the low susceptibility of rabbit PrP to misfolding"** Eraña H, Fernández-Borges N, Elezgarai SR, Harrathi C, Charco JM, Chianini F, Dagleish MP, Ortega G, Millet Ó, Castilla J. *Journal of Virology*. 2017 Nov 30;91(24).

-**"Recombinant PrP and its contribution to research on Transmissible Spongiform Encephalopathies"** Charco JM, Eraña H, Venegas V, García-Martínez S, López-Moreno R, González-Miranda MÁ, Castilla J. *Pathogens*. 2017 Dec 14;6(4).

-**"Cofactors influence the biological properties of infectious recombinant prions"** Fernández-Borges N, Di Bari MA, Eraña H, Sánchez-Martin M, Pirisinu L, Parra B, Elezgarai

S, Vanni I, López-Moreno R, Vaccari G, Venegas V, Charco JM, Gil D, Harrathi C, D'Ágostino C, Agrimi U, Mayoral T, Requena JR, Nonno R, Castilla J. ***Acta Neuropathologica*. 2018 Feb 135(2):179-199.**

-“Repurposing ciclopirox as a pharmacological chaperone for the treatment of congenital erythropoietic porphyria” Urquiza P, Laín A, Sanz-Parra A, Charco JM, Bernardo G, Dubus P; González E, Gutiérrez V, García-Martínez S, Eraña H, San Juan I, Macías I, Ben Bdira F, Pluta P, Ortega G, Oyarzábal J, González-Muñiz R, Rodríguez-Cuesta J, Anguita J, Díez E, Blouin JM, de Verneuil H, Mato JM, Richard E, Falcón J, Castilla J, Millet O. ***Science Translational Medicine*. 2018 In press**