

Marina Betancor Caro

Contribuciones al estudio de
biomarcadores, terapia y
fenómeno de cepas en las
enfermedades priónicas

Director/es

Bolea Bailo, Rosa María
Badiola Díez, Juan José

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

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

CONTRIBUCIONES AL ESTUDIO DE
BIOMARCADORES, TERAPIA Y FENÓMENO DE
CEPAS EN LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS

Autor

Marina Betancor Caro

Director/es

Bolea Bailo, Rosa María
Badiola Díez, Juan José

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Medicina y Sanidad Animal

2023



Universidad
Zaragoza

Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes
Departamento de Patología Animal
Facultad de Veterinaria

**CONTRIBUCIONES AL ESTUDIO DE
BIOMARCADORES, TERAPIA Y FENÓMENO
DE CEPAS EN LAS ENFERMEDADES
PRIÓNICAS**

Memoria de tesis presentada por la graduada

Marina Betancor Caro

para optar al grado de Doctora por la Universidad de Zaragoza

Directores:

Dra. Rosa M^a Bolea Bailo
Dr. Juan José Badiola Díez

Zaragoza, noviembre 2022



Centro de Encefalopatías y
Enfermedades Transmisibles
Emergentes
Universidad Zaragoza



Departamento de
Patología Animal
Universidad Zaragoza

Dña. ROSA M^a BOLEA BAILO, Catedrática del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza y **D. JUAN JOSÉ BADIOLA DÍEZ**, Director del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes y Profesor Honorario del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza

INFORMAN

Que Dña. Marina Betancor Caro ha realizado, bajo nuestra dirección, los trabajos correspondientes a su Tesis Doctoral titulada “**CONTRIBUCIONES AL ESTUDIO DE BIOMARCADORES, TERAPIA Y FENÓMENO DE CEPAS EN LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS**”, que corresponde con el plan de investigación aprobado por la Comisión de Doctorado y cumple con los requisitos exigidos por la legislación vigente para optar al Grado de Doctora por la Universidad de Zaragoza, por lo que autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

En Zaragoza, a 17 de noviembre de 2022

Fdo: Juan José Badiola Díez

Fdo: Rosa M^a Bolea Bailo

Este trabajo ha sido posible gracias a un contrato predoctoral del Gobierno de Aragón (IIU/2023/2017), cofinanciado por el Fondo Social Europeo (Programa Operativo FSE Aragón 2014-2020), y gracias a la Universidad de Zaragoza, que ha aportado las instalaciones y a la cual pertenecen los Directores del trabajo. Asimismo, este trabajo ha sido posible gracias al apoyo de los siguientes programas y sus proyectos:

- Programa de Cooperación Transfronteriza España, Francia, Andorra con contribución del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (POCTEFA-FEDER): Proyecto “Red de Investigación Transfronteriza en Enfermedades Priónicas Humanas y Animales”, EFA 148/16 (Redprion).
- Proyecto RTI2018-098711-B-I00: Transmisión, multiplicación, toxicidad y dianas terapéuticas de enfermedades priónicas en modelos celulares y bioensayos. Cofinanciado por la Agencia Estatal de Investigación, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, y Fondos FEDER.



Centro de Encefalopatías y
Enfermedades Transmisibles
Emergentes
Universidad Zaragoza



Departamento de
Patología Animal
Universidad Zaragoza

Dña. ROSA M^a BOLEA BAILO, Catedrática del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza y **D. JUAN JOSÉ BADIOLA DÍEZ**, Director del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes y Profesor Honorario del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza

INFORMAN

Que Dña. Marina Betancor Caro, bajo nuestra dirección, presenta el trabajo correspondiente a su Tesis Doctoral titulada **“CONTRIBUCIONES AL ESTUDIO DE BIOMARCADORES, TERAPIA Y FENÓMENO DE CEPAS EN LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS”** para optar al Grado de Doctora por la Universidad de Zaragoza con “Mención Internacional”. Cumpliendo con la legislación vigente, este trabajo incluye dos informes de las siguientes expertas doctoras pertenecientes a instituciones extranjeras:

- Dra. Leonor Orge, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Produção e Saúde Animal, Av. República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras, Portugal. Doctora por la Trás-os-Montes e Alto Douro University el 16/9/2005.
- Dra. Alvina Huor, Institut national de la recherche agronomique (INRAe), École Nationale Vétérinaire de Toulouse UMR 1225 IHAP (Interactions hôtes-agents pathogènes), 23, Chemin des Capelles, 31076 Toulouse, Francia. Doctora por la Toulouse III - Paul Sabatier University el 8/12/2021.

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

Estancia desde el 1 de marzo hasta el 4 de junio de 2021 (94 días) en el Institut National de la Recherche Agronomique (INRAE), École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT), Toulouse, Francia, bajo la supervisión del Dr. Olivier Andréoletti en la que la estudiante

de doctorado trabajó en el análisis de las características biopatológicas y de la capacidad de transmisibilidad y propagación de cepas priónicas mediante técnicas *in vitro*. Por tanto, cumple con los requisitos necesarios para optar al Título de Doctora con Mención Internacional.

En Zaragoza, a 17 de noviembre de 2022



Fdo: Juan José Badiola Díez



Fdo: Rosa Mª Bolea Bailo



INFORME VALORACIÓN TESIS DOCTORAL / PhD THESIS ASSESSMENT REPORT

Doctorando-a / Doctoral Student: **MARINA BETANCOR CARO**

Título de la Tesis / Title of the Thesis:
CONTRIBUCIONES AL ESTUDIO DE BIOMARCADORES, TERAPIA Y FENÓMENO DE CEPAS EN LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS

D./Dña. Maria Leonor dos Santos Diniz Orge

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

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

En Oeiras, a 25 de noviembre de 2022

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

Comente la originalidad del trabajo presentado, la relevancia del mismo dentro del dominio al que pertenece la tesis, la metodología y la calidad de la memoria presentada. Incluya, en su caso, los comentarios que desee hacer llegar al doctorando (adjunte las hojas que sean necesarias).

Discuss the originality and relevance of the work as well as the quality of the dissertation. You may include any comments that you want to send to the PhD student (please, attach as many pages as necessary).

I have read with interest the PhD Thesis of Marina Betancor Caro, entitled “Contribuciones al estudio de biomarcadores, terapia y fenómeno de cepas en las enfermedades priónicas” which is of great importance as it represents an enrichment of knowledge on different factors in the pathogenesis of prion diseases and prion strains. It evaluates the potential of an agent therapy by studying its influence on different characteristics of the pathogenesis of prion diseases, such as autophagy and apoptosis (Study 1), the putative diagnostic ability of some proteins involved in neurodegeneration as preclinical biomarkers for prion diseases diagnosis (Study 2), the particularity of strains in prion diseases by both in vitro techniques and by bioassay (Study 3) as well as develops methods to facilitate the study of these diseases by replacing traditional methods (Study 4).

As research in treatment for these fatal diseases is relevant, study 1 tests the potential of a therapeutic agent (non-toxic C-terminal fragment of tetanus toxin (TTC)). Despite not preventing PrPSc deposition, TTC administration reduces caspase-mediated apoptosis and regulates autophagic mechanisms in scrapie mouse models showing neuroprotective effects that reflect an increase in neuronal survival by modulation of autophagic mechanisms.

The finding of biomarkers that allow the detection of the disease in preclinical stages is another noteworthy feature of prion disease research. For that, the candidate developed Study 2 to evaluate neurogranin (Ng) and neurofilament light chain (NfL) as putative biomarkers confirming that the concentration of Ng and Nf is affected by the accumulation of prions even in preclinical stages of prion disease and the usefulness of both proteins as preclinical biomarkers for prion diseases.

Increasing the characterization of prion strains is a crucial point for evaluating their ability to infect different species and for the control and eradication of prion diseases. Study 3 demonstrated that PMCA can be used to detect 21kDa strains in homogenates that show a 19kDa signature and also that it is capable of detecting the tissue-dependent differential selection that occurs in bioassays. Moreover, the results suggested that the natural ovine scrapie isolates used in the study contained mixtures of strains and that co-infection with various strains may occur frequently in nature.

Recombinant PrP has been an important achievement in prion research but these recombinant prions can differ in their pathogenicity challenging their use as reliable prion models. In study 4, the characteristics of different natural scrapie strains (22L, RML, 263K and ME7) and their recombinant homologues were comparatively analyzed after their bioassay in the TgVole model to determine which ones can be propagated efficiently in vitro on a recombinant protein and subsequently in vivo maintaining its biological properties. The recombinant strains 22L-PMSA-2 and RML-PMSA-1 characterized in this study showed the same patterns of spongiosis and PrPSc deposition that their natural counterparts, which makes them a good model to use in further studies on prion biology.

The thesis is well organized based on the four particular studies that guide the remaining structure of material and methods, results and discussion.

The candidate clearly demonstrated an excellent understanding of the current literature on prion diseases, selecting well the topics for the Introduction to support the main aim of the Thesis and to discuss previous and her own results as well as the overall conclusions.

The research approaches and methods are fully appropriate, the results clearly described and thoroughly discussed.

Some of these results have already been included in two published papers, corresponding to studies 1 and 2:

- Betancor M., Moreno-Martínez L., López-Pérez O., Otero A., Hernaiz A., Barrio T., Badiola J.J., Osta R., Bolea R., Martín-Burriel I. (2021). "Therapeutic Assay with the Non-toxic C-Terminal Fragment of Tetanus Toxin (TTC) in Transgenic Murine Models of Prion Disease". *Mol. Neurobiol.* doi: 10.1007/s12035-021-02489-5;
- Betancor M., Pérez-Lázaro S., Otero A., Marín B., Martín-Burriel I., Blennow K., Badiola J.J., Zetterberg H., Bolea R. (2022). "Neurogranin and Neurofilament Light Chain as Preclinical Biomarkers in Scrapie". *Int. J. Mol. Sci.* doi: 10.3390/ijms23137182.

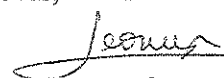
The other studies 3 and 4 revealed interesting findings for prion strains insight and should be prompted to be submitted to publication.

This reviewer is of the opinion that this Doctoral Thesis represents a very solid hard work.

In conclusion, I strongly recommend this work to be submitted for examination as a Doctoral Thesis and to endorse the international doctorate title.

I also would like to congratulate the author for her high-quality research and to wish her the very best with the public defense of the Thesis and for her professional future.

Oeiras, 25th November 2022


Maria Leonor Orge

Laboratory of Pathology, Animal Production and Health Unit, INIAV



INFORME VALORACIÓN TESIS DOCTORAL / PhD THESIS ASSESSMENT REPORT

Doctorando-a / Doctoral Student: MARINA BETANCOR CARO

Título de la Tesis / Title of the Thesis: CONTRIBUCIONES AL ESTUDIO DE BIOMARCADORES, TERAPIA Y FENÓMENO DE CEPAS EN LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS

D./Dña. ...ALVINA HUOR.....
[] Como..... del Tribunal que ha juzgado la tesis doctoral / As of the Doctoral Committee that has evaluated the PhD tesis
[X] Como evaluador de la tesis con mención de doctorado internacional o europea / As external examiner of the PhD thesis (International or European Mention PhD) emite el informe que sigue / issues the following report.
En Toulouse, a 25 de noviembre de 2022
Firma/Sign.: [Signature]

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

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

I read the PhD thesis manuscript by Ms. Marina BETANCOR entitled "Contribuciones al estudio de biomarcadores, terapia y fenómeno de cepas en las enfermedades priónicas" with great interest.

The manuscript is well written and structured. It is divided into five sections. In the first part the context of the thesis and its objectives are described. A bibliographic review of the Prion (in relation to the objectives) is then presented. This section is well documented, clear and supported by adequate figures.

In the next section of the manuscript the experimental results generated during the thesis are reported; they are organized into four studies. The two first studies have already been published in peer reviewed journals (in "Molecular Neurobiology" and in "Journal of Molecular Sciences" respectively). The results of the two other studies are presented as scientific paper drafts. In the last part of the manuscript, the results are discussed and general conclusions are presented.

In her first publication, the PhD candidate presents a study aiming at characterizing the therapeutic potential of the non-toxic C-terminal fragment of the tetanus toxin (TTC) to treat prion diseases. Wild-type mice (C57BL6, expressing murine PrPc) and transgenic mice (Tg338, overexpressing ovine PrPc) were intracerebrally inoculated with scrapie prions and submitted to repeated intramuscular injections of TTC (1µg of TTC recombinant protein, once per month for 6 months). In these models, specific markers for neuronal survival (NeuN), autophagy (proteins (LC3B and p62) and transcriptomic (Atg5, Becl1, Fbxw7 and Gas5)), and apoptosis (activated caspase-3) indicated a positive impact (apoptosis reduction, autophagy regulation and neuronal survival increase) of TTC administration. However, no major impact was observed in the course of the disease (survival time) between treated and untreated animals.

In a second study, the use of Neurogranin (Ng) and neurofilament light chain (NfL) as biomarkers for the pre-symptomatic detection was assessed in an ovine model of Prion disease. Natural scrapie affected sheep were studied in the incubating and clinical stage. Data indicated a diminution of the Ng and NfL protein and transcript levels in the CNS associated with the progression of the disease with significant statistical differences between negative control animals (non-scrapie infected) and scrapie infected animals at the preclinical stage of the disease. In addition, a negative correlation was found between the levels of the analysed biomarkers and scrapie-related neurobiological features. Conversely, increasing NfL concentration in the CSF has been related to the clinical status progression of scrapie-affected sheep. These results support the view that Ng and NfL in CSF may provide markers of the evolution of neurodegenerative process during preclinical phase of the incubation.

The two last studies included in the manuscript focused on the Prion strain phenomenon and Prion strain evolution.

In their third paper, M. Betancor and colleagues assessed the dynamics of evolution of Prion strains in natural scrapie isolates. Starting from natural scrapie isolates, which contained several strains, several iterative passages (2 to 3) were performed in mice that express either the VRQ or the ARQ ovine PrP variants. In these transmission experiments, isolates prepared from the spleen or brain of the inoculated mice (passage n) were inoculated intracerebrally in new animals (passage n+1). Spleen and brain collected in successive passages were then characterized using PrP^{Sc} Western Blot and a Protein Misfolding Cyclic Amplification protocol that allows the restrictive amplification of a subset of strains (associated with a 21kDa WB banding pattern). This PMCA protocol enabled highly sensitive (up to a 10⁻⁸ dilution of 10% brain homogenate) and specific detection of the 21K strain without amplification of another dominant strain present in the original isolate (characterized by a 19K banding pattern in WB).

The obtained results demonstrate that in the original isolates and in isolates derived from mice (brain and spleen) 21K strain(s) co-propagated (at different levels) with the 19K strain. Moreover, a tissue-dependent differential strain selection (21K strain in the spleen and 19K in the brain) was observed in the brain *versus* spleen upon sub-passages in mice. This study further documents the complexity of the Prion strain co-propagation phenomenon in mammals and provides new evidence for the impact of host components (selection pressure) on the dynamics of Prion strain evolution.

In her fourth study, the PhD candidate assessed the characteristics of (i) several rodent brain-derived scrapie prion strains (22L, RML, 263K and ME7) and (ii) the same prion strains after propagation *in vitro* (PMSA) using bank vole recombinant PrP. Both types of prions were transmitted in mice expressing the bank vole Ile109 PrP variant and the phenotypic strain characteristics of each prion were established. The results indicated that all the PMSA-recombinant and brain-derived prion strains were able to propagate in this rodent model where they caused clinical prion disease. Moreover, the generated data demonstrated that 22L and RML and some of their PMSA-recombinant homologues (22L-PMSA-2 and RML-PMSA-1, respectively) display the same phenotype in the bank vole model (lesion profile and PrP deposition pattern). These results demonstrate that some (but not all) prions are able to maintain their strain properties when propagated using a PrP-recombinant substrate.

Globally, the data and study reported in this manuscript constitute a coherent and valuable work. The study design is pertinent and the results obtained provide interesting insights into different important topics for Prion diseases (therapeutic approaches, markers of disease evolution, strain evolution determinants).

The presentation of the results is clear and the manuscript demonstrates the ability of Ms. Marina Betancor to organize, analyse, interpret and finally restate complex results she generated using state-of-the-art technologies and pertinent models in the Prion field.

In conclusion, I strongly recommend that this thesis be orally defended in order to obtain PhD degree.

November 25th, 2022

Yours sincerely,



Alvina HUOR, PhD

INRAe / ENVT UMR 1225 IHAP
Équipe Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles
Tél : 05.61.19.32.40 | alvina.huor@envt.fr
École Nationale Vétérinaire de Toulouse
23, chemin des Capelles – BP 87614 – 31076 Toulouse Cedex 3 - France





CERTIFICADO DE ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN

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

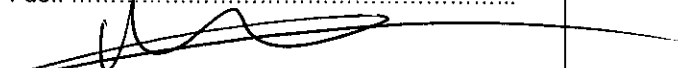
CERTIFICA que

D/D.^a Marina Betancor Caro , procedente de la Universidad de Zaragoza ha realizado desde el 01-Mar-2021 (fecha de inicio) hasta el 04-Jun-2021 (fecha final)

una estancia de investigación enmarcada en el desarrollo de su tesis doctoral en el departamento/instituto/centro de UMR ENVT-INRA 1225 IHAP (identifíquese lo que proceda).

Y para que así conste, firmo la presente

en Zaragoza, a de de 201

<p>Fdo.:</p> <p><input type="checkbox"/> El director del Departamento</p> <p><input type="checkbox"/> El coordinador del programa de doctorado</p>	<p>Visto bueno del responsable/tutor Durante la estancia</p> <p>INRA-ENVT UMR 1225 - IHAP</p> <p>Interactions-Hôtes-Agents-Pathogènes 23, chemin des Capelles BP 87614 31076 TOULOUSE cedex 3</p> <p>Fdo.: Olivier Andréoletti</p> 
--	--

Lista de abreviaturas

A		D	
AD	Enfermedad de Alzheimer <i>Alzheimer's disease</i>	DAB	<i>3,3'-Diaminobenzidine</i>
Akt/PI3K	<i>Protein kinase B / phosphatidylinositol 3-kinase</i>	DNA	Ácido desoxirribonucleico
ALS	Esclerosis Lateral Amiotrófica <i>Amyotrophic lateral sclerosis</i>	Dpi	Días post-inoculación <i>Days post-inoculation</i>
ATF6	<i>Activating transcription factor 6</i>	E	
Atg5	<i>Autophagy related 5</i>	EET	Encefalopatías espongiiformes transmisibles
B		ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X</i>	ER	Retículo endoplasmático
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>	F	
Becn1	<i>Beclin 1</i>	Fc	<i>Frontal cortex</i>
BiP/GRP78	<i>Binding immunoglobulin protein</i>	Fbxw7	<i>F-box/WD repeat-containing protein 7</i>
BSE	Encefalopatía espongiiforme bovina <i>Bovine spongiform encephalopathy</i>	fCJD	Enfermedad de Creutzfeldt- Jakob familiar
BSE-C	Encefalopatía espongiiforme bovina clásica <i>Classical Bovine spongiform encephalopathy</i>	FEE	Encefalopatía espongiiforme felina
C		FFI	<i>Fatal familial insomnia</i>
Cb	Cerebelo / <i>Cerebellum</i>	FTIR	Espectrometría de infrarrojos transformados de Fourier
CJD	Enfermedad de Creutzfeldt- Jakob <i>Creutzfeldt-Jakob disease</i>	G	
CNS	<i>Central nervous system</i>	GALT	<i>Gut associated lymphoid tissue</i>
CSF	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Gas5	<i>Growth arrest-specific 5</i>
CWD	Enfermedad crónica caquetizante <i>Chronic wasting disease</i>	GDNF	<i>Glial-derived neurotrophic factor</i>
		GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol
		GSS	Síndrome de Gerstmann- Sträussler-Scheinker

H		O	
H6pd	<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>	ORF	Marco de lectura abierto
HD	Enfermedad de Huntington <i>Huntington's disease</i>	P	
Hp	<i>Hippocampus</i>	Pc	<i>Parietal cortex</i>
Ht	<i>Hypothalamus</i>	PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
K		PD	Enfermedad de Parkinson <i>Parkinson's Disease</i>
kDa	Kilodalton	PIRIBS	<i>Parallel in-register intermolecular beta-sheet</i>
I		PK	Proteínasa K
iCJD	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica	PMCA	<i>Protein misfolding cyclic amplification</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>	PRNP	Gen que codifica la proteína prion
IHC	Inmunohistoquímica <i>Immunohistochemistry</i>	PrP²⁷⁻³⁰	Fragmento de la proteína prion patológica resistente a la PK de 27-30 kDa
IRE1	<i>Inositol-requiring enzyme 1</i>	PrP^C	Proteína prion celular
L		PrP^{res}	Fragmento de la proteína prion patológica resistente a la PK
LCR	Líquido cefalorraquídeo	PrP-rec	Proteína prion recombinante
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>	PrP^{Sc}	Proteína prion patológica
M		Q	
mAb	<i>Monoclonal antibody</i>	qPCR	<i>Quantitative (Real time) - PCR</i>
Mes	<i>Mesencephalon</i>	R	
Mobl	<i>Medulla oblongata</i>	RER	Retículo endoplasmático rugoso
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero	RMN	Resonancia Magnética Nuclear
N		RNA	Ácido ribonucleico
NEFL	<i>Neurofilament light chain-encoding gene</i>	RT-QuIC	<i>Real-time quaking-induced conversion</i>
Nfs	<i>Neurofilaments</i> Neurofilamentos	S	
NfL	Neurofilamento de cadena ligera <i>Neurofilament light chain</i>	SAF	<i>Scrapie-associated fibrils</i>
Ng	Neurogranina / <i>Neurogranin</i>		
NRGN	<i>Neurogranin-encoding gene</i>		

sCJD	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica	T	
Sdha	<i>Succinate dehydrogenase</i>	TeNT	<i>Tetanus neurotoxin</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>	TME	Encefalopatía transmisible del visón
siRNA	RNA de silenciamiento	TSE	<i>Transmissible spongiform encephalopathies</i>
SLR	Sistema linforreticular	TTC	<i>Non-toxic C-terminal fragment of the tetanus toxin</i>
SMA	<i>Spinal muscular atrophy</i>		
SNC	Sistema nervioso central	V	
SNE	Sistema nervioso entérico	vCJD	Variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
SNP	Sistema nervioso periférico	VPSPr	Prionopatía variable sensible a la proteasa
SQSM1/p62	<i>Sequestosome 1</i>		

L	Litro	°C	Grado centígrado
ml	Mililitro	M	Molar
μl	Microlitro	mM	Milimolar
g	Gramo	h	Hora
mg	Miligramo	m	Minuto
μg	Microgramo	s	Segundo
ng	Nanogramo	o/n	<i>Overnight</i>

Aminoácidos

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

Índice general

Antecedentes y objetivos	1
Antecedentes	3
Objetivos	7
Revisión bibliográfica	11
1. Introducción	13
2. Etiología	15
2.1. La proteína prion celular (PrP ^C) y el gen <i>PRNP</i>	17
2.2. La proteína prion patológica (PrP ^{Sc})	21
2.3. El proceso de conversión	23
3. Transmisibilidad y cepas priónicas	26
3.1. La barrera de transmisión	28
3.2. El fenómeno de cepa en las enfermedades priónicas	31
4. Patogenia	37
4.1. Patogenia de las enfermedades priónicas adquiridas	38
4.2. Patogenia de las enfermedades priónicas genéticas y esporádicas.....	41
4.3. Neurodegeneración	41
5. Diagnóstico	46
5.1. Diagnóstico <i>in vivo</i>	46
5.2. Biomarcadores en el diagnóstico de las EET	47
5.3. Diagnóstico <i>post-mortem</i>	50
5.4. Técnicas no convencionales de detección de priones	51
6. Aproximaciones terapéuticas	53
6.1. Terapias enfocadas a la PrP ^C , la PrP ^{Sc} y el proceso de conversión	53
6.2. Inmunoterapias	55
6.3. Terapias enfocadas a los procesos neurodegenerativos	56
Estudios	59
Estudio 1: Therapeutic Assay with the Non-toxic C-Terminal Fragment of Tetanus Toxin (TTC) in Transgenic Murine Models of Prion Disease	59
Abstract.....	61

Introduction	62
Materials and methods	64
Results	69
Discussion	79
References	84
Estudio 2: Neurogranin and Neurofilament Light Chain as Preclinical Biomarkers in Scrapie	91
Abstract	93
Introduction	94
Materials and methods	96
Results	100
Discussion	108
References	113
Supplementary material	119
Estudio 3: Study of the dynamics of 21kDa associated scrapie strains upon serial passage of scrapie isolates in ovine PrP^C expressing mice	121
Abstract	123
Introduction	124
Materials and methods	126
Results	129
Discussion	136
References	141
Supplementary material	146
Estudio 4: Scrapie recombinant strains in bank vole PrP transgenic mice: assessment of infectivity and derived neuropathology in comparison with brain-derived scrapie mouse strains	147
Abstract	149
Introduction	150
Materials and methods	154
Results	158
Discussion	166

References	171
Supplementary material	172
<i>Discusión general</i>	179
<i>Conclusiones / Conclusions</i>	191
Conclusiones	193
Conclusions	194
<i>Resumen / Abstract</i>	195
Resumen	197
Abstract	201
<i>Anexos</i>	205
<i>Referencias</i>	219

Índice de figuras

Revisión bibliográfica

Figura 1. Síntesis y estructura primaria de la PrP ^C	19
Figura 2. Estructura secundaria de la PrP ^C y PrP ^{Sc}	22
Figura 3. Modelos propuestos de propagación de la PrP ^{Sc}	25
Figura 4. Esquema del tallado encefálico y de las distintas áreas cerebrales analizadas en la metodología de perfil lesional establecida por Fraser y Dickinson	33
Figura 5. Vías de neuroinvasión en las EET adquiridas	40

Estudio 1

Figure 1. Effect of TTC injection in the survival of prion-infected mice	69
Figure 2. Spongiform changes in the brains of TTC-injected and control Tg338 and C57BL6 mice	70
Figure 3. PrP ^{Sc} deposition in the brains of Tg338 and C57BL6 mice TTC-injected and control groups	71
Figure 4. Caspase-3 expression levels in CNS are higher in control mice than in TTC-treated mice	72
Figure 5. LC3B determination in Tg338 and C57BL6 prion infected mice after TTC intramuscular injection	74
Figure 6. Assessment of p62 expression in Tg338 and C57BL6 prion infected mice after TTC intramuscular injection	76
Figure 7. Autophagy-related gene expression profiles	77
Figure 8. Immunohistochemical analyses of NeuN in the brains of TTC-injected and control Tg338 and C57BL6 mice	78

Estudio 2

Figure 1. Assessment of Ng expression in clinical and preclinical scrapie-infected sheep and control sheep	102
Figure 2. Study of NfL expression scrapie-infected and control sheep	104
Figure 3. PrP ^{Sc} deposition and spongiform changes in the brains of clinical, preclinical, and control sheep	105
Figure 4. Analysis of CSF NfL levels in scrapie-infected and non-infected sheep.....	107
Supplementary Figure S1. Schematic map of the brain showing the degree of Ng upregulation in control animals	119

Estudio 3

Figure 1. Dot Blot detection of PrP^{Sc} in 19kDa seeded PMCA130

Figure 2. Detection of PrP^{Sc} by Dot Blot and Western blot in PMCA reactions seeded with serially diluted (10⁻¹-10⁻⁸) brain homogenate from the bioassayed mice131

Figure 3. PrP^{Sc} detection by Dot Blot and Western blot in PMCA reactions seeded with the sheep brain inocula used in the bioassay134

Figure 4. Detection of PrP^{Sc} by Dot Blot and Western blot in PMCA reactions seeded with serially diluted brain and spleen homogenate from Tg338 mice of the 1st passage135

Supplementary Figure S1. PMCA reactions performed in TgARQ substrate with different dextran concentrations using seeds from TgARQ and Tg338 mice brains146

Estudio 4

Figure 1. Western blot from TgVole brains inoculated with 22L, RML, ME7 and 263K mouse and hamster strains159

Figure 2. Survival of prion-infected TgVole161

Figure 3. Neuropathological features in TgVole infected with the 22L mammalian strain and the recombinant 22L-PMSA-1 and 22L-PMSA-2 strains162

Figure 4. Neuropathology in TgVole infected with the RML mammalian strain and its recombinant counterparts163

Figure 5. Comparison between 263K and 263K-PMSA lesions in mice brains164

Figure 6. Spongiosis and PrP^{Sc} accumulation in TgVole infected with the ME7 mammalian strain and ME7-PMSA-2 recombinant strain165

Supplementary Figure S1. Diagram of the study172

Índice de tablas

Estudio 2

Table 1. Primers used in the gene expression analyses100

Table 2. Spearman's correlation values between scores of Ng and NfL expression and prion-associated histopathological lesions in different brain areas106

Supplementary Table S1. Demographic details of the animals included in the study ...119

Estudio 3

Table 1. Brain mice seeds used in the PMCA method test131

Table 2. Bioassay of three sheep scrapie isolates in Tg338 and TgARQ mice133

Table 3. Amplification performances of the brains and spleens end-point titration from the 1st passaged Tg338 mice136

Estudio 4

Table 1. List of inocula included in the study155

Table 2. Mean survival of bioassayed mice160

Antecedentes y objetivos

Las enfermedades priónicas o encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son un conjunto de enfermedades neurodegenerativas transmisibles, con un largo periodo de incubación y cuyo curso es invariablemente fatal. Están producidas por un agente no convencional denominado prion, cuya naturaleza es exclusivamente proteica, y que es el resultado de la conversión de la proteína fisiológica PrP^C en su isoforma anómala (PrP^{Sc} o prion) (Prusiner, 1998b). El principal evento patogénico que se observa en estas enfermedades es la conversión de PrP^C en PrP^{Sc}, y su principal característica neuropatológica es la degeneración espongiforme del sistema nervioso central (SNC). Otros hallazgos neuropatológicos comunes a estos procesos son la gliosis, la pérdida neuronal y el depósito de PrP^{Sc} en el SNC (Bell & Ironside, 1993; Fraser, 1993).

Las EET afectan a multitud de especies de mamíferos, entre las que se incluye el ser humano, y según su origen pueden clasificarse como adquiridas (resultado de una infección por el agente causal), genéticas (por la existencia de mutaciones en el gen *PRNP*) o esporádicas (sin causa aparente conocida). Ejemplos de estos procesos son el scrapie en ovejas y cabras, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) en el ser humano, con sus formas esporádica (sCJD), variante (vCJD) y familiar (fCJD) (Imran & Mahmood, 2011a, 2011b). El scrapie de los pequeños ruminantes, que fue la primera EET descrita, es la enfermedad prototipo dentro de las enfermedades priónicas, y ha servido ampliamente como modelo para el estudio de éstas. En los años 80, se produjo la epidemia de EEB en ganado bovino, cuyo origen se asoció con la alimentación de bóvidos con harinas de carne y hueso de ovinos afectados por scrapie (Wilesmith *et al.*, 1988). Esto derivó en una de las mayores crisis alimentarias en Europa, principalmente tras la asociación de la aparición en la especie humana de la vCJD con el consumo de tejidos de bovinos infectados con EEB (Bruce *et al.*, 1997; Will *et al.*, 1996). Tal y como se ha comentado, aunque los signos clínicos pueden tardar en aparecer de meses a años, el curso de la enfermedad una vez éstos aparecen es rápido y conduce invariablemente a la muerte del individuo (Aguzzi & Polymenidou, 2004; Prusiner, 1998b). Tras la crisis mencionada, y dadas sus consecuencias fatales, se intensificaron las investigaciones en relación a las EET. Aun así, actualmente todavía se desconocen muchos aspectos de la patogenia de las enfermedades priónicas, los

métodos diagnósticos se basan en estudios *post-mortem*, y no existen ni vacunas ni tratamientos específicos que permitan prevenir o tratar estas enfermedades.

En relación a los mecanismos implicados en la patogenia de las EET y la neurodegeneración asociada a éstas, dos de los más estudiados han sido la apoptosis y la autofagia. La activación de vías pro-apoptóticas se ha identificado como una causa común de muerte neuronal en las EET y, aunque su papel sigue siendo controvertido, distintos estudios sugieren que parte de la muerte celular que se observa en las enfermedades priónicas se debe a mecanismos apoptóticos (Mays & Soto, 2016). Por otro lado, muchos estudios han identificado la activación y desregulación de los mecanismos autofágicos en las EET (Boellaard *et al.*, 1989; Liberski *et al.*, 2004; Llorens, Thüne, Sikorska, *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2014), y se ha implicado la alteración de la homeostasis de este sistema como una importante causa de toxicidad común a las enfermedades priónicas. Se considera que la activación de la autofagia se produce inicialmente como un mecanismo de defensa para aumentar la degradación priónica y conseguir la supervivencia celular, lo que indicaría que este proceso tuviera un papel fisiológico en etapas iniciales de enfermedad. Como se ha comentado, actualmente no existen tratamientos para combatir las EET. Dada la compleja patogenia de éstas, una de las estrategias en la investigación de posibles terapias consiste en reducir o paliar la neurodegeneración a través de distintas vías celulares implicadas en la patogenia de estas enfermedades. Por esto, en el primer estudio de esta tesis, se realiza un ensayo clínico con el fragmento C-terminal de la toxina tetánica (TTC). Considerando el impacto de la autofagia y la apoptosis en las enfermedades priónicas, y el potencial de la TTC como una molécula antiapoptótica y reguladora de la autofagia (previamente demostrado en otras enfermedades neurodegenerativas), en este estudio se evalúan los mecanismos apoptóticos y autofágicos en el sistema nervioso de modelos murinos inoculados con priones y tratados con TTC.

Además de en la búsqueda de posibles terapias, el foco de muchas de las investigaciones actuales en enfermedades neurodegenerativas está en la búsqueda de biomarcadores fiables. Estos biomarcadores deberían ser detectables en fluidos accesibles, como la sangre o el líquido cefalorraquídeo, y en estadios de enfermedad tempranos o preclínicos, ya que actualmente las enfermedades priónicas se

diagnostican en la etapa sintomática en la cual el daño neuronal ya es importante y el beneficio de los posibles tratamientos sería limitado. En la actualidad, los biomarcadores de rutina para el diagnóstico de las EET son las proteínas 14-3-3 y tau, considerados marcadores de daño neuronal, así como la PrP total, viéndose aumentados en el líquido cefalorraquídeo (LCR). El problema de estos biomarcadores es que, hasta el momento, sólo han demostrado ser fiables en individuos sintomáticos, normalmente en estadios avanzados de la enfermedad (Hermann *et al.*, 2021). La neurogranina (Ng) y el neurofilamento de cadena ligera (NfL) son proteínas que se expresan en el sistema nervioso central (SNC) y que se han visto aumentadas en estadios clínicos de algunas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Esclerosis Lateral Amiotrófica e incluso CJD. Sin embargo, no se conoce el papel que podrían tener estas proteínas como biomarcadores en casos preclínicos de EET (Blennow *et al.*, 2019; Gaetani *et al.*, 2019). El LCR y el SNC están directamente en contacto, y el primero refleja el estado bioquímico y fisiopatológico del último, por lo que podrían estudiarse biomarcadores potencialmente prometedores tanto en el tejido nervioso como en el líquido cefalorraquídeo. Dado que se considera que el daño sináptico y axonal es un evento patogénico temprano en las enfermedades priónicas, los biomarcadores que reflejan la disfunción temprana en estos niveles podrían ser valiosos para el diagnóstico preclínico. Por estas razones, en el segundo estudio de esta tesis, se evalúa la concentración de estos dos marcadores de daño sináptico y axonal, Ng y NfL, durante la fase preclínica de la enfermedad de scrapie en comparación con controles sanos y animales clínicos, tanto en SNC como en LCR.

Uno de los aspectos más controvertidos en el estudio de las EET es la existencia de “cepas” priónicas. Aunque estas enfermedades están provocadas por agentes sin ácidos nucleicos, se ha demostrado la existencia de distintas variantes del agente patógeno, a las que se denomina “cepas”. Las primeras pruebas experimentales de la existencia de cepas se obtuvieron a principios de los años 60, cuando tras la transmisión del mismo aislado de scrapie a cabras dio lugar a dos fenotipos clínicos perfectamente diferenciables (Pattison & Millson, 1961). Más adelante, las distintas investigaciones demostraron que la existencia de cepas priónicas radica en diferencias estructurales entre la proteína prion, que dan lugar a distintas conformaciones patológicas estables

que se propagan eficientemente (Bartz *et al.*, 2000; Peretz *et al.*, 2001). Además, se evidenció que las distintas cepas diferían en su capacidad para transmitirse y propagarse en las diferentes especies de mamíferos. Los bioensayos, que consisten en pases en serie de material infeccioso en animales (generalmente ratones), se han utilizado ampliamente en la investigación de las EET y en la caracterización de cepas priónicas (Fraser & Dickinson, 1968). A partir de los bioensayos realizados en modelos murinos mediante la inoculación experimental de priones, ha sido posible identificar y tipificar un gran número de diferentes cepas de priones de distintas EET (Bruce, 1993) y si bien son una herramienta eficaz para evaluar las características de cepa, implican elevados costes, no solo en recursos materiales y económicos, sino también en tiempo. Los diferentes bioensayos realizados para caracterizar las cepas priónicas han sugerido que los aislados priónicos naturales pueden estar formados por distintas “subcepas” de priones, que coexisten y se propagan juntas. Las características de cada cepa, junto con las diferentes subcepas contenidas en cada aislado, y su capacidad de transmisión a las diferentes especies estarían íntimamente relacionadas. Esto sugiere la necesidad de una evaluación de las propiedades de las cepas y las subcepas circulantes en los aislados de tembladera. Por lo tanto, ampliar el conocimiento y la caracterización de las cepas y subcepas priónicas son cruciales para evaluar el potencial de los priones para infectar distintas especies, así como para el control y la erradicación de las EET. Esto, unido al desarrollo de métodos que faciliten el estudio de las EET mediante la sustitución de los métodos tradicionales, es de vital importancia para el futuro de las investigaciones en enfermedades priónicas. Por ello, los estudios número tres y cuatro de esta tesis se centran en el estudio de las características de distintas cepas priónicas, así como en el análisis de técnicas que faciliten el estudio de la patogenia de estas enfermedades y del fenómeno de cepa.

El principal objetivo de esta tesis doctoral titulada “**Contribuciones al estudio de biomarcadores, terapia y fenómeno de cepas en las enfermedades priónicas**” es profundizar en el conocimiento de distintos factores tanto de la patogenia de las enfermedades priónicas como de los priones como agentes patógenos. Por un lado, se pretende evaluar el potencial de un agente terapéutico mediante el estudio de su influencia sobre distintas características de la patogenia de las enfermedades priónicas, como son la autofagia y la apoptosis. Por otro, se explora el potencial uso de algunas proteínas afectadas en el proceso de neurodegeneración como biomarcadores preclínicos. Comprender los mecanismos asociados a la neurodegeneración, así como explorar compuestos terapéuticos y mejorar la detección temprana, resulta fundamental para desarrollar una aproximación terapéutica a estos trastornos. En último lugar, se pretende profundizar en el conocimiento del fenómeno de cepas en las enfermedades priónicas tanto mediante técnicas *in vitro* como mediante bioensayo, así como desarrollar métodos que permitan facilitar el estudio de las enfermedades priónicas mediante la sustitución de los métodos tradicionales. Con este objetivo, se explora la utilidad de técnicas *in vitro* y del uso de proteína recombinante en las investigaciones en EETs.

Así, esta tesis está organizada en cuatro estudios cuyos objetivos se detallan a continuación.

Estudio Nº 1: Therapeutic Assay with the Non-toxic C-Terminal Fragment of Tetanus Toxin (TTC) in Transgenic Murine Models of Prion Disease (*published in Molecular Neurobiology*).

- Objetivo general: Identificar nuevas dianas terapéuticas y analizar distintos mediadores moleculares de neurodegeneración a partir del estudio de la actividad de un potencial agente terapéutico, el fragmento C-terminal de la toxina tetánica (TTC), que actúa como regulador de la autofagia y factor antiapoptótico.

- Objetivos específicos:
 - Realizar un ensayo clínico con el fragmento C-terminal no tóxico de la toxina tetánica (TTC) en dos líneas murinas. Inocular intracerebralmente dos grupos de ratones de la línea Tg338 y dos grupos de la línea C57BL6 con agente priónico procedente de ovinos con scrapie. Tratamiento mediante inyección intramuscular de TTC de uno de los grupos de cada línea, mientras que al otro se le administra PBS intramuscularmente, actuando como grupo control.
 - Definir y comparar estadísticamente los periodos de supervivencia de los ratones tratados con TTC frente a los no tratados, así como obtener un perfil lesional de los animales mediante el estudio histopatológico del encéfalo y su patrón de vacuolización y de depósito de PrP^{Sc} mediante la técnica de PET blot.
 - Estudiar el nivel de expresión proteica de distintos marcadores de autofagia (LC3b, p62), apoptosis (caspasa-3) y supervivencia neuronal (NeuN) en el encéfalo de los ratones mediante la técnica de inmunohistoquímica.
 - Evaluar mediante qPCR de la expresión génica de los siguientes marcadores de autofagia en el encéfalo de los animales: *LC3B*, *Fbxw7*, *Atg5*, *Gas5* y *Becn1*.

Estudio N°2: Neurogranin and Neurofilament Light Chain as Preclinical Biomarkers in Scrapie (*published in International Journal of Molecular Sciences*).

- Objetivo general: Estudiar la evolución de la neurogranina (Ng) y el neurofilamento de cadena ligera (NfL) en la neurodegeneración provocada por priones y determinar su utilidad como posibles biomarcadores preclínicos de enfermedad priónica en animales infectados naturalmente con scrapie.
- Objetivos específicos:
 - Selección de ovinos afectados por scrapie clásico en estadio clínico y preclínico, así como de ovinos controles no infectados. Recolección de muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) y de tejido nervioso de los grupos de ovinos previamente seleccionados.
 - Puesta a punto de la técnica de inmunohistoquímica para Ng y NfL en sistema nervioso central ovino. Estudiar la expresión proteica mediante la técnica de

inmunohistoquímica y la expresión génica mediante qPCR de estas dos proteínas en el encéfalo de los tres grupos previamente mencionados.

- Definir los patrones y la intensidad de la vacuolización y el depósito de PrP^{Sc} en los encéfalos de los animales estudiados. Estudiar la correlación del inmunomarcaje de Ng y NfL con estas alteraciones histopatológicas características de las EET en ovinos clínicos, preclínicos y controles.
- Determinar los niveles de Ng y NfL presentes en el LCR de los animales incluidos en el estudio mediante la técnica de ELISA.

Estudio N°3: Study of the dynamics of 21kDa associated scrapie strains upon serial passage of scrapie isolates in ovine PrP^C expressing mice.

- Objetivo general: Estudiar mediante *Protein Misfolding Cyclic Amplification* (PMCA) la presencia y cantidad de subcomponentes de 19kDa y 21kDa presentes en diferentes aislados de scrapie y evaluar su evolución durante la transmisión seriada de estos aislados en un bioensayo realizado previamente, así como verificar la utilidad de PMCA para discriminar estos subcomponentes y como método alternativo al bioensayo para la caracterización de cepas.
- Objetivos específicos:
 - Establecer, mediante el testeo de distintos sustratos, unas condiciones en las que la PMCA amplifique únicamente el subcomponente de 21kDa del scrapie clásico, y no el subcomponente de 19kDa, tanto en muestras de ratones como de ovinos infectados con scrapie.
 - Comprobar, mediante el método establecido en PMCA, la presencia y cantidad relativa de los subcomponentes 19kDa y 21kDa presentes en distintos aislados de scrapie (PS09, PS48 y PD377), utilizados como inóculos en un bioensayo realizado previamente con el fin de determinar si estos preexistían en los aislados o se ha dado una formación *de novo*.
 - Evaluar la evolución de estos subcomponentes durante la transmisión seriada de los aislados en bioensayo en las líneas murinas Tg338 y TgShpXI.

- Analizar comparativamente el sistema nervioso y linfoide de los ratones utilizados en el bioensayo para determinar diferencias en la selección y amplificación de estos subcomponentes en función del tejido.

Estudio N°4: Scrapie recombinant strains in bank vole PrP transgenic mice: assessment of infectivity and derived neuropathology in comparison with brain-derived scrapie mouse strains.

- Objetivo general: estudiar comparativamente las características de distintas cepas priónicas derivadas de mamíferos y sus homólogas recombinantes tras su bioensayo en el modelo TgVole, para determinar cómo varían sus características neuropatológicas tras propagarse *in vitro* sobre una proteína recombinante y posteriormente *in vivo*.
- Objetivos específicos:
 - Cría de una colonia de ratones TgVole, que expresan la PrP^C del *bank vole*, e inoculación de los mismos con las cepas de scrapie 263K, 22L, RML y ME-7, así como con sus homólogas recombinantes. Realizar dos pases seriados de cada una de las cepas.
 - Definir los periodos de supervivencia y características neuropatológicas de los animales, mediante el estudio histopatológico de las lesiones espongiiformes y el depósito de PrP^{Sc}.
 - Comprobar si las características neuropatológicas de las cepas inoculadas se mantienen tras ser propagadas *in vitro* en un sustrato recombinante con el fin de determinar cuales se asemejan más a sus homólogas derivadas de mamífero.

Revisión bibliográfica

1. Introducción

Las enfermedades priónicas son un conjunto de enfermedades neurodegenerativas transmisibles, con un largo periodo de incubación y cuyo curso es invariablemente fatal. Estas enfermedades afectan a diversas especies, entre las que se incluye el ser humano. Están producidas por la conversión post-traducciona l de la proteína prion celular (PrP^C), glicoproteína presente de forma fisiológica en los mamíferos y codificada por el gen *PRNP*, en su isoforma anómala denominada PrP^{Sc} . Tras este cambio conformacional, la PrP^{Sc} adquiere una resistencia parcial a la digestión con proteasas, insolubilidad en detergentes no iónicos y gran resistencia a los procesos de esterilización tanto físicos como químicos, así como tendencia a formar agregados (Prusiner, 1982, 1998a). En animales, ejemplos de estos procesos son el scrapie en ovejas y cabras, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), y la enfermedad crónica caquetizante (ECC) en cérvidos, entre otros. En la especie humana podemos encontrar la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), con sus formas esporádica (sCJD), iatrogénica (iCJD), y familiar (fCJD); la variante de la CJD (vCJD); el insomnio familiar fatal (IFF); el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), la prionopatía variable sensible a la proteasa (VPSPr) y el kuru (Imran & Mahmood, 2011a, 2011b).

Estos procesos también son conocidos como encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), ya que la principal característica neuropatológica que presentan es la vacuolización, o degeneración espongiforme, del sistema nervioso central (SNC), que se puede observar con la aparición de vacuolas tanto intraneuronales (vacuolización) como en el neuropilo (espongiosis). Además, otros hallazgos neuropatológicos comunes a estos procesos son la gliosis, la pérdida neuronal y el depósito de PrP^{Sc} en el SNC (Bell & Ironside, 1993; Fraser, 1993). Estas lesiones dan lugar a manifestaciones clínicas de signos neurodegenerativos en el hospedador entre los que se incluyen alteraciones comportamentales y ataxia motora. El período de incubación es largo, y los signos clínicos pueden tardar en aparecer de meses a años, aunque una vez parecen el curso es rápido y conduce invariablemente a la muerte del individuo (Aguzzi & Polymenidou, 2004; Prusiner, 1998b).

Según su origen, las enfermedades priónicas pueden clasificarse como adquiridas, genéticas o esporádicas. Las adquiridas son aquellas que aparecen como resultado de una infección por el agente causal, la proteína prion, tras la exposición del individuo a ésta. Las genéticas o familiares son las que se producen por la existencia de mutaciones en el gen *PRNP*, que dan lugar a formas anormales de la proteína prion, que tienen una mayor predisposición a sufrir cambios conformacionales patológicos. Por último, las esporádicas o espontáneas son las que no tienen una causa aparente conocida. La mayoría de las EET animales son de naturaleza infecciosa, es decir, adquiridas. En la especie humana, sin embargo, las más frecuentes son las esporádicas, que representan cerca de un 85% de los casos diagnosticados (Ladogana *et al.*, 2005).

Las enfermedades priónicas comparten similitudes con otros procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (AD), la enfermedad de Parkinson (PD), la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS) o la Enfermedad de Huntington (HD), que también se producen por la acumulación de agregados proteicos en el SNC, y por lo tanto se engloban bajo el concepto de proteinopatías (Soto, 2003). La proteína prion y aquellas causantes de las enfermedades mencionadas comparten características en cuanto a su propagación, pero pese a que algunas de estas proteínas patológicas resultan infectivas bajo condiciones experimentales, se debe destacar la capacidad de la proteína prion no sólo para replicar su conformación si no especialmente para transmitirse entre individuos bajo condiciones naturales (Frost & Diamond, 2010).

El scrapie de los pequeños rumiantes es la enfermedad prototipo dentro de las EET, y la que ha servido como modelo para el estudio de las enfermedades priónicas. Ésta fue la primera en ser descrita, ya en el siglo XVII (Poser, 2002) y su transmisibilidad fue demostrada en 1936 por Cuillé y Chelle. En los años 80, a partir de la epidemia de la EEB en ganado bovino (Wells *et al.*, 1987), cuyo origen se asoció con la alimentación de bóvidos con harinas de carne y hueso de ovinos enfermos de scrapie (Wilesmith *et al.*, 1988), se observó que el número de especies susceptibles al desarrollo de una EET de forma natural era mayor de lo que se consideraba. Este hecho supuso una de las mayores crisis alimentarias de la historia, sobre todo tras la aparición en la especie humana de la vCJD, cuyo origen se asoció al consumo de tejidos de bovinos infectados con EEB (Bruce *et al.*, 1997; Will *et al.*, 1996).

Tras la crisis mencionada y la evidencia de que la capacidad de transmisión de los agentes priónicos era mayor de lo que se conocía, quedó patente la necesidad de elucidar los mecanismos que regulan la transmisibilidad de las enfermedades priónicas, lo cual intensificó la investigación en relación a las EET. Aun así, hoy en día aún se desconocen muchos aspectos de la patogenia de las EET, los métodos diagnósticos se basan en estudios *post-mortem*, y no existen ni vacunas ni tratamientos específicos que nos permitan prevenir o tratar estas enfermedades.

2. Etiología

Las EET están producidas por un agente no convencional denominado prion. Tal y como se ha mencionado, el principal evento patogénico que se da en éstas es la conversión de la proteína fisiológica PrP^C en su isoforma anómala denominada PrP^{Sc} o prion. Los priones tienen capacidad de autorreplicación provocando el cambio de conformación de la PrP^C cercana al transmitir su conformación aberrante (Prusiner, 1998b). Aclarar la naturaleza del agente causante de las EET requirió años de investigación y debate, puesto que el hecho de que un patógeno pudiera estar compuesto exclusiva o predominantemente por proteína, careciendo de ácidos nucleicos, parecía contradecir los principios básicos de la biología molecular.

En 1936, Cuillé y Chelle consiguieron transmitir el scrapie experimentalmente entre ovinos, confirmando además el largo período de incubación de esta enfermedad (Liberski, 2012). Tras este hecho, comenzaron los estudios para elucidar la etiología de la enfermedad, y el scrapie pasó a ser el prototipo de las EET. En un principio, y debido principalmente a sus largos períodos de incubación, se postuló que las enfermedades priónicas podían estar causadas por lentivirus (Wilson *et al.*, 1950). Sin embargo, pronto se evidenció que el agente etiológico de las EET, al contrario que los lentivirus, no provocaba respuesta inmune en el individuo y resistía a gran parte de los tratamientos físicos y químicos destinados a inactivarlo. Además, el desarrollo de modelos experimentales más adecuados al conseguir transmitir el scrapie a ratones, ratas y hámsteres (Chandler, 1961; Zlotnik & Rennie, 1965), permitió un gran avance en las investigaciones respecto a la etiología de las enfermedades priónicas. En este contexto,

Alper y colaboradores descubrieron que el tamaño del agente infeccioso del scrapie era extremadamente pequeño y que, además, no podía ser inactivado por radiaciones ultravioletas (Alper *et al.*, 1967; Alper *et al.*, 1966), características que sugerían que no contenía ácidos nucleicos. Así, en 1967 se propuso la teoría de la “sólo proteína”, que sostenía que el agente de las EET era de naturaleza proteica y se multiplicaba sin necesidad de material genético (Griffith, 1967). A estas evidencias se unió la demostración de que el agente era resistente a las nucleasas (Prusiner *et al.*, 1980), que era estable en detergentes no iónicos, que presentaba mayoritariamente carga negativa y que era inactivado con proteinasa K y tripsina (enzimas proteolíticas) y también mediante otros desnaturalizantes de proteínas como el SDS, el fenol o el tiocianato de guanidinio (Prusiner *et al.*, 1982; Prusiner *et al.*, 1981). Con todo esto, y basándose en la propuesta de Griffith, Stanley B. Prusiner acuñó en 1982 el término “prion” (*proteinaceous infectious particle*) para referirse al agente causante de las EET y diferenciarlo de otros patógenos, definiéndolo como una partícula infecciosa sin ácidos nucleicos, principal o exclusivamente de naturaleza proteica y con capacidad de infectar y replicarse en el organismo de los mamíferos.

No obstante, la teoría de que un agente patógeno careciera de ácidos nucleicos contradecía el principio de la biología molecular que afirmaba que el material genético (RNA y/o DNA) era necesario para que un agente patógeno pudiera transmitir información y replicarse, por lo que esta hipótesis fue en un inicio rechazada por muchos investigadores. Además, el hecho de que el agente fuera de naturaleza proteica no era capaz de explicar la existencia de “cepas”, es decir, la variabilidad fenotípica que presentaban los distintos aislados de scrapie, ya que se consideraba que este hecho estaba vinculado a la presencia de ácidos nucleicos y a los polimorfismos que éstos presentaban. Por esta razón se formularon otras teorías tratando de explicar la etiología de las enfermedades priónicas. Una de estas teorías es la del virino (Kimberlin, 1982), en la cual se sostiene que el agente causal es una molécula resultante de la unión de un ácido nucleico infeccioso no codificante y una proteína codificada por el hospedador. También se propusieron las hipótesis de que el agente causal es DNA mitocondrial envuelto por proteínas (Aiken *et al.*, 1989) o simplemente un virus aún no descrito (Diringer, 1992).

A pesar del desarrollo de estas teorías, numerosas evidencias posteriores, como el hecho de que los priones recombinantes o generados *in vitro* puedan producir enfermedad por sí solos (Castilla, Saá, *et al.*, 2005; Colby *et al.*, 2009) o de que la PrP^{Sc} pueda provocar el cambio de conformación de la PrP^C en medios acelulares (Saá *et al.*, 2006), hacen que la teoría de que el agente etiológico de las EET está compuesto únicamente por proteína sea la única aceptada en la actualidad.

2.1. La proteína prion celular (PrP^C) y el gen *PRNP*

La proteína prion celular, o PrP^C es una glicoproteína localizada en la membrana celular. Se expresa principalmente en el SNC, fundamentalmente en las neuronas y células gliales del encéfalo y la médula espinal (Adle-Biassette *et al.*, 2006; Chesebro *et al.*, 1985). Además, también tiene niveles elevados de expresión en el sistema nervioso periférico (PNS), encontrándose en axones sensitivos y motores (Manson *et al.*, 1992), células de Schwann (Follet *et al.*, 2002) y ganglios nerviosos de la médula espinal (Ganley *et al.*, 2015). Si bien el sistema nervioso es donde se encuentra en mayores niveles, la PrP^C se expresa en la mayoría de las células (Moser *et al.*, 1995), especialmente en el sistema linforreticular (LRS), donde aparece principalmente en linfocitos y células dendríticas foliculares (Aguzzi & Heikenwalder, 2006).

La PrP^C está codificada por el gen *PRNP*, cuya secuencia se ha identificado en numerosas especies y se encuentra altamente conservada entre los vertebrados. Este gen se localiza en el cromosoma 20 del ser humano, en el cromosoma 13 de los ruminantes y en el cromosoma 2 en el caso del ratón (Sparkes *et al.*, 1986). En la mayoría de las especies este gen está formado por dos exones, de los cuales sólo se traduce el exón 2, pero en algunas especies como la oveja, la rata o el ratón, el gen *PRNP* posee tres exones (Westaway *et al.*, 1994). Aun así, en las especies conocidas, este gen solo posee un marco de lectura abierto (ORF), que está contenido en un solo exón, y no se han identificado fenómenos de *splicing* que puedan ocurrir durante el procesamiento de RNA mensajero (Westaway *et al.*, 1991).

La biosíntesis de esta proteína comienza tras la transcripción del gen *PRNP* y la maduración del mRNA correspondiente. Tras esto, la traducción del mRNA tiene lugar en los ribosomas de la cara citosólica del retículo endoplasmático rugoso (RER), dando

lugar a un péptido señal de 22 aminoácidos que será trasladado al interior del RER mediante traslocasas, donde continuará la síntesis dando lugar a una proteína de 253 o 254 aminoácidos según la especie (Cohen, 1999; Lochter *et al.*, 1986). El procesamiento de la proteína comienza previo a la finalización de la traducción, e incluye la formación de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína 179 y 214 (Turk *et al.*, 1988), la eliminación del péptido señal del extremo N-terminal (Caughey *et al.*, 1989), la glicosilación del residuo S232 y la posible glicosilación de dos residuos de asparagina (N181 y/o N197 en la PrP^C humana) (Haraguchi *et al.*, 1989). La adición o no de glicanos a estos dos residuos de asparagina dará lugar a las distintas glicofomas conocidas de la PrP^C (no glicosilada, monoglicosilada y diglicosilada) cuya proporción relativa dependerá de la especie, el tejido o incluso la región encefálica (Beringue *et al.*, 2003; Caughey *et al.*, 1989).

Una vez finalizada la síntesis, se elimina la secuencia hidrofóbica del extremo C-terminal (de unos 22-23 aminoácidos) y se añade a este extremo el anclaje glicosilfosfatidil-inositol (GPI), que anclará la proteína a la membrana celular (Stahl *et al.*, 1987). Después, la PrP^C se transportará a través del aparato de Golgi, donde se le incorporarán residuos ácidos, hasta la membrana celular, en la cual se situará principalmente en las balsas lipídicas (Vey *et al.*, 1996). La PrP^C también se detecta en el citosol, y se considera que transita de forma continua entre la superficie de la célula y los compartimentos intracelulares mediante endosomas (Mays & Soto, 2016; Peters *et al.*, 2003).

A partir de los distintos estudios estructurales y bioquímicos sobre la estructura de la PrP^C, investigada en profundidad principalmente mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (Riek *et al.*, 1997), se conoce que esta proteína cuenta con distintas regiones bien diferenciadas. En primer lugar, cuenta con una zona no estructurada y flexible en su extremo amino-terminal (N-terminal), que se caracteriza por contener una zona en la que se encuentran un número variable de repeticiones del octapéptido PHGGGWGQ (Zahn, 2003). En el extremo carboxi-terminal (C-terminal), la proteína cuenta con un dominio globular estructurado compuesto por tres hélices α y dos láminas β antiparalelas de cuatro aminoácidos cada una. Este dominio está estabilizado por un puente disulfuro entre los residuos de cisteína (C179 y C214) y contiene los dos sitios susceptibles de glicosilarse (N181 y N197) así como el anclaje GPI, que se localiza en el

aminoácido S231 en la mayoría de los mamíferos (Haraguchi *et al.*, 1989; Stahl *et al.*, 1987; Turk *et al.*, 1988). Entre estos dos dominios, concretamente entre los residuos 112-145, la PrP^C cuenta con una región hidrofóbica cuya secuencia se encuentra altamente conservada entre especies (Figura 1).

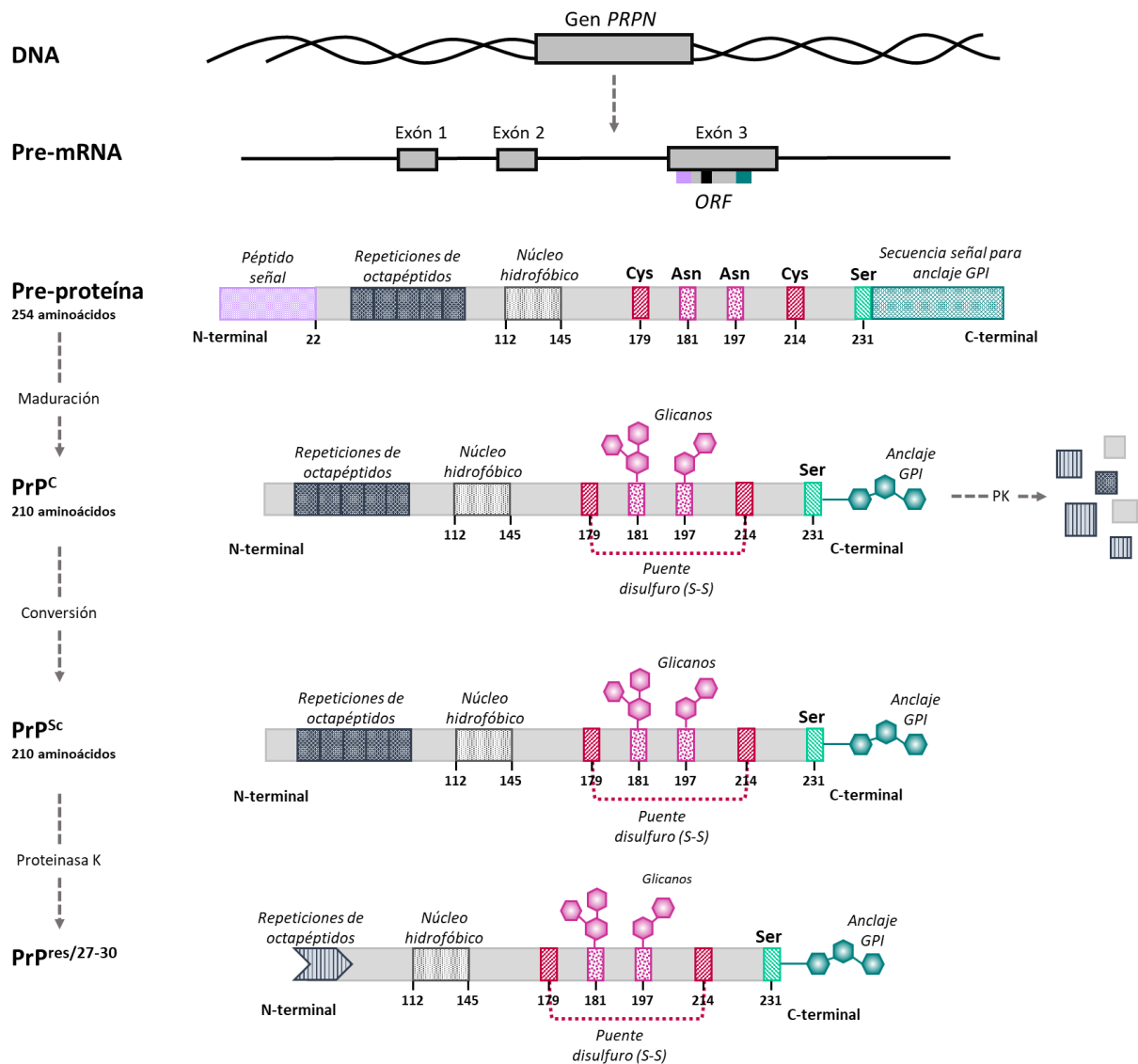


Figura 1. Síntesis y estructura primaria de la PrP^C. Adaptación de (Benvegnù *et al.*, 2009; Liberski *et al.*, 2008).

Si bien la localización y la estructura de la PrP^C han sido ampliamente caracterizadas, las funciones fisiológicas de la PrP^C no se conocen todavía con exactitud. Se conoce que la PrP^C participa en la proliferación y diferenciación celular,

principalmente en la neurogénesis, neuritogénesis, sinaptogénesis, desarrollo axonal, neurotransmisión y mantenimiento de la sustancia blanca (Aguzzi *et al.*, 2008). Otra de las funciones más estudiadas de la proteína es el papel protector que presenta en la regulación de la muerte y supervivencia celular. Se ha observado que la PrP^C protege de la apoptosis dependiente de la vía mitocondrial (Kim *et al.*, 2004; Kuwahara *et al.*, 1999), y que inhibe específicamente a la proteína Bax (*Bcl-2 associated X*) (Roucou *et al.*, 2004), desencadenante de esta vía apoptótica. Además, se ha asociado la expresión de esta proteína con un menor daño por estrés oxidativo tras la exposición a toxinas en cultivos celulares (Anantharam *et al.*, 2008; Dupiereux *et al.*, 2008). También ha sido relacionada con la regulación de mecanismos protectores como la autofagia (Shin *et al.*, 2013) o con la respuesta frente al estrés del retículo endoplasmático (ER) que tiene como consecuencia la inhibición de la síntesis proteica y la degradación de proteínas asociadas al RE (Castle & Gill, 2017).

Además de estas, se han descrito otras funciones relacionadas con la PrP^C, entre las que se encuentran la participación en la respuesta inmune mediante la activación de monocitos y linfocitos (Castle & Gill, 2017), la regulación del sueño y los ciclos circadianos (Tobler *et al.*, 1996), la regulación del metabolismo del cobre a través de la unión de esta molécula a la zona de repetición de octapéptidos (Brown *et al.*, 1997), la modulación de los niveles de otras proteínas como β -amiloide y tau (Castle & Gill, 2017) y la participación en vías de señalización intracelular y en la excitabilidad neuronal (Zomosa-Signoret *et al.*, 2008).

Pese a todas estas funciones descritas para la PrP^C, la expresión de esta proteína no es crítica ni necesaria para el desarrollo o la supervivencia de los individuos. Se han generado líneas de ratones *knock-out* para el gen *PRNP*, que se han desarrollado de manera normal (Manson *et al.*, 1994) presentando únicamente una serie de anomalías sutiles (Collinge *et al.*, 1994; Nishida *et al.*, 1999; Tobler *et al.*, 1996) cuya base molecular no está definida. Lo que se ha observado en estos animales es que son resistentes a la inoculación con priones (Sailer, 1994), por lo que se ha determinado que la PrP^C es necesaria para el desarrollo de una enfermedad priónica, ya que la sola presencia de PrP^{Sc} no provoca enfermedad y la expresión la PrP^C se requiere para que se produzca neurodegeneración (Brandner *et al.*, 1996). Además, el nivel de expresión de PrP^C en el

encéfalo influye en el período de incubación de las EET, siendo este menor cuanto mayor es el nivel de expresión de la proteína (Bueler *et al.*, 1994).

2.2. La proteína prion patológica (PrP^{Sc})

La proteína prion patológica, o PrP^{Sc}, es una isoforma anómala de la PrP^C. Ambas proteínas comparten la misma secuencia aminoacídica, pero difieren en su estructura tridimensional (Prusiner *et al.*, 1990). La estructura de la PrP^C, tal y como se ha comentado, ha sido ampliamente descrita (Riek *et al.*, 1997). Sin embargo, y pese a que describir la conformación secundaria de la PrP^{Sc} podría resultar un factor clave que ayudaría a conocer los mecanismos moleculares que intervienen en la diseminación priónica, la estructura la PrP^{Sc} no ha podido ser descrita por completo. Esto se debe a la insolubilidad de la PrP^{Sc}, que se manifiesta como una mezcla de polímeros debido a su tendencia de a formar agregados, impidiendo el uso de las técnicas biofísicas de alta definición que se utilizan para el estudio de la estructura tridimensional de las proteínas, como la cristalografía de rayos X o la RMN (Silveira *et al.*, 2005; Tixador *et al.*, 2010).

Por lo tanto, numerosos modelos que pretenden describir la estructura de la PrP^{Sc} se han obtenido utilizando técnicas de baja resolución como la espectrometría de infrarrojos transformados de Fourier (FTIR) o el dicroísmo circular (Riek *et al.*, 1997) y predicciones teóricas a partir de modelos moleculares (Diaz-Espinoza & Soto, 2012; Requena & Wille, 2014). En un principio, y basándose en la utilización de técnicas espectroscópicas se propuso que tras el proceso de conversión de la PrP^C, la región C-terminal conservaba la conformación de hélice α , mientras que gran parte de los cambios estructurales se producían en la región N-terminal de la proteína, que adoptaba una conformación de lámina β , dando lugar a que la PrP^{Sc} estuviera compuesta en un 30% por hélices α y un 43% de láminas plegadas β (Pan *et al.*, 1993). Los dos modelos que existen actualmente para describir la estructura de la PrP^{Sc} son el modelo de β -solenoides de cuatro escalones (*4-rung β -solenoid*), el cual describe la estructura de la proteína a través del uso de criomicroscopía electrónica (Vazquez-Fernandez *et al.*, 2016), y el modelo PIRIBS (*parallel in-register intermolecular beta-sheet*), que se basa en el estudio de PrP^{Sc} recombinante mediante RMN (Grovesman *et al.*, 2014) (Figura 2). Estos modelos proponen distintas disposiciones para las láminas β dentro de cada

monómero de la PrP^{Sc} y también difieren en cómo cada uno de estos monómeros se posiciona en las fibras de amiloide e interacciona con sus adyacentes. Aunque estos modelos proponen distintas conformaciones estructurales, ambos, así como estudios previos (Smirnovas *et al.*, 2011), sostienen que la molécula está compuesta únicamente por lámina β , y que no existen en ella hélices de tipo α . Pese a que, tal y como se ha indicado, estos modelos se fundamentan principalmente en predicciones teóricas basadas en modelos moleculares, recientemente se han publicado estudios (Hoyt *et al.*, 2022; Kraus *et al.*, 2021; Manka *et al.*, 2022) en el que se muestran fotografías de distintas cepas de PrP^{Sc} realizadas mediante criomicroscopía electrónica que respaldarían mediante evidencia empírica la propuesta del modelo PIRIBS.

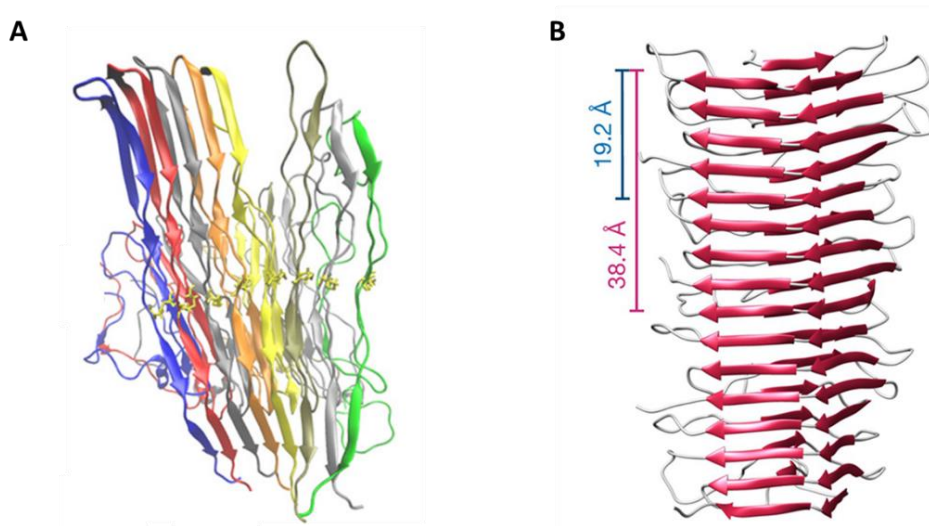


Figura 2. Estructura secundaria de la PrP^C y PrP^{Sc}. A) Modelo PIRIBS (*parallel in-register intermolecular beta-sheet*), en el cual cada monómero de PrP^{Sc} es un piso de la fibra amiloidea y B) Modelo de β -solenoides de cuatro escalones (*4-rung β -solenoid*), en el cual cada monómero de PrP^{Sc} forma cuatro pisos de la fibra de amiloide. Adaptación de (Groverman *et al.*, 2014; Spagnolli *et al.*, 2019).

Aunque la estructura de la PrP^{Sc} no esté todavía bien definida, lo que sí se conocen son las consecuencias que tiene la modificación estructural que sufre en sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Tras sufrir el malplegamiento, la PrP^{Sc} adquiere una gran tendencia a formar agregados y fibras amiloideas (varillas priónicas (Prusiner

et al., 1982) o *scrapie-associated fibrils* (SAF) (Merz *et al.*, 1981)). Debido a esto, la PrP^{Sc} adquiere las propiedades características que la diferencian de la PrP^C, pasando a ser insoluble en detergentes no iónicos y adquiriendo resistencia a la mayor parte de agentes químicos, el calor y las radiaciones ionizantes y ultravioletas (Caughey & Chesebro, 2001; Prusiner, 1998b). Además, la PrP^{Sc} adquiere también una resistencia parcial a la digestión con proteinasa K (PK). Tras su digestión con esta enzima, un fragmento N-terminal de unos 90 aminoácidos se degrada, obteniéndose un producto de escisión proteolítica C-terminal denominado PrP^{res} o PrP²⁷⁻³⁰ que retiene la infectividad y puede utilizarse para el diagnóstico de enfermedad y la caracterización de cepas priónicas (Bolton *et al.*, 1982; Gielbert *et al.*, 2009).

2.3. El proceso de conversión

Independientemente del origen de la enfermedad priónica y de la estructura terciaria y cuaternaria de la PrP^{Sc}, el evento principal en la patogenia de estas enfermedades es, tal y como se ha comentado con anterioridad, la conversión de la PrP^C en PrP^{Sc}. Además, como también se ha comentado, los ratones *knock-out* para el gen *PRNP*, que no expresan PrP^C, no desarrollan enfermedad priónica, es decir, que la sola presencia de PrP^{Sc} no provoca enfermedad y el desarrollo de ésta depende del fenómeno de conversión (Brandner *et al.*, 1996; Sailer, 1994).

En un principio, se señaló que la conversión de la PrP^C tenía lugar al formarse un complejo PrP^C-PrP^{Sc} (Oesch *et al.*, 1990; Prusiner *et al.*, 1990), y que la homología entre las secuencias de ambas isoformas facilitaría el proceso de conversión, lo cual justificaría el fenómeno de las barreras de transmisión (Horiuchi *et al.*, 2000). Sin embargo, no se conocen con exactitud los procesos que estarían implicados en este proceso (Aguzzi & Calella, 2009). Así, dentro de estas teorías, se han propuesto dos modelos que intentan explicar la propagación de la PrP^{Sc} (Figura 3):

- Modelo de plegamiento asistido por molde ("*template-directed refolding*"): este modelo de conversión propuesto por Prusiner (Cohen & Prusiner, 1998) considera que la PrP^{Sc} actúa como un molde que desencadena el cambio conformacional de la PrP^C. La conversión espontánea de la PrP^C estaría impedida

por una barrera energética. En este proceso existiría un paso crítico, la formación de un factor intermediario, un heterodímero que resultaría de la unión entre la PrP^{Sc} y un estado conformacional alternativo de la PrP^C (denominado PrP^{*}). Este heterodímero PrP^{Sc}-PrP^{*}, se convertiría después en un homodímero PrP^{Sc}-PrP^{Sc}. En este modelo, la formación de la PrP^{*} se explicaría a través de la unión de la PrP^C a un factor denominado “proteína X”, que actualmente aún se encuentra sin identificar. Tras la conversión, las moléculas de PrP^{Sc} continuarían replicándose de forma exponencial siempre que existiera PrP^C. Por último, se formarían los agregados y fibrillas de amiloide de moléculas de PrP^{Sc}. Estos agregados no serían esenciales para la replicación, sino simplemente una consecuencia de la patogenia de estas enfermedades, al contrario de lo que sugiere el otro modelo de replicación de la PrP^{Sc} (Prusiner, 1991). Esta hipótesis sostiene que las EET adquiridas ocurrirían por la entrada de moléculas de PrP^{Sc} al organismo que desencadenarían el proceso explicado; que las formas esporádicas se darían por mutaciones somáticas o eventos aleatorios de formación y conversión de dímeros PrP^{*}-PrP^{*}; y que las formas genéticas de enfermedad priónica tendrían lugar al haber una desestabilización de la mutación que incrementaría la concentración del PrP^{*} o afectaría a su estabilidad.

- Modelo de nucleación sembrada o de nucleación-polimerización (“*seeded nucleation*”): según este modelo, en condiciones fisiológicas la PrP^C y la PrP^{Sc} se encontrarían bajo un equilibrio termodinámico desplazado hacia la PrP^C. La PrP^{Sc} sería altamente inestable en estado monomérico, por lo cual varias moléculas de esta isoforma se unirían para formar un núcleo o semilla. A esta semilla se le irían uniendo progresivamente más moléculas de PrP^{Sc}, formando finalmente agregados amiloides. Después se produciría la fragmentación de estos agregados, que actuarían como nuevas semillas reclutando nuevas moléculas de PrP^{Sc} y produciendo la conversión de las moléculas de PrP^C, lo cual supondría la replicación del prion y le conferiría su capacidad infecciosa (Glatzel & Aguzzi, 2001). En esta hipótesis, las EET adquiridas se darían a partir de agregados de PrP^{Sc} que actuarían como semilla al entrar al organismo iniciando el proceso de

polimerización; las de tipo esporádico tendrían su origen en la formación de núcleos de forma lenta y poco frecuente; y en las genéticas este proceso se vería acelerado por la presencia de mutaciones. Distintas evidencias respaldan este modelo, ya que ha sido demostrado que al incubar PrP^C con PrP^{res} de animales infectados se obtiene PrP^{Sc} (Horiuchi & Caughey, 1999). Otros estudios indican que la conversión se iniciaría de forma más efectiva a partir de oligómeros de tamaño pequeño (Silveira *et al.*, 2005) y que los agregados amiloides de gran tamaño posiblemente sean resultado de un mecanismo de defensa activado con el fin de secuestrar agregados más pequeños para que resulten más inocuos (Collinge & Clarke, 2007).

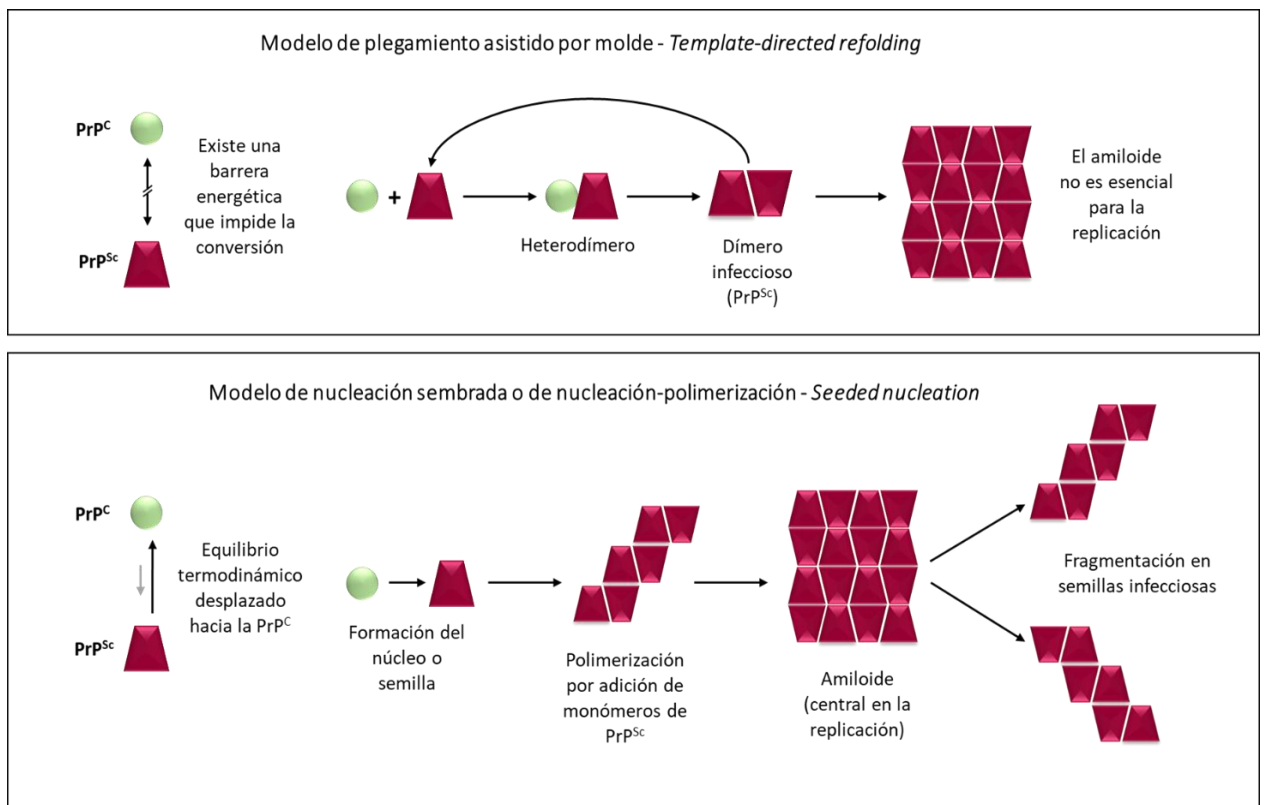


Figura 3. Modelos propuestos de propagación de la PrP^{Sc}. Adaptado de (Aguzzi & Calella, 2009).

3. Transmisibilidad y cepas priónicas

Pese a que la aparición de la hipótesis de la proteína única resultó un gran avance en la investigación de las enfermedades priónicas también supuso la aparición de nuevas incógnitas a resolver, especialmente a la hora de explicar la existencia de cepas priónicas y la transmisibilidad de estas enfermedades entre especies.

Tal y como se ha comentado, el scrapie clásico fue la primera enfermedad priónica que se conoció, siendo su primera descripción en Inglaterra en el siglo XVIII. Después, en 1936, se demostró su transmisibilidad por primera vez mediante inoculación experimental (Cuille & Chelle, 1936). En 1998 se dieron en Noruega los primeros casos descritos de scrapie atípico (Benestad *et al.*, 2003), que se diferenciaba de la forma clásica por su clínica, sus características bioquímicas e histopatológicas, y su epidemiología aun presentando una incidencia similar al scrapie clásico y estando igualmente distribuido mundialmente. A partir de la descripción del scrapie, se identificaron otras enfermedades priónicas animales, aumentando el número de especies conocidas susceptibles a las EET. La encefalopatía transmisible del visón (TME) (Barlow, 1972), se describió por primera vez en 1947, y la CWD, fue identificada en ciervos en 1967 y diagnosticada como una EET en 1978 (Williams & Young, 1980).

En los años 80 se identificó la EEB en Reino Unido (Wells *et al.*, 1987), la cual se relacionó con la alimentación del ganado bovino con harinas de carne y hueso infectadas con scrapie (Wilesmith *et al.*, 1988). Tras la aparición en la especie humana de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD), que se asoció con el consumo de productos de origen vacuno contaminados con EEB (Bruce *et al.*, 1997; Will *et al.*, 1996), la transmisibilidad de las enfermedades priónicas se convirtió en motivo de preocupación pública. Con tal de prevenir y controlar la EEB, se instauraron medidas por parte de la Comisión Europea que incluían una intensa vigilancia activa. Esto, unido a la mejora de los métodos diagnósticos, permitió la identificación de numerosas formas nuevas de enfermedad priónica. Alrededor del año 2000 se describieron las formas atípicas de la EEB, la EEB-L y la EEB-H (Biacabe *et al.*, 2004; Casalone *et al.*, 2004; Ducrot *et al.*, 2008), diferenciándose de la EEB clásica (EEB-C) en la distribución de las lesiones encefálicas y la epidemiología. También se identificaron formas similares a la EEB en

distintas especies de ungulados salvajes (Kirkwood & Cunningham, 1994; Sigurdson & Miller, 2003), primates no humanos (Bons *et al.*, 1999), felinos (Leggett *et al.*, 1990) y recientemente en camélidos (Babelhadj *et al.*, 2018). Además, en pequeños rumiantes, concretamente en cabras, se describieron casos naturales de EEB (Eloit *et al.*, 2005; Spiropoulos *et al.*, 2011). Asimismo, se comprobó la resistencia de algunas especies a la infección priónica natural, ya que la EEB no pudo ser detectada en cerdos pese a su exposición al agente infeccioso (Chianini *et al.*, 2013). La fuerte resistencia de determinadas especies a estas enfermedades ya se había notificado tras estudios experimentales en conejos (Barlow & Rennie, 1976), y utilizando la PrP de los équidos (Khan *et al.*, 2010) y los cánidos (Polymenidou *et al.*, 2008).

Para comprender los mecanismos implicados en la transmisibilidad de las enfermedades priónicas y en la susceptibilidad o resistencia a éstas de las distintas especies se han llevado a cabo numerosos estudios con infecciones experimentales (Chianini *et al.*, 2013). Estas investigaciones han permitido conocer la susceptibilidad a las enfermedades priónicas de un amplio rango de especies, así como distintos aspectos clínicos y neuropatológicos de éstas. Para realizar estos estudios se han utilizado diversas especies como modelo experimental. De entre estas, el ratón siempre ha destacado no sólo por su facilidad de manejo sino también por su sensibilidad a las enfermedades priónicas y los cortos períodos de incubación que presentan ante éstas. Además, el desarrollo de modelos murinos transgénicos que expresaban la PrP^C de otras especies animales permitió dar un gran salto en la investigación de la transmisibilidad de las EET. Estos modelos transgénicos permiten eliminar las barreras de transmisión, facilitando la infección y acortando los tiempos de incubación.

Los primeros modelos de ratón transgénico que se diseñaron para la investigación de las EET expresaban transgenes de hámster, especie que había sido anteriormente un modelo experimental fundamental para comprender los mecanismos de diseminación del prion (Kimberlin & Walker, 1986). La creación de estos modelos fue fundamental para el desarrollo y la comprensión del concepto de barrera de transmisión, puesto que permitió determinar la importancia del gen *PRNP* en la susceptibilidad de las especies a las EET (Scott *et al.*, 1989). Posteriormente, el desarrollo de líneas murinas *knock-out* para el gen *PRNP* (Bueler *et al.*, 1992) supuso uno de los

mayores avances en estos estudios. Además de demostrarse, como ya se ha comentado, que la expresión de la PrP^C es fundamental para la propagación del prion en el individuo y el desarrollo de enfermedad priónica (Sailer, 1994), estas líneas fueron la base para la creación de otras que expresaran distintos transgenes sin interferir con la PrP^C del hospedador (Brandner & Jaunmuktane, 2017). Uno de los modelos más interesantes que se ha utilizado para el estudio de las EET es el topillo rojo (*Myodes glareolus*) o *bank vole*. Este roedor cuenta con un polimorfismo en el codón 109 del gen *PRNP* que puede codificar isoleucina (I) o metionina (M). Este polimorfismo se considera un factor clave en la amplia susceptibilidad de esta especie a las enfermedades priónicas (Watts *et al.*, 2012). Se ha demostrado la vulnerabilidad de esta especie a un amplio abanico de enfermedades priónicas, como por ejemplo a cepas de scrapie no transmisibles a otros modelos murinos transgénicos (Di Bari *et al.*, 2008) o a la inoculación con numerosas cepas de GSS, una enfermedad que se consideraba poco o nada transmisible (Pirisinu *et al.*, 2016). Debido a esto, actualmente el *bank vole* está considerado el "el receptor universal del prion" (Watts *et al.*, 2014).

3.1. La barrera de transmisión

La capacidad de transmisión de las enfermedades priónicas se conoce desde que Cuillé y Chelle, en los años 30 del siglo XIX, infectaron experimentalmente a ovejas con scrapie a partir de tejido nervioso de otros ovinos afectados con esta enfermedad (Liberski, 2012). Más tarde se comprobó también que se podía infectar de la misma manera a individuos de otras especies, como ratones, ratas o hámsteres (Chandler, 1961; Chandler & Fisher, 1963; Zlotnik & Rennie, 1963). Tras los distintos estudios de transmisión intra e interespecie que se han llevado a cabo, se ha podido comprobar que la propagación de priones entre individuos de una misma especie suele resultar un proceso eficiente, dando lugar a períodos de incubación, manifestaciones clínicas y rasgos neuropatológicos muy similares entre los individuos afectados. Por el contrario, se ha visto que las transmisiones de priones entre especies distintas dan lugar a períodos de incubación muy largos (que en ocasiones pueden sobrepasar la esperanza de vida del hospedador) así como a tasas de ataque (proporción de animales que enferman respecto a los infectados) incompletas en el primer pase de una cepa priónica a una

especie (Bruce, 1993). Si el prion es transmitido sucesivamente en la nueva especie realizando nuevos pases, puede producirse la adaptación del mismo a la especie, reduciendo los períodos de incubación e incrementado las tasas de ataque (Priola, 1999). También se ha descrito la existencia de barreras parciales, en el caso de que, debido a la baja eficiencia de conversión de la PrP^C en PrP^{Sc} los animales inoculados presenten enfermedad subclínica y acumulación de PrP^{Sc} (Race & Chesebro, 1998). A la dificultad del prion para propagarse en un primer pase en una nueva especie se le denominó en un principio "barrera de especie". Más tarde, el concepto evolucionó hasta englobar distintos factores que afectan a la transmisión de los priones no sólo entre distintas especies sino también entre individuos de la misma especie, dando lugar al concepto de "barrera de transmisión".

Tras los primeros estudios respecto a la barrera de especie se estableció que uno de los determinantes fundamentales de ésta eran las diferencias aminoacídicas entre la estructura primaria de la PrP^C de la especie donante y la receptora. En estudios con ratones transgénicos que expresaban tanto la PrP^C endógena del ratón como la del hámster, se observó que mientras la inoculación de priones de ratón producía principalmente el acúmulo de PrP^{Sc} murina, la inoculación con priones de hámster daba lugar a la acumulación de PrP^{Sc} de esta especie (Prusiner *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1989). Posteriormente, se identificaron algunos cambios aminoacídicos que determinaban la barrera de especie (Scott *et al.*, 1993). Así, se determinó que la barrera de especie radicaba en la falta de homología entre las secuencias de la PrP^{Sc} infecciosa y la PrP^C de la especie receptora.

Sin embargo, y pese al importante papel del genotipo, estudios posteriores mostraron que distintas cepas priónicas que provenían de la misma especie y contaban con la misma secuencia primaria podían transmitirse con eficiencias muy distintas. Esto evidenció que la naturaleza de la barrera de transmisión era más compleja de lo que se creía, y se sugirió que la conformación específica de cepa de la PrP^{Sc} infecciosa era también un factor a tener en cuenta (Baskakov, 2014). Las primeras observaciones al respecto se dieron al inocular TME en hámsteres. Pese a no existir diferencias genotípicas entre los hospedadores de los cuales se aisló el prion infeccioso, ni entre los hospedadores en los que se inoculó, se obtuvieron dos cepas con propiedades

bioquímicas y fenotípicas distintas, que se denominaron “hyper” y “drowsy”. Además, estos aislados retenían patogenicidades distintas al reinocularse en visón (Bessen & Marsh, 1992b; Kimberlin *et al.*, 1986). Otro caso que evidenció este fenómeno fue la diferencia en la capacidad de transmisión entre priones de sCJD y vCJD. Estos dos tipos de prion poseen una secuencia primaria idéntica, y sin embargo se comportaban de forma contraria en cuanto a transmisibilidad, ya que los primeros eran fácilmente transmitidos a ratones transgénicos humanos, pero no a ratones *wild type* mientras que los segundos mostraban el comportamiento opuesto (Collinge, 2001). Algunos estudios más recientes sugieren incluso que el salto entre especies de los priones está fundamentalmente modulado por las características conformacionales de la cepa infecciosa y no por la homología entre las PrP del transmisor y el hospedador (Torres *et al.*, 2014).

Tras estas investigaciones, se puso en evidencia que tanto la secuencia de la PrP^C como la cepa priónica transmitida determinaban la capacidad de los priones para infectar nuevas especies. Por esto, se comenzó a utilizar el término “barrera de transmisión”, que aunaba los conceptos de “barrera de especie” y “barrera de cepa” (Supattapone, Bosque, *et al.*, 1999). El desarrollo de nuevas técnicas de propagación de la PrP^{Sc} *in vitro*, como la PMCA (*protein misfolding cyclic amplification*) (Castilla, Saá, *et al.*, 2005) ha demostrado que incluso en las especies más resistentes a las enfermedades priónicas la PrP^{Sc} puede propagarse, y que la barrera de transmisión en mamíferos puede no ser absoluta.

Además de el genotipo del gen *PRNP* y la cepa priónica, que están considerados los dos principales determinantes de la barrera de transmisión (Collinge, 2001), existen otros factores que influyen en ésta. En primer lugar, la ruta de infección y la dosis infectiva también pueden influir en la magnitud de la barrera de transmisión. La vía oral (el caso de la mayoría de las infecciones naturales) es generalmente mucho menos eficiente que la inoculación intracerebral que se suele utilizar en infecciones experimentales. Además, la vía de infección influye también en el tiempo que transcurre hasta que el prion empieza a ser detectable en el encéfalo y en el período de incubación de signos clínicos (Kimberlin & Walker, 1986). Pese a esto, no influye en la patogenia de la enfermedad en una alta medida, puesto que los perfiles de depósito de PrP^{Sc} en

encéfalo se mantienen constantes en animales del mismo genotipo inoculados con una misma cepa (Gonzalez *et al.*, 2014). Otro factor que también puede influir en la barrera de transmisión es la glicosilación de la PrP^C. El papel que juega la glicosilación de la PrP^C en la capacidad de transmisión priónica es todavía un tema controvertido. Debido a las diferencias en el contenido en glicanos entre PrP^C y PrP^{Sc}, y a que la glicosilación de la PrP^C afecta a los patrones de depósito del prion, en un principio se sugería que el nivel de glicosilación de la PrP^C podía tener relación con su facilidad de conversión en PrP^{Sc} (DeArmond *et al.*, 1997). Algunos experimentos posteriores sugieren que, aunque la presencia de glicanos en la PrP^C no es determinante para que se dé la infección, sí que afecta a la eficiencia de transmisión tanto entre individuos de la misma especie como entre distintas especies (Tuzi *et al.*, 2008; Wiseman *et al.*, 2015). Otros estudios sugieren que la glicosilación de la PrP^C no es esencial en la determinación de las propiedades de la cepa (Moudjou *et al.*, 2016; Piro *et al.*, 2009).

3.2. El fenómeno de cepa en las enfermedades priónicas

Uno de los aspectos más controvertidos en el estudio de las EET es la existencia de “cepas” priónicas. Las primeras pruebas experimentales de la existencia de cepas se reportaron a principios de los años 60 en estudios realizados en scrapie. Tras la transmisión del mismo aislado de scrapie ovino a cabras mediante inoculación intracerebral, se pudieron observar dos fenotipos clínicos perfectamente diferenciables, que además se mantenían al realizar pases seriados en el mismo hospedador (Pattison & Millson, 1961). Así, estos autores describieron la existencia de distintas variantes de esta enfermedad y, al desconocerse por entonces la naturaleza proteica del agente de las enfermedades priónicas, utilizaron el concepto “cepa” para referirse a estas variantes, por analogía con el concepto de cepa para otros agentes infecciosos. El término “cepa priónica” fue, por tanto, establecido para denominar las diferentes patologías que podían desarrollar los individuos afectados por una enfermedad priónica desde el punto clínico y bioquímico.

Puesto que el concepto clásico de cepa implicaba la existencia de material genético del patógeno, el fenómeno de cepa fue, en un inicio, utilizado como un argumento en contra de la hipótesis de solo proteína (Chesebro, 1998; Soto & Castilla,

2004). Sin embargo, y tras las evidencias que llevaron a aceptar la teoría de la sola proteína, hoy en día está ampliamente aceptado que la existencia de cepas priónicas radica en diferencias estructurales entre los priones, que dan lugar a distintas conformaciones estables que se propagan eficientemente (Bartz *et al.*, 2000; Peretz *et al.*, 2001).

Caracterización de cepas priónicas

Al carecer de material genético, la caracterización o tipificación de las cepas de EET no puede realizarse mediante métodos convencionales utilizados para virus o bacterias. Así, en la diferenciación de cepas priónicas se valoran distintos parámetros fenotípicos: signos clínicos, periodo de incubación, lesiones histopatológicas y patrón de depósito de la PrP^{Sc}, y distintas características bioquímicas (DeArmond & Prusiner, 1993; Fraser & Dickinson, 1968). Esta valoración se realiza tras la estabilización de la cepa mediante pases seriados en animales de experimentación, generalmente modelos murinos. La estandarización del uso de líneas de ratón, tanto transgénicas como *wild type*, y el desarrollo de la metodología de tipificación de cepas, ha dado lugar a la identificación de numerosas cepas priónicas (Beringue *et al.*, 2008), además de a la descripción de fenómenos de selección y mutación de cepas dependiendo del genotipo, la especie (Bruce, 1993) y la cantidad de sobreexpresión de la PrP^C (Le Dur *et al.*, 2017).

Una de las variables que más se utilizan a la hora de caracterizar las cepas priónicas es el período de incubación, es decir, el tiempo entre la inoculación y el desarrollo de signos clínicos o la muerte. Esto se debe a que la infección de distintas cepas en el mismo modelo da lugar a períodos de incubación diferenciables, estables y reproducibles (Bruce, 1993; Westaway *et al.*, 1987). Sin embargo, y en adición a las propiedades de la cepa utilizada, los primeros estudios en caracterización de cepas ya reportaron que existe un control genético por parte del hospedador, ya que estos períodos podían estar sujetos a cambios en función de la línea murina con la que se experimente (Dickinson *et al.*, 1968). Estos experimentos identificaron un *locus* que influía en el período de incubación y que en un inicio fue denominado gen *Sinc* (Dickinson & Meikle, 1971). Más adelante, este gen se asimiló al gen *PRNP*. Estos

estudios establecieron, por tanto, que la tipificación de cepas también debe tener en cuenta las características propias del hospedador.

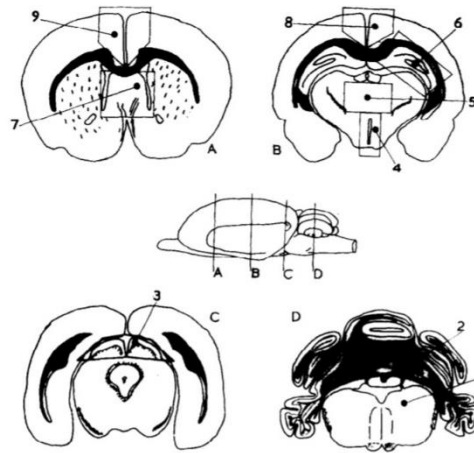


Figura 4. Esquema del tallado encefálico y de las distintas áreas cerebrales analizadas en la metodología de perfil lesional establecida por Fraser y Dickinson. 1) Núcleos dorsales de la médula oblongada, 2) corteza del cerebelo, 3) corteza del colículo superior del mesencéfalo, 4) hipotálamo, 5) tálamo, 6) hipocampo, 7) área septal, 8) corteza cerebral a nivel del tálamo y 9) corteza frontal. Extraído de (Fraser & Dickinson, 1968).

Otra característica utilizada en la caracterización del fenotipo de las cepas priónicas es el perfil lesional, es decir, los patrones neuropatológicos específicos de distribución e intensidad del depósito de PrP^{Sc} y del cambio espongiiforme. El concepto de “perfil lesional” se desarrolló a partir del establecimiento de un método semicuantitativo estandarizado para la evaluación de las lesiones espongiiformes (Figura 4) (Fraser & Dickinson, 1968). Tras el desarrollo de este protocolo, los mismos autores demostraron que el perfil lesional era una característica intrínseca de cepa, que se mantenía estable en animales de la misma línea murina y que no variaba en función de la dosis infectiva, lo cual lo convertía en un parámetro óptimo para la diferenciación de cepas (Fraser & Dickinson, 1973). Por otro lado, el perfil de depósito de la PrP^{Sc} se valora mediante inmunohistoquímica y de una forma similar al cambio espongiiforme. En este caso, se valora además la morfología y localización de estos depósitos (Gonzalez *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2010; Jeffrey *et al.*, 2003). Al igual que ocurre con el período de

incubación, además de la cepa, el genotipo del gen *PRNP* del hospedador puede influir en el fenotipo neuropatológico de las lesiones, especialmente en la distribución y morfología del depósito de PrP^{Sc} (Spiropoulos *et al.*, 2007). Algunos autores han defendido que las diferencias en los perfiles de distribución de las lesiones están principalmente determinadas por la cepa priónica (Gonzalez *et al.*, 2002; Gonzalez *et al.*, 2010), mientras que otros sostienen que se debe principalmente al genotipo del hospedador (Spiropoulos *et al.*, 2007). Sin embargo, estudios más actuales indican que esta distribución depende de complejas interacciones entre ambos factores (Gonzalez *et al.*, 2012).

Además de los signos clínicos, el periodo de incubación y el perfil lesional, que fueron durante décadas los parámetros utilizados en la tipificación, las cepas priónicas presentan también determinadas características bioquímicas que pueden utilizarse para distinguirlas. Dos características importantes en este sentido son la movilidad electroforética de la PrP^{Sc} tras su digestión con PK y el patrón de glicosilación (peso molecular y proporción relativa de las tres glicofomas) de esta proteína (Bessen & Marsh, 1992a; Gretzschel *et al.*, 2005). El patrón electroforético de una cepa es actualmente una de las principales características utilizadas en la diferenciación de cepas, y este depende precisamente del sitio de corte de la PK y de la proporción de las distintas glicofomas que presente (Parchi *et al.*, 1996).

A partir de los bioensayos realizados en modelos murinos mediante la inoculación experimental de priones, se han podido identificar y tipificar una gran cantidad de cepas priónicas distintas, gran parte a partir de scrapie (tanto ovino como caprino), EEB, y los priones humanos de la sCJD y el GSS (Bruce, 1993; Morales *et al.*, 2007). Actualmente, la mayoría de las cepas utilizadas en investigación provienen de la cepa SSBP/1 del scrapie ovino. El pase secuenciado en ovejas y cabras, durante más de 20 pases, de un homogeneizado de tejido nervioso de tres ovejas infectadas por scrapie, dio lugar al aislamiento de esta cepa (Dickinson *et al.*, 1968). La subsecuente transmisión de la cepa SSBP/1 a distintas líneas de murinos transgénicos llevó a aislar 8 de las cepas de scrapie murino: 22A, 22C, 22L, 22M, 79A, 79V, 80V, y RML; así como la cepa de hámster 263K (Bruce, 1993; Chandler, 1963; Kimberlin & Walker, 1986). Otra conocida cepa de scrapie murino que también es de las más utilizadas en investigación es la ME7,

que se obtuvo también a partir de material ovino infectado con scrapie, en este caso proveniente del sistema linforreticular (Zlotnik & Rennie, 1963).

Bases moleculares y fenómenos de selección y mutación de las cepas priónicas

La hipótesis más extendida para intentar explicar el fenómeno de las cepas priónicas defiende que las diferencias entre éstas se codifican a nivel de la estructura tridimensional de la PrP^{Sc}, que podría adoptar distintas conformaciones y adquirir así diferentes características biopatológicas. Además, la secuencia primaria de la PrP^C del hospedador limitaría la cantidad de conformaciones de PrP^{Sc} que pudieran propagarse en éste. Esta hipótesis se basa en los primeros estudios que se realizaron con el fin de identificar distintas cepas de agentes priónicos. En la década de los 90, tal y como se ha comentado anteriormente, la TME se transmitió experimentalmente a hámsteres dando lugar a dos fenotipos claramente diferenciados en signos clínicos, período de incubación y neuropatología (“*hyper*” y “*drowsy*”), que además conservaban patogenicidades distintas al reinocularse en visones (Bessen & Marsh, 1992b; Kimberlin *et al.*, 1986). Más tarde, otros estudios demostraron que la PrP^{Sc} presente en estas cepas contaba con distintas características bioquímicas a nivel de peso molecular, resistencia a la digestión con PK, localización del extremo N-terminal de la PrP^{res} y solubilidad en detergentes (Bessen & Marsh, 1992a, 1994). A estos estudios se unieron otros en el mismo sentido en los que se trabajaba con modelos murinos transgénicos y cepas humanas (Telling *et al.*, 1996). Las diferencias en las características bioquímicas encontradas entre cepas llevaron a pensar que existían distintas conformaciones de PrP^{Sc} que exponían distintos residuos del polipéptido a la acción de la proteinasa K.

Otras hipótesis defienden que las propiedades de cepa se deben puramente a la conformación y radican en la naturaleza amiloide de los priones. En algunos estudios con PrP recombinante se observó que fibras de amiloide de PrP de hámster podían convertir monómeros de PrP de ratón, mientras que el amiloide de PrP murina no era capaz de convertir monómeros de PrP de hámster. Además, tras la conversión, los monómeros de PrP murina adoptaban la estructura del amiloide de hámster y podían convertir a otros monómeros de PrP de ratón (Jones & Surewicz, 2005). Esto sugeriría que la fibra de amiloide, independientemente de su origen y de la secuencia primaria de

la PrP, es la que codifica las propiedades de cepa. Así, algunos amiloides serían capaces de inducir la conversión de determinadas moléculas de PrP, mientras que otros no, y la secuencia primaria solamente determinaría si la PrP es adaptable a la conformación impuesta por el amiloide.

Las distintas evidencias sobre el fenómeno de cepas llevaron a formular diferentes modelos sobre la naturaleza de éstas y su capacidad de transmisión: el modelo de “selección conformacional” y la hipótesis del “moldeado deformado”.

- Modelo de selección conformacional (Collinge & Clarke, 2007): Este modelo propone que para cada secuencia primaria de PrP existen varias conformaciones posibles de malplegamiento. Según esta hipótesis, las cepas priónicas son mezclas de distintos confórmeros o subcepas. De entre estas, una predomina y determina el fenotipo de la enfermedad. La capacidad de transmisión y su eficiencia vendría determinada por el grado de solapamiento entre las conformaciones presentes en el aislado priónico y aquellas permitidas o favorecidas por el hospedador. Una completa o amplia coincidencia entre estas conformaciones facilitaría la transmisión. Si por el contrario existe un menor número de conformaciones compartidas la transmisión se vería dificultada, y podría seleccionarse un componente minoritario más apto para la replicación en el nuevo huésped, lo que daría lugar a un cambio en el fenotipo observado de la enfermedad, produciéndose una aparente mutación. Si no hubiese conformaciones en común, existiría una fuerte barrera de transmisión, por lo que la propagación se vería impedida o precisaría de una mutación real de la cepa transmitida, es decir, de la generación de un confórmero que sí tuviera capacidad de transmitirse. Este modelo acepta como correcto el modelo de propagación de la PrP^{Sc} mediante nucleación-polimerización y entiende que la barrera de transmisión y el fenómeno de cepas son ambos un reflejo de la naturaleza conformacional de los procesos de propagación de los priones.
- Hipótesis del “moldeado deformado”. El modelo explicado anteriormente se basa en la teoría de que las cepas son mezclas de confórmeros. Sin embargo, esta hipótesis no ofrece una explicación al origen de la variabilidad de confórmeros existente entre los priones, ya que asume que estas conformaciones se formarían

de manera espontánea. El modelo de selección conformacional también asume que, cuando existe una barrera que impide la propagación de la subcepa dominante, se selecciona otra variante de la mezcla que se propaga mejor en el nuevo hospedador. En contraposición a esto, otros autores (Makarava & Baskakov, 2013) defienden la hipótesis del modelado deformado, que ofrece una explicación a la heterogeneidad de las cepas priónicas sin ser incompatible con el modelo de selección conformacional. Según esta hipótesis, si los confórmeros presentes en el aislado infeccioso no son capaces de replicarse en el ambiente ofrecido por el hospedador, se produce una distorsión de la fibra de amiloide al incorporar nuevas moléculas no compatibles que lleva a la emergencia de variantes *de novo*. Estas nuevas variantes pueden no ser aptas para propagarse en el nuevo ambiente, pero a través de continuos sucesos de generación de nuevas variantes, finalmente se producirá la emergencia de una variante con capacidad para replicarse.

Estas dos hipótesis no son excluyentes, y entre ambas permiten explicar prácticamente todos los fenómenos de divergencia de cepas que se han observado tanto en enfermedades priónicas naturales como en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* (Baskakov, 2014).

4. Patogenia

El origen de las EET puede ser adquirido, hereditario o esporádico. El primer tipo comienza con la entrada al organismo de PrP^{Sc} infecciosa, el segundo se debe a mutaciones en el gen *PRNP* que hacen a la PrP^C más propensa a sufrir malplegamiento y el tercer tipo aparece de forma aparentemente espontánea. Pese a que todas las enfermedades priónicas tienen en común el mismo evento patogénico, la conversión de PrP^C en PrP^{Sc}, aún hay mecanismos patogénicos que no se conocen con exactitud, principalmente en las EET de origen esporádico, cuyo origen no se conoce.

4.1. Patogenia de las enfermedades priónicas adquiridas

Las formas de enfermedad priónica más relevantes dentro de este grupo son el scrapie ovino, la EEB en bóvidos y la vCJD humana, entre otras como el CWD, la iCJD, la encefalopatía espongiiforme felina (FEE) o el kuru. En la mayoría de los casos, estas enfermedades se adquieren vía oral, por la ingestión de priones y la subsiguiente diseminación por el organismo (Beekes & McBride, 2007). Pese a que la patogenia de cada una de estas enfermedades tiene propiedades específicas en función del huésped y la cepa priónica infectiva, cuando los priones entran vía oral existen cuatro fases características (las cuales pueden tener lugar simultáneamente): acúmulo del prion en el tejido linfoide, diseminación al sistema nervioso periférico, entrada y diseminación del agente al SNC y propagación centrífuga a tejidos periféricos.

La vía de infección en el scrapie clásico es casi siempre la vía oral. La infección se transmite, generalmente, de forma horizontal a través de la ingestión de material contaminado proveniente de otros individuos afectados (Hoinville, 1996). Otras vías menos importantes como la percutánea también podrían tener cierto papel en la entrada del prion al organismo (van Keulen *et al.*, 2002). Se considera que la principal fuente de contaminación del ambiente son las placentas, ya que contienen unos títulos infectivos muy elevados (Andreoletti *et al.*, 2002). Pese a que la transmisión vertical del scrapie también se ha reconocido y existen evidencias experimentales de ésta (Foster *et al.*, 2013), es difícil evaluar su importancia debido a la posible infección de los corderos en el parto. Además, la infectividad de la leche y el calostro también se ha demostrado (Konold *et al.*, 2013). A nivel experimental, se han descrito otras vías de infección como la intracerebral, la intraperitoneal, la intravenosa, la intraocular y la conjuntival (Detwiler & Baylis, 2003).

Una vez el prion ha entrado en el organismo por vía oral, la PrP^{Sc} llega a yeyuno e íleon, donde cruza la barrera intestinal a través del GALT (*gut associated lymphoid tissue*, tejido linfoide asociado al intestino) y las placas de Peyer (Aguzzi & Calella, 2009; Andreoletti *et al.*, 2000). En el proceso de captación del prion participan enterocitos modificados del epitelio de la mucosa intestinal, llamados células M, que captan la PrP^{Sc} y la transportan al tejido linfoide subepitelial donde la presentan como antígenos a macrófagos y células dendríticas foliculares del LRS (Jeffrey *et al.*, 2001; Mabbott &

Bruce, 2001). Así, la primera replicación de la PrP^{Sc} se produce en el LRS, a partir del cual se disemina al resto del organismo. En el scrapie clásico, los priones muestran un fuerte linfotropismo, y en muchos casos se replican en este sistema ampliamente y previo a la fase de neuroinvasión. Por esto, en fases precoces y preclínicas de la enfermedad, se puede realizar un diagnóstico temprano a través de la detección del prion en biopsias de tonsila palatina (Monleon *et al.*, 2005), tercer párpado (Vargas *et al.*, 2006) o mucosa rectal (Gonzalez *et al.*, 2008). Aun así, la implicación del LRS en la infección depende del genotipo del hospedador y los ovinos con genotipo resistente frente al scrapie muestran una muy limitada replicación del prion en este sistema (Andreoletti *et al.*, 2000). Además, el linfotropismo del prion es también una propiedad de cepa, es decir, que depende del agente infeccioso: se ha observado que aunque en el scrapie clásico la PrP^{Sc} se acumula ampliamente en el tejido linfoide, esto no ocurre en casos de EEB transmitida de forma experimental a ovinos, donde la invasión del tejido linfoide es limitada o nula (Somerville *et al.*, 1997).

Tras la invasión del LRS, el prion se dirige al sistema nervioso. El primer lugar donde puede detectarse la PrP^{Sc} es en el sistema nervioso entérico de duodeno e íleon, donde se han observado acúmulos de PrP^{Sc} en los ganglios y plexos mientérico y submucoso. Después, el prion se distribuye por el sistema nervioso entérico desde donde se extiende hasta el sistema nervioso autónomo y de éste al SNC a través de dos puntos de llegada (Figura 5): la médula espinal a nivel torácico, la cual alcanza mediante una vía indirecta a través de los nervios espláncnicos y los ganglios celíaco y mesentérico craneal; y la médula oblongada, concretamente en el núcleo motor dorsal del nervio vago, a la cual asciende por vía directa a través de las fibras nerviosas parasimpáticas eferentes del PNS (Beekes & McBride, 2000; Beekes *et al.*, 1998). Así, la médula oblongada es la región neuroanatómica de elección en los métodos actuales de diagnóstico de scrapie y de EEB (Wells *et al.*, 1989). Al alcanzar el SNC, y en función de la cepa priónica y la especie del animal, entre otros factores, el prion se disemina y acumula en determinadas regiones encefálicas (Fraser & Dickinson, 1968), dando lugar a la aparición de signos de neurodegeneración: depósitos de PrP^{Sc}, vacuolización del tejido nervioso, gliosis y muerte neuronal (Budka, 2003).

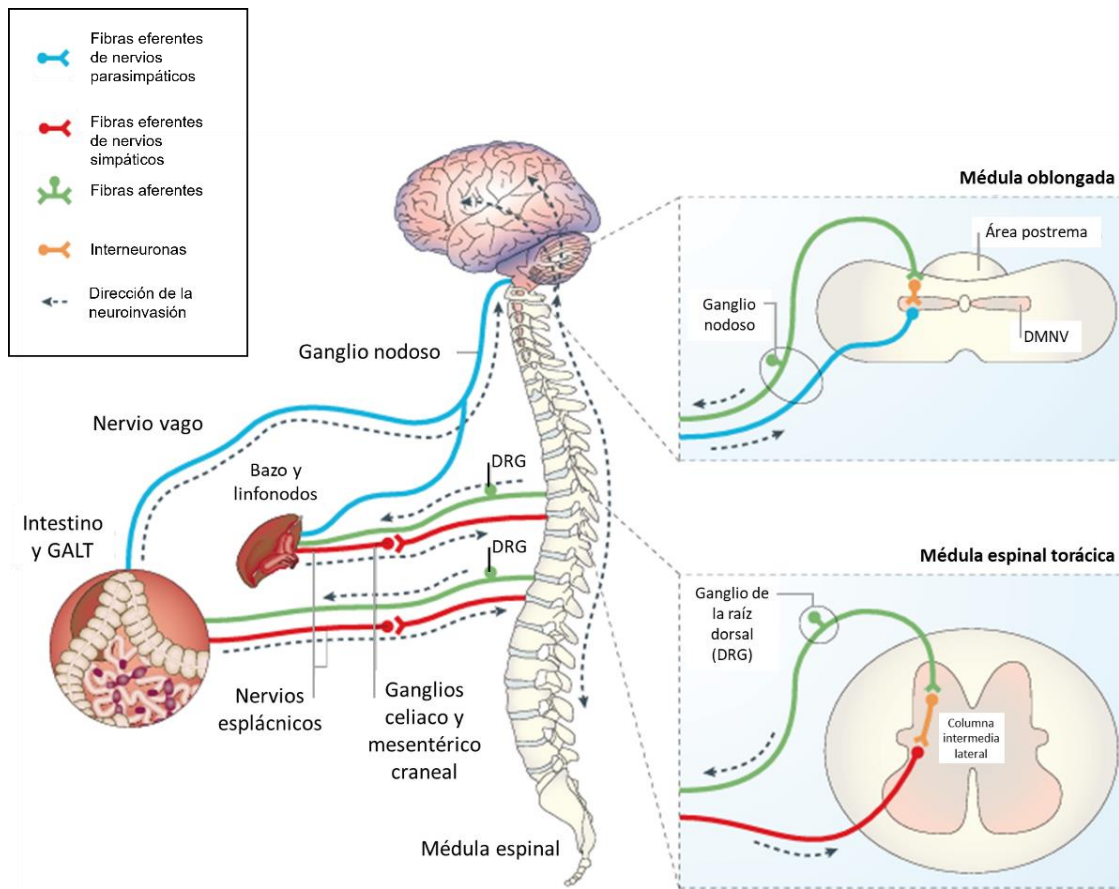


Figura 5. Vías de neuroinvasión en las EET adquiridas. Adaptación de (Mabbott & MacPherson, 2006).

Además, en la patogenia de algunas EET, y dado que no siempre se da una etapa linfoinvasiva previa a la neuroinvasión, se considera que existe una propagación del prion vía hematológica, que actuaría como ruta complementaria de neuroinvasión. En la actualidad, se acepta que esta vía complementaria puede darse a nivel de los órganos circunventriculares, que carecen de barrera hematoencefálica (Siso *et al.*, 2010; Siso *et al.*, 2009). En el caso del scrapie, el prion puede detectarse en sangre tras la invasión del LRS, y la infectividad aumenta conforme avanza la enfermedad (Houston *et al.*, 2008; Lacroux *et al.*, 2012). Pese a que el nivel de PrP^{Sc} en sangre es muy bajo, se ha demostrado que es posible transmitir el scrapie a animales sanos a través de la transfusión de sangre de animales infectados, tanto en fase clínica como preclínica (Houston *et al.*, 2008; Hunter *et al.*, 2002).

4.2. Patogenia de las enfermedades priónicas genéticas y esporádicas

Los mecanismos patogénicos responsables de la aparición de este tipo de enfermedades priónicas son, a día de hoy, mucho menos conocidos que los de las EET adquiridas. La transmisibilidad de la fCJD y la sCJD se demostró a partir de los años 60 del siglo pasado, dando lugar a un importante avance en el estudio de las formas genéticas y esporádicas de las enfermedades priónicas, ya que se observó que éstas podían ser a la vez hereditarias e infecciosas (Gajdusek *et al.*, 1968; Gibbs *et al.*, 1968; Masters *et al.*, 1981). Se considera que la aparición y transmisión de las formas genéticas o familiares de enfermedad priónica se deben a que los genes *PRNP* portadores de mutaciones dan lugar a una PrP^C con una fuerte propensión a malplegarse de forma espontánea (Gambetti *et al.*, 2003; Prusiner, 1989). El primer caso de CJD de origen familiar se reportó en 1924, y más tarde se identificó que la familia del individuo afectado portaba un polimorfismo asociado con la aparición de fCJD (Kretzschmar *et al.*, 1995). Como se ha mencionado previamente, el origen de las EET esporádicas todavía se desconoce. Algunas hipótesis sugieren que este tipo de EET se deben a mutaciones somáticas que surgen de forma espontánea en el gen *PRNP* o a cambios aleatorios en la estructura de la PrP^C (Prusiner, 2001). También se ha sugerido que los casos de sCJD, o al menos algunos de ellos, pueden deberse a la exposición de algún factor externo común todavía no identificado (Linsell *et al.*, 2004; Safar, 2012). Otras teorías dicen que en el encéfalo hay una pequeña cantidad de proteínas similares a la PrP^{Sc} que se encuentran unidas a otras que las mantienen inactivas, y que las EET esporádicas aparecen a causa de un fallo en este mecanismo protector (Safar *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2006).

4.3. Neurodegeneración

La neurodegeneración es la principal característica neuropatológica de las enfermedades priónicas. El proceso que lleva a ésta abarca multitud de eventos que pueden darse de forma secuencial o simultánea, como acumulación de PrP^{Sc}, alteraciones sinápticas, neuroinflamación y muerte neuronal (Budka, 2003). Además, se sabe que la presencia, formación y acumulación de PrP^{Sc} en el SNC es el desencadenante

de la enfermedad, aunque no se conoce el mecanismo a través del cual la produce. Existen evidencias de la relación entre la conversión de la PrP^C en PrP^{Sc} y el desencadenamiento de la neurodegeneración, por lo cual se plantean dos hipótesis sobre el mecanismo que conduce a ésta: la pérdida de las funciones protectoras de la PrP^C o su adquisición de propiedades neurotóxicas al sufrir la conversión en PrP^{Sc} (Aguzzi & Calella, 2009; Castilla *et al.*, 2004).

En cuanto a la primera hipótesis, pese a que la PrP^C parece contar con cierto papel neuroprotector, los ratones *knock-out* para el gen *PRNP* se desarrollan normalmente sin la aparición de signos de neurodegeneración (Bueler *et al.*, 1992), lo que lleva a pensar que la patogénesis de estas enfermedades se produce por una actividad tóxica ejercida por la PrP^{Sc} y no por la pérdida de función fisiológica de la PrP^C. Así, la segunda teoría es la más aceptada actualmente, más teniendo en cuenta que otras enfermedades neurodegenerativas (AD, PD, HD o ALS, entre otras) se producen por el acúmulo de proteínas patológicas en el encéfalo (Carrell & Lomas, 1997). Existen distintas evidencias que respaldan la idea de que la PrP^{Sc} es la responsable directa de la neurodegeneración: la correlación topográfica entre depósitos de PrP^{Sc} y alteraciones neuropatológicas (DeArmond & Prusiner, 1993); la aparición de neurotoxicidad y apoptosis en cultivos celulares al ponerlos en contacto con concentraciones muy pequeñas de PrP^{Sc} (Hetz *et al.*, 2003); el hecho de que las mutaciones que desencadenan EET genéticas se localicen en el gen *PRNP* e induzcan el malplegamiento de la PrP^C fisiológica (Prusiner & Scott, 1997) y la observación de que la sobreexpresión de PrP^C mutada provoque la aparición de una EET espontánea y transmisible (Hsiao & Prusiner, 1990; Sigurdson *et al.*, 2009). No obstante, y pese a la evidencia de que existe relación entre la neurodegeneración y la PrP^{Sc}, esta no es intrínsecamente neurotóxica, sino que requiere de la presencia de PrP^C, ya que la falta de expresión de la proteína fisiológica da lugar a resistencia frente a la infección experimental (Bueler *et al.*, 1993; Sailer, 1994; Weissmann *et al.*, 1994), e incluso una vez instaurada la infección, se puede revertir la neurodegeneración mediante el bloqueo de la expresión de la PrP^C (Mallucci *et al.*, 2003; Mallucci *et al.*, 2007). Junto a estas observaciones se une también la de que la PrP^C no sólo tiene que estar presente para el desarrollo de la enfermedad, sino que además tiene que encontrarse localizada en la membrana plasmática celular ya que los modelos

murinos transgénicos cuya PrP^C no expresa la secuencia C-terminal de unión al anclaje GPI no desarrollan sintomatología clínica a pesar de que la PrP^C soluble que poseen se convierte en PrP^{Sc} y se acumula en forma de placas extracelulares (Chesebro *et al.*, 2005).

Aunque los mecanismos moleculares exactos implicados en la patogenia de las enfermedades priónicas aún se desconocen, se han identificado distintas vías que juegan un papel importante en la neurodegeneración asociada a las EET, entre las cuales autofagia y la apoptosis son particularmente relevantes (Liberski *et al.*, 2004).

Mecanismos implicados en la neurodegeneración: autofagia y apoptosis

Uno de los mecanismos que conducen a la muerte celular y a la neurodegeneración en las enfermedades priónicas es la activación de vías pro-apoptóticas, que se han identificado como una causa común de muerte neuronal en EET animales (Williams *et al.*, 1997) y humanas (Gray *et al.*, 1999). Sin embargo, y pese a la amplia investigación que se ha realizado, la ruta apoptótica exacta que tiene lugar durante el curso de las EET y que conduce a la neurodegeneración no está todavía clara. Aunque su papel sigue siendo controvertido, algunos estudios han relacionado la apoptosis en enfermedades priónicas con la regulación al alza del factor proapoptótico Bax (*Bcl-2 associated X*) (Lyahyai *et al.*, 2006; Lyahyai *et al.*, 2007).

La apoptosis en las EET también puede estar inducida por el estrés crónico del retículo endoplásmico. La presencia de PrP^{Sc} y la acumulación de proteínas malplegadas en la célula provoca una alteración en la homeostasis proteica de la célula, lo que da lugar a la activación de la respuesta a proteínas desplegadas, *unfolded protein response* (UPR). La UPR tiene como objetivo reducir la síntesis de proteínas y degradar las proteínas malplegadas para recuperar la proteostasis y el funcionamiento normal de la célula (Schroder & Kaufman, 2005). La activación de este mecanismo comienza como un proceso protector para la célula, pero si el estrés celular se prolonga el UPR activará cascadas pro-apoptóticas que llevarán a la muerte neuronal, como por ejemplo IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*), ATF6 (*activating transcription factor 6*) o Akt/PI3K (*protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase*) (Han *et al.*, 2013; Hetz *et al.*, 2003; Otero *et al.*, 2021). Además, la proteína prion patológica ha sido directamente relacionada con la

apoptosis puesto que el depósito de agregados de PrP^{Sc} se ha asociado directamente con la activación de las proteínas Caspasa-3 y Caspasa-8, y con el desencadenamiento de vías dependientes de Caspasas que resultan en apoptosis (Kristiansen *et al.*, 2005). Así, muchos estudios sugieren que parte de la muerte celular que se observa en las enfermedades priónicas se debe a mecanismos apoptóticos, aunque otros señalan que la causa principal de muerte celular puede implicar una vía no apoptótica, o que la apoptosis es un proceso más bien tardío que no se da en el inicio de la enfermedad (Mays & Soto, 2016).

La autofagia es un mecanismo esencial del catabolismo celular en el cual los componentes dañados, como las proteínas mal plegadas, son incluidos en autofagosomas y degradados por los lisosomas con el fin de mantener el equilibrio homeostático intracelular (Rubinsztein, 2006). La activación de los mecanismos autofágicos parece jugar un papel protector, ya que puede degradar de manera eficiente las proteínas mal plegadas (Heiseke *et al.*, 2010), y numerosos estudios han demostrado su importancia en diferentes trastornos neurodegenerativos como la ALS, la AD o la PD, en las cuales, igual que en las EET, la presencia de agregados proteicos anormales es una característica común (Nassif & Hetz, 2014). En las enfermedades priónicas se ha observado un aumento en el número de vacuolas autofágicas, endosomas y lisosomas (Boellaard *et al.*, 1991; Liberski *et al.*, 2010), además de otro tipo de anomalías en este sistema degradativo celular. En estas enfermedades, se han reportado alteraciones en la expresión de marcadores de autofagia como las proteínas LC3-B y p62, tanto *in vitro* como *in vivo* (Homma *et al.*, 2014; Moon *et al.*, 2016; Thellung *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2014), así como diferencias en la expresión de genes relacionados con este mecanismo (*beclin-1* y *Atg5*) (Mok *et al.*, 2007), sugiriendo una activación del sistema de autofagia con el fin de eliminar las proteínas agregadas. Además, existen evidencias de que la autofagia está directamente implicada en la degradación de la PrP^{Sc}. Experimentos *in vitro* han demostrado que los lisosomas autofágicos tienen un papel directo en la degradación de priones (Goold *et al.*, 2013; Jeffrey *et al.*, 2003) y se ha observado que la alteración de los mecanismos autofágicos farmacológicamente o por siRNA inhibe la capacidad de las células para degradar la PrP^{Sc} (Heiseke *et al.*, 2010).

No obstante, todavía no está clara la función de la autofagia en la infección por priones. Probablemente, la activación de la autofagia se dé como un mecanismo de defensa en un intento de aumentar la degradación priónica y conseguir la supervivencia celular, y por lo tanto este proceso tendría un papel fisiológico en las EET, sobre todo en estadios tempranos. Sin embargo, aunque la activación de mecanismos autofágicos sea beneficiosa en el inicio de la infección por priones, todavía no está claro si a la larga una autofagia aumentada puede tener efectos nocivos. Por un lado, existe la teoría de que la autofagia basal podría generar semillas de PrP^{Sc} más pequeñas que serían modelos más eficientes para la propagación priónica y ayudarían a extender la infección (Heiseke *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha propuesto que la autofagia puede contribuir en la formación de cambios espongiiformes (Liberski *et al.*, 2008; Liberski *et al.*, 2004). Actualmente, no se conoce el origen de las vacuolas características de las EET, y existen hipótesis que plantean que podrían estar provocadas por la destrucción del tejido encefálico por autofagia. Estas hipótesis se respaldan en el hecho de que las vacuolas autofágicas se detecten antes que las espongiiformes, y que en las fases tempranas de infección se detecten tanto autofagia como vacuolización mientras que en las finales se observe poca actividad autofágica y una fuerte vacuolización (Jeffrey *et al.*, 1992; Liberski *et al.*, 2005; Liberski *et al.*, 1992). Por esto, se considera que la acumulación de PrP^{Sc} podría dar lugar a una sobrecarga del sistema catabólico que lleve a la eliminación de neuronas a través de mecanismos autofágicos (Jeffrey *et al.*, 1992).

Así, muchos estudios han identificado la desregulación autofágica en modelos de EET (Boellaard *et al.*, 1989; Liberski *et al.*, 2004; Llorens, Thüne, Sikorska, *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2014), y se ha implicado la alteración de la homeostasis de este sistema de degradación de proteínas como una importante causa principal de toxicidad común a enfermedades priónicas (Goold *et al.*, 2015), por lo que no se puede descartar que los mecanismos autofágicos, originados como una respuesta de supervivencia a la acumulación de PrP^{Sc} intracelular, puedan no lograr recuperar la homeostasis dando lugar así a la disfunción neuronal y la muerte celular (Mays & Soto, 2016).

5. Diagnóstico

Debido a que el agente causal de las enfermedades priónicas carece de material genético y no genera una respuesta inmune convencional en el hospedador, estas patologías no pueden ser diagnosticadas mediante el uso de técnicas como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) o técnicas serológicas. En los individuos vivos, el diagnóstico se realiza mediante la observación de signos clínicos, la detección del prion en tejido linfóide de fácil acceso o la medida de distintos biomarcadores de enfermedad priónica. Las técnicas para confirmar el diagnóstico se basan en la detección *post-mortem* de las lesiones espongiiformes y de la PrP^{Sc} en sistema nervioso central (OIE, 2008).

5.1. Diagnóstico *in vivo*

El diagnóstico de las EET suele comenzar con la aparición de signos clínicos nerviosos que da lugar a la posterior realización de pruebas tanto clínicas como de laboratorio con el fin de confirmar la enfermedad. En el scrapie clásico, los primeros signos clínicos suelen darse entre los 2 y 5 años de vida del animal y su instauración tiene un curso largo que puede ocurrir en semanas o meses. Entre estos signos clínicos podemos encontrar cambios en el comportamiento, hiperreactividad a los estímulos, apatía, bruxismo y prurito (que da lugar a alopecias en las zonas de rascado). Más adelante, los signos evolucionan y dan lugar a temblores (principalmente de la cabeza), cambios posturales, ataxia y marcha hipermétrica, y finalmente, en estadios avanzados, el animal afectado puede no ser capaz de ponerse en pie (Clark & Moar, 1992; Healy *et al.*, 2003). En seres humanos, las enfermedades priónicas pueden dar lugar a distintos cuadros clínicos, todos en relación con anomalías nerviosas. Además de la observación de síntomas y la medición de biomarcadores en líquido cefalorraquídeo (LCR), se pueden realizar técnicas como la RMN o la electroencefalografía para complementar el diagnóstico (Krasnianski *et al.*, 2004).

En el scrapie clásico, tal y como se ha mencionado con anterioridad, el diagnóstico de la enfermedad puede realizarse de forma preclínica, antes de la aparición

de sintomatología, mediante la biopsia de tejido linfoide y la posterior realización de inmunohistoquímica para la detección de la PrP^{Sc} (Monleon *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2006). En seres humanos la biopsia puede realizarse en el tejido nervioso del encéfalo para realizar el diagnóstico *in vivo*, aunque esta técnica tan invasiva solo se realiza en el caso de que el diagnóstico diferencial de la sintomatología incluya otras enfermedades nerviosas que puedan ser tratadas y no se puedan diferenciar de una EET de otra manera. Para intentar diagnosticar las enfermedades priónicas humanas, actualmente se realizan técnicas menos invasivas, como el análisis de biomarcadores en LCR (Thompson & Mead, 2019).

5.2. Biomarcadores en el diagnóstico de las EET

Los biomarcadores son sustancias que pueden ser medidas de manera objetiva e indican y permiten discriminar un proceso biológico o patológico (Huzarewich *et al.*, 2010). Los biomarcadores en las EET pueden ser de dos tipos: por un lado está la proteína prion en sí, y por otro los marcadores “subrogados”, que son aquellos que se liberan al LCR a causa de la muerte neuronal y la neurodegeneración. Los marcadores subrogados de rutina en LCR para el diagnóstico de casos de enfermedad priónica humana son 14-3-3 y tau total, ambos considerados como marcadores de daño neuronal (Otto *et al.*, 2002). Además, el “ensayo de conversión inducida por agitación en tiempo real” (RTQuIC), que detecta directamente la proteína prion, se utiliza como una prueba altamente específica y sensible en LCR (Cramm *et al.*, 2016). Sin embargo, y aunque no se conoce el motivo, algunos estudios han demostrado una disminución de la PrP total en el LCR de algunos casos de sCJD (Abu Rumeileh *et al.*, 2016; Dorey *et al.*, 2015). Se ha demostrado que 14-3-3, tau total y la PrP total también pueden ser utilizadas como marcadores en el caso del scrapie clásico, incluso en fases preclínicas de la enfermedad (Llorens *et al.*, 2018). Sin embargo, se desconoce su utilidad como biomarcadores preclínicos de enfermedad priónica en humanos y, además, el uso de PrP^{Sc} como biomarcador preclínico no se considera fiable, ya que su presencia en fases asintomáticas es mínima en tejidos y fluidos accesibles (Gough & Maddison, 2010). Así, actualmente en humanos las enfermedades priónicas únicamente se pueden diagnosticar en la etapa sintomática, cuando el daño neuronal ya es masivo y el

beneficio de los posibles tratamientos sería limitado. Por esto, uno de los mayores retos actuales en la investigación de las EET es la búsqueda de biomarcadores subrogados de fácil acceso que permitan la detección de casos asintomáticos. A continuación, se detallan algunos de los marcadores actualmente bajo investigación para la detección preclínica de las EET.

- Biomarcadores de activación glial y neuroinflamación

La activación de células de la microglía y astrocitos es una característica clave en muchas enfermedades neurodegenerativas. Pese a que las enfermedades priónicas son patologías que no presentan una respuesta inmunológica o inflamatoria típica (Porter *et al.*, 1973), sí que se han reportado fenómenos de neuroinflamación, los cuales se desconoce si contribuyen al proceso de neurodegeneración o si aparecen como consecuencia de la patogenia de estas enfermedades (Kercher *et al.*, 2007). De entre los marcadores de inflamación y activación astrogial estudiados, la glicoproteína YKL-40 es el más prometedor, ya que sus niveles en LCR han demostrado estar aumentados en sCJD respecto a otras enfermedades neurodegenerativas (Llorens, Thüne, Tahir, *et al.*, 2017)

- Biomarcadores de degeneración sináptica

La degeneración sináptica es un evento patogénico temprano en muchas enfermedades neurodegenerativas, y ha sido especialmente reportada en las enfermedades priónicas (Hilton *et al.*, 2013; Soto & Satani, 2011). Por esto, una de las estrategias más estudiadas en la búsqueda de biomarcadores preclínicos de EET es la búsqueda de moléculas relacionadas con la degeneración de las sinapsis. La neurogranina (Ng) es una proteína postsináptica neuronal, que se localiza específicamente en el soma neuronal y las dendritas (Represa *et al.*, 1990). Esta proteína ha sido estudiada como marcador de daño neuronal en pacientes con AD y sCJD (Blennow *et al.*, 2019), y se ha observado que los niveles de ésta en LCR de pacientes de sCJD están aumentados respecto a los controles sanos e incluso los casos de AD. Además, en los casos de sCJD, la concentración de Ng en el LCR no difiere entre las etapas temprana y tardía de la enfermedad, lo que respalda el uso

de la neurogranina como biomarcador para detectar la disfunción sináptica en etapas tempranas de enfermedad priónica.

- Biomarcadores de degeneración axonal

Igual que la degeneración sináptica, la pérdida de función axonal ocurre en etapas tempranas de las enfermedades priónicas (Soto & Satani, 2011). Los neurofilamentos (Nfs) son proteínas del citoesqueleto ubicadas principalmente los axones, donde actúan confiriendo estabilidad estructural (Yuan *et al.*, 2017). La cadena ligera de neurofilamento (NfL) es el biomarcador más utilizado en relación con la neurodegeneración, ya que cuando ocurre daño neuronal, esta proteína se libera al líquido intersticial, que se comunica con el LCR y la sangre. Se ha visto que NfL aumenta en sangre y LCR en una variedad de trastornos neurológicos, como la AD, la ALS, la demencia frontotemporal (FTD) o la esclerosis múltiple (EM) (Gaetani *et al.*, 2019). Con respecto a las enfermedades priónicas, NfL se ha encontrado aumentado en el LCR y en la sangre de casos clínicos de sCJD (Kanata *et al.*, 2019; Steinacker *et al.*, 2016; van Eijk *et al.*, 2010). Además, también parece aumentar en el suero de ovejas preclínicas, lo que lo señala como un potencial biomarcador para casos preclínicos de scrapie (Zetterberg *et al.*, 2019).

- MicroRNAs (miRNAs)

Los MicroRNAs (miRNAs) son fragmentos de RNA pequeños, de entre 21 y 25 nucleótidos que regulan la expresión de otros genes y la síntesis de proteínas uniéndose al ARN mensajero. Éstos son secretados al LCR y la sangre y tienen una alta estabilidad debido a su unión con chaperonas o su inclusión en exosomas, por lo que se pueden medir en estos fluidos (Mitchell *et al.*, 2008). Estas moléculas se han visto alteradas en distintas enfermedades neurodegenerativas (Hruska-Plochan *et al.*, 2015). En el caso de las EET, aunque su modulación no ha sido tan investigada, sí se han observado variaciones en la expresión de miRNAs entre la etapa preclínica y la fase terminal de la infección priónica (Boese *et al.*, 2016; Majer *et al.*, 2012), así como en modelos murinos infectados con scrapie (Saba *et al.*, 2008; Saba *et al.*, 2012) o en CJD (Montag *et al.*, 2009). Debido a esto, estas moléculas han ganado una alta importancia como posibles biomarcadores de enfermedad priónica.

5.3. Diagnóstico *post-mortem*

- Examen histopatológico del SNC

Históricamente, el diagnóstico de las EET se ha basado en la observación de las lesiones microscópicas típicas de estas enfermedades. La degeneración espongiiforme es la lesión característica de las enfermedades priónicas, y puede observarse en forma de vacuolas en el pericarion neuronal (vacuolización intraneuronal) o en el neuropilo (espongiosis) (Wells & McGill, 1992). Estas lesiones suelen darse de manera bilateral y simétrica en las distintas áreas encefálicas (Ligios *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 1997), aunque su distribución depende del tipo de enfermedad priónica, la cepa del agente causal y la especie y genotipo del individuo afectado (Fraser & Dickinson, 1968). En el caso del scrapie clásico, la vacuolización es generalmente mayor en la médula espinal torácica, la médula oblongada (principalmente a nivel de obex), el tronco del encéfalo y el tálamo (Detwiler & Baylis, 2003; OIE, 2008). Además de la degeneración espongiiforme, otras características que pueden observarse en el encéfalo son la muerte neuronal, la astrocitosis, la presencia de microglía reactiva y, en algunos tipos de EET, la presencia de placas de amiloide (Budka *et al.*, 1995; Jeffrey *et al.*, 1998; McBride *et al.*, 1988; Wood *et al.*, 1997).

- Detección inmunohistoquímica de la proteína prion

La técnica de la inmunohistoquímica (IHC), es la principal herramienta de diagnóstico de las enfermedades priónicas. Permite la detección de depósitos de PrP^{Sc} en tejidos y detecta la proteína prion incluso antes de que se puedan observar lesiones histopatológicas (Foster *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1993; Monleon *et al.*, 2003). Por medio de esta técnica se realiza la detección *in situ* de la PrP^{res}, el fragmento de la PrP^{Sc} resistente a la PK, mediante el uso de anticuerpos, permitiendo determinar tanto la presencia de la proteína como su localización, distribución y las características de los depósitos (Gonzalez *et al.*, 2003). Igual que ocurre con la degeneración espongiiforme, la distribución de los depósitos varía en función de las características del agente infeccioso y del hospedador (Bruce & Fraser, 1991; Spiropoulos *et al.*, 2007). Las primeras zonas del SNC en las que se detecta la PrP^{Sc}

son la médula espinal torácica y el obex (Jeffrey *et al.*, 2001; Ryder *et al.*, 2001) y conforme progresa la enfermedad ésta se distribuye por el encéfalo de forma generalmente bilateral y simétrica (Gonzalez *et al.*, 2003; Ryder *et al.*, 2001).

- Otras técnicas basadas en la detección directa de la PrP^{Sc}

A partir del comienzo de la vigilancia activa de las EET tras la crisis de la EEB, se instauraron las pruebas de diagnóstico rápido. La mayoría de estas pruebas están basadas en la técnica ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), la cual mediante anticuerpos conformacionales permite la detección inmunológica de la PrP^{Sc} en tejido nervioso y linfoide, analizando un número elevado de muestras en un tiempo corto (Bolea *et al.*, 2005). Otra técnica de diagnóstico que permite la detección de la PrP^{Sc} es el Western blot, en la cual tras la extracción y digestión con PK de las proteínas, estas se someten a electroforesis gel y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. Tras esto, la PrP^{res} se detecta también mediante anticuerpos. Esta técnica permite diferenciar cepas del agente priónico, ya que la PrP^{res} de éste puede dar lugar a distintos patrones electroforéticos en función de su conformación, glicosilación y lugar de corte de la PK (Somerville *et al.*, 1997; Telling *et al.*, 1996).

5.4. Técnicas no convencionales de detección de priones

- Bioensayo

Los bioensayos, que consisten en realizar pases seriados de material infeccioso en animales (generalmente en ratón) se han utilizado ampliamente en la investigación de las EET. Estos son, a día de hoy, una de las técnicas más sensibles a la hora de detectar priones en material potencialmente infeccioso. Pese a que pueden presentar algunas limitaciones como largos periodos de incubación y el efecto de la barrera de transmisión, el desarrollo de líneas murinas transgénicas que expresan el gen *PRNP* de otras especies ha permitido saltar las barreras de transmisión, facilitando la infección y acortando los tiempos de incubación (Bruce *et al.*, 2002). Además, tal y como ya se ha mencionado, los pases seriados de priones en estas líneas permiten la caracterización de cepas priónicas (Fraser & Dickinson, 1968).

- PMCA (*protein misfolding cyclic amplification*)

La PMCA, o “amplificación cíclica de proteínas malplegadas”, es una técnica de replicación de priones *in vitro*. Consiste en la repetición de distintos ciclos de incubación y sonicación de una “semilla” de PrP^{Sc} en un sustrato que contenga PrP^C, y trata de simular la propagación *in vivo* de los priones. Durante estos ciclos la PrP^{Sc} actúa como semilla y recluta moléculas de PrP^C e induce su malplegamiento, siendo estas moléculas incorporadas en oligómeros que después serán fragmentados dando lugar a nuevas semillas que después replicarán el proceso de forma cíclica, aumentando la cantidad de PrP^{Sc} generada *de novo* de forma exponencial (Castilla, Saá, *et al.*, 2005; Saá *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 2002). Así, la PMCA permite la detección de cantidades muy pequeñas de priones mediante su amplificación, lo cual puede utilizarse para la detección de PrP^{Sc} en muestras de fluidos como como sangre, orina o LCR (Atarashi *et al.*, 2007; Castilla, Saa, *et al.*, 2005; Gonzalez-Romero *et al.*, 2008). Además, los priones generados *in vitro* mediante esta técnica mantienen su infectividad y, generalmente, sus características bioquímicas, estructurales y neuropatológicas, por lo que la PMCA es una herramienta muy útil para el estudio sobre los fenómenos de cepa y las barreras de transmisión (Castilla, Saá, *et al.*, 2005).

- RT-QuIC (*real-time quaking-induced conversion*)

Otra técnica de amplificación de priones *in vitro* es la “conversión inducida por agitación en tiempo real” o RT-QuIC. Esta técnica se desarrolló a partir de la unión de otras dos metodologías (Atarashi *et al.*, 2011): el método QuIC (*quaking-induced conversion*) con el cual se amplificaba una semilla de PrP^{Sc} en un sustrato de PrP^C mediante agitación (Atarashi *et al.*, 2008) y el método ASA (*amyloid seeding assay*) que detecta la fluorescencia que emite la tioflavina en presencia de amiloide (Colby *et al.*, 2007). Así, la RT-QuIC monitoriza la amplificación progresiva de la PrP^{Sc} a través de la fluorescencia emitida por la tioflavina.

6. Aproximaciones terapéuticas

Pese a la amplia investigación que se ha realizado en múltiples modelos experimentales y los múltiples ensayos clínicos que se han llevado a cabo, no existen todavía vacunas o tratamientos para las enfermedades priónicas. Actualmente, las EET siguen siendo enfermedades incurables y de pronóstico letal. Como ya se ha comentado, el mecanismo patogénico exacto de las EET no se conoce, por lo que, desde el punto de vista molecular, existen distintas dianas terapéuticas en las que se ha centrado la investigación con el fin de obtener una terapia: las proteínas prion celular (PrP^C), patológica (PrP^{Sc}) y el proceso de conversión, la inmunoterapia o los procesos neurodegenerativos asociados a las EET (Trevitt, 2006).

6.1. Terapias enfocadas a la PrP^C, la PrP^{Sc} y el proceso de conversión

Como se ha señalado anteriormente, los ratones transgénicos que no expresan la PrP^C no propagan la PrP^{Sc} y no desarrollan patología tras la inoculación con priones (Bueler *et al.*, 1993; Sailer, 1994), por lo que aparentemente la PrP^{Sc} no es intrínsecamente neurotóxica, sino que requiere de la presencia de PrP^C y del proceso de conversión para generar patología. Por esto, la eliminación de la PrP^C, el sustrato para la propagación de la proteína priónica, es un objetivo terapéutico potencial, siempre que se pueda lograr sin efectos perjudiciales para el organismo huésped. Se ha demostrado que la inactivación de la expresión de la PrP^C en ratones transgénicos adultos una vez instaurada la enfermedad priónica no sólo previene la propagación de la PrP^{Sc} si no que revierte el cambio esponjiforme, y los ratones permanecen asintomáticos a pesar de la gliosis y el depósito extraneuronal de PrP^{Sc} (Mallucci *et al.*, 2003). En este sentido, también se ha comprobado que la inhibición de la expresión de PrP^C mediante ARN de interferencia (ARNi), es eficaz para reducir los niveles de PrP^{Sc} en cultivos celulares infectados con scrapie, aunque este efecto es transitorio y desaparece una vez se retira la transfección con ARN, la cuál es difícil de mantener en modelos *in vivo* (Daude *et al.*, 2003). Así, estos experimentos validan la eliminación del sustrato para la conversión de priones como estrategia terapéutica.

También se han testado compuestos que podrían intervenir en el proceso de conversión de la PrP^C a la PrP^{Sc}. Los compuestos polianiónicos y los colorantes amiloidotrópicos pueden anular la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} *in vitro* (Gabizon *et al.*, 1993; Snow *et al.*, 1989). El uso de poliaminas ramificadas en células de neuroblastoma infectadas por priones resultó en la eliminación de PrP^{Sc}, ya que estos compuestos actúan sobre la conversión priónica en endosomas y lisosomas (Supattapone, Nguyen, *et al.*, 1999). Los dendrímeros de fósforo también han mostrado efectos antipriónicos *in vitro*, eliminando la acumulación de PrP^{Sc} (Klajnert *et al.*, 2007). Sin embargo, ninguno de estos compuestos ha demostrado ningún efecto beneficioso *in vivo*, ya sea por su toxicidad, su farmacocinética o su baja eficacia. Estos resultados ponen en entredicho la predictibilidad de los cultivos celulares como modelo para identificar terapias, siendo uno de los posibles motivos de la escasa fiabilidad de estos modelos que generalmente es difícil mantener la infectividad del prion en células en continuo crecimiento (Aguzzi *et al.*, 2018).

Otra estrategia terapéutica que se ha probado a este nivel es el uso de “ β -sheet breakers” o “rompedores de la lámina β ”. Un péptido “rompedor de lámina β ” consiste en una secuencia de la proteína diana en la que se insertan residuos de prolina adicionales. La prolina es un aminoácido que no puede tomar la conformación requerida por una lámina β ordenada, y su presencia en una secuencia de aminoácidos previene la formación de estas láminas (Trevitt, 2006). El uso de estos péptidos impidió el reclutamiento de PrP^C en un experimento de conversión libre de células (Chabry *et al.*, 1998), y también resultó eficaz para disminuir la PrP^{Sc} en células infectadas con priones (Chabry *et al.*, 1999). Además, la secuencia del péptido de lámina β de la proteína priónica, iPrP13, diseñada por Soto *et al.*, provocó cierta prolongación en el periodo de incubación de ratones infectados con scrapie al utilizarse para tratar el inóculo antes de la infección y disminuyó la PrP^{Sc} en algunas líneas de cultivo celular, aunque se requirió en cantidades muy altas y no dio resultado en otras líneas celulares (Oishi *et al.*, 2003; Soto *et al.*, 2000). Además, una consideración clave en el diseño de opciones terapéuticas es la propensión de los agregados de PrP^{Sc} a romperse. Los rompedores de lámina β podrían afectar a la PrP^{Sc} rompiendo grandes agregados y convirtiéndolos en un mayor número de pequeños oligómeros, que después actuarían como semilla (Cox

et al., 2003). Así, se ha propuesto que una terapia eficaz enfocada a controlar la PrP^{Sc} no debería aspirar a romper estos agregados sino más bien a estabilizarlos. En este aspecto, se han utilizado los politiofenos conjugados luminiscentes (LCP), que logran estabilizar la fibra de amiloide y han dado resultados disminuyendo la infectividad en muestras de encéfalo de ratón infectadas con PrP^{Sc} (Margalith *et al.*, 2012) y alargando la supervivencia de modelos murinos infectados con priones (Herrmann, Schutz, *et al.*, 2015).

6.2. Inmunoterapias

Las estrategias de inmunización se han mostrado prometedoras en algunos trastornos causados por el malplegamiento de proteínas (Brody & Holtzman, 2008). En las EET, pese a que no se ha detectado una respuesta humoral por parte de los individuos afectados, sí se ha estudiado la posible aplicación terapéutica de anticuerpos.

La inmunización activa con PrP ha mostrado efectos beneficiosos al inmunizar ratones, con anterioridad a la inoculación de estos con proteína prion de scrapie y, en menor medida, una vez que los animales ya estaban infectados. En estos casos, se consiguió alargar los periodos de incubación e incluso reducir la incidencia de la enfermedad (Schwarz *et al.*, 2003; Sigurdsson *et al.*, 2002). Sin embargo, la inmunización activa contra los priones se ve dificultada por la expresión generalizada de PrP^C en el organismo, lo que hace que exista una tolerancia a ésta y a su isoforma patógena y al ser el sistema inmune tolerante a los autoantígenos, los anticuerpos derivados de este tipo de inmunizaciones a menudo carecen de la afinidad necesaria para una terapia eficaz (Aguzzi *et al.*, 2018).

Al resultar difícil crear una respuesta activa eficaz contra la proteína prion, la inmunización pasiva parece una estrategia más adecuada. Distintos estudios al respecto han logrado prevenir la aparición de la enfermedad o retrasar los tiempos de incubación en algunos modelos, pero existe una gran variedad de resultados obtenidos (Baral *et al.*, 2012; Heppner *et al.*, 2001; Herrmann, Sonati, *et al.*, 2015; Roettger *et al.*, 2013; Sonati *et al.*, 2013). Esta variedad sugiere que es de gran importancia la administración de una gran cantidad de anticuerpos en etapas tempranas, cuando el encéfalo aún no ha sido

afectado (White *et al.*, 2003). Otras complicaciones de este tipo de terapia son lograr que los anticuerpos lleguen al lugar de acción o evitar que estos provoquen la muerte neuronal (Sakaguchi *et al.*, 2009).

Por último, en el plano de las inmunoterapias, la administración de inmunoestimulantes ha dado resultados positivos en modelos experimentales produciendo un leve incremento del período de incubación, aunque únicamente resulta efectiva si se aplica de forma prolongada y si el tratamiento comienza inmediatamente después de la infección (Allen & Cochran, 1977; Gresser *et al.*, 1983). Por otro lado, la inmunosupresión también puede retrasar la aparición de la enfermedad, no obstante, como ocurre en el caso anterior, este efecto desaparece si el tratamiento comienza en momentos tardíos de la enfermedad o si la infección se produce intracerebralmente (Outram *et al.*, 1974).

6.3. Terapias enfocadas a los procesos neurodegenerativos

Dada la compleja patogénesis de las enfermedades priónicas, y el hecho de que se desconocen con exactitud sus mecanismos patogénicos, se ha planteado un amplio abanico de estrategias terapéuticas dispuestas a reducir o paliar la neurodegeneración a través de distintas vías celulares. Ya que se ha visto que la generación de radicales libres de oxígeno es uno de los causantes de la neurotoxicidad inducida por priones, una de estas estrategias consiste en la administración de antioxidantes como el hidroxitirosol acetilado o la vitamina E, que han extendido eficazmente la supervivencia de ratones infectados (Aguzzi *et al.*, 2018). Otra estrategia sería estimular la UPR con el fin de restaurar la proteostasis celular inhibiendo la síntesis proteica y reduciendo la carga de proteínas malplegadas en el RE. Para esto se han utilizado moduladores de las enzimas PERK (*Protein kinase RNA-like ER kinase*) y eIF2 α (*eukaryotic translation initiation factor*), ambas implicadas en la vía de la UPR, lo cual ha dado como resultado una ligera mejora de la neurodegeneración asociada a priones (Das *et al.*, 2015; Halliday *et al.*, 2015; Moreno *et al.*, 2013). El sistema de ubiquitina-proteasoma (UPS, *ubiquitin-proteasome system*), que también mantiene el control de la proteostasis celular mediante la degradación proteica (Hipp *et al.*, 2014), también se ha propuesto como una diana interesante para el tratamiento de las EET. Sin embargo, a día de hoy no se ha

conseguido tratar ya que la estimulación de este sistema podría dar lugar a la degradación de otros reguladores intracelulares y ser perjudicial para la célula (Seo *et al.*, 2007).

Tal y como se ha expuesto con anterioridad, la autofagia puede jugar un papel protector en las EET. Todavía no se ha determinado como ésta protege de la neurodegeneración, aunque existen varias hipótesis: que ayuda a eliminar la proteína prion, que elimina orgánulos dañados o que atenúa la respuesta pro-apoptótica a distintas formas de estrés (Ravikumar *et al.*, 2006). La modulación de la autofagia farmacológicamente o mediante siRNA inhibe la capacidad de las células para degradar PrP^{Sc} (Heiseke *et al.*, 2010), por lo que los promotores de la autofagia podrían ser una estrategia terapéutica contra los priones (Ertmer *et al.*, 2004; Goold *et al.*, 2013). Se ha demostrado que compuestos como la rapamicina, la trehalosa, el imatinib, el tacrolimus o el litio, que promueven la autofagia, mejoran la eliminación de PrP^{Sc} en cultivos celulares. Además, el tratamiento con imatinib, rapamicina o litio durante al inicio de la infección priónica también tiene efectos *in vivo*, prolongando el periodo de incubación y la esperanza de vida y retrasando la neuroinvasión y el inicio de los signos clínicos (Cortes *et al.*, 2012; Heiseke *et al.*, 2009; Karapetyan *et al.*, 2013; Sarkar *et al.*, 2007; Yun *et al.*, 2007). Sin embargo, estos efectos no son notorios si el tratamiento se aplica una vez producida la neuroinvasión. Estos resultados reflejan la dificultad de trasladar estos tratamientos a organismos *in vivo*, probablemente debido a una baja capacidad de estos compuestos para atravesar la barrera hematoencefálica (Goold *et al.*, 2015). Sin embargo, estos resultados también muestran que la eliminación de la PrP^{Sc} mediante la estimulación de mecanismos autofágicos puede resultar una estrategia terapéutica efectiva en el tratamiento de las EET.

ESTUDIO 1

Therapeutic Assay with the Non-toxic C-Terminal Fragment of Tetanus Toxin (TTC) in Transgenic Murine Models of Prion Disease

*El texto que se describe a continuación corresponde con el artículo publicado en la
revista científica Molecular Neurobiology:*

*Betancor M., Moreno-Martínez L., López-Pérez O., Otero A., Hernaiz A., Barrio T.,
Badiola J.J., Osta R., Bolea R., Martín-Burriel I. (2021).
Mol.Neurobiol. doi: 10.1007/s12035-021-02489-5*

Therapeutic Assay with the Non-toxic C-Terminal Fragment of Tetanus Toxin (TTC) in Transgenic Murine Models of Prion Disease

Abstract

The non-toxic C-terminal fragment of the tetanus toxin (TTC) has been described as a neuroprotective molecule since it binds to Trk receptors and activates Trk-dependent signaling, activating neuronal survival pathways and inhibiting apoptosis. Previous *in vivo* studies have demonstrated the ability of this molecule to increase mice survival, inhibit apoptosis and regulate autophagy in murine models of neurodegenerative diseases such as amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy. Prion diseases are fatal neurodegenerative disorders in which the main pathogenic event is the conversion of the cellular prion protein (PrP^C) into an abnormal and misfolded isoform known as PrP^{Sc}. These diseases share different pathological features with other neurodegenerative diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease or Alzheimer's disease. Hitherto, there are no effective therapies to treat prion diseases. Here, we present a pilot study to test the therapeutic potential of TTC to treat prion diseases. C57BL6 wild-type mice and the transgenic mice Tg338, which overexpress PrP^C, were intracerebrally inoculated with scrapie prions and then subjected to a treatment consisting of repeated intramuscular injections of TTC. Our results indicate that TTC displays neuroprotective effects in the murine models of prion disease reducing apoptosis, regulating autophagy and therefore increasing neuronal survival, although TTC did not increase survival time in these models.

Keywords

Prion · Prion diseases · Neurodegeneration · Autophagy · Tetanus toxin

Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), also termed prion diseases, are fatal neurodegenerative disorders caused by prions that affect humans and a wide variety of animal species (Prusiner, 1982). These diseases share, as the main pathogenic event, the conversion of the cellular prion protein (PrP^C) into an abnormal and misfolded isoform known as PrP^{Sc}. This leads to the accumulation of PrP^{Sc} in the central nervous system (CNS), which causes neuronal dysfunction and cell death (Pattison & Jones, 1967). TSEs show morphological and pathophysiological hallmarks that mirror those of other neurodegenerative diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Alzheimer's disease or Parkinson's disease (Frost & Diamond, 2010). Neurodegeneration is the main pathological feature of prion diseases. Although molecular mechanisms involved in the pathogenesis of prion diseases are still unknown, several pathways have been proposed to play an important role in TSE-associated neurodegeneration, among which autophagy and apoptosis are particularly relevant (Liberski *et al.*, 2004).

Autophagy is an essential mechanism of cellular catabolism in which damaged components, such as misfolded proteins, are included in double-membrane structures, known as autophagosomes, and degraded by lysosomes hence maintaining homeostatic balance inside cells (Rubinsztein, 2006). Thus, the activation of autophagic mechanisms seems to play a protective role since it can efficiently degrade misfolded proteins (Heiseke *et al.*, 2010), and many studies have shown its importance in different neurodegenerative disorders like amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease or Parkinson's disease, in which the presence of abnormal protein aggregates is a common feature (Nassif & Hetz, 2014). In prion diseases, it has been observed that the impairment of autophagic mechanisms pharmacologically or by siRNA inhibits the capacity of cells to degrade PrP^{Sc} (Heiseke *et al.*, 2010). Many studies have identified autophagic dysregulation in TSE models (Boellaard *et al.*, 1989; Liberski *et al.*, 2004; Llorens *et al.*, 2017; Moon *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2014), including the model used in this study (López-Pérez, Toivonen, *et al.*, 2019) and impaired protein homeostasis has been implicated as an important major cause of toxicity common to prion diseases (Goold *et al.*, 2015). Autophagic mechanisms, originated as a survival response to intracellular

PrP^{Sc} accumulation, can fail to recover homeostasis after exposure to PrP^{Sc}, thus leading to neuronal dysfunction and cell death (Mays & Soto, 2016).

The activation of pro-apoptotic pathways has been demonstrated in natural forms of prion disease (Serrano *et al.*, 2009). These mechanisms have proven to be a common cause of neuronal cell death in animal TSEs in different studies of scrapie-infected sheep, mice and hamsters (Sisó *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 1997). They have also been reported as a common form of neuronal death in human prion diseases as Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and fatal familial insomnia (FFI) (Gray *et al.*, 1999). Although its role is still controversial, apoptosis in prion diseases has been linked to the up-regulation of the pro-apoptotic factor Bax (BCL2 associated X) (Lyahyai *et al.*, 2006; Lyahyai *et al.*, 2007). Apoptosis can also be induced by chronic endoplasmic reticulum stress, which could activate pro-apoptotic pathways, such as IRE1 (inositol-requiring enzyme 1), ATF6 (activating transcription factor 6) or Akt/ PI3K (protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase). All of them are related to the chaperone BiP/GRP78 (binding immunoglobulin protein), reported to be overexpressed in this kind of diseases (Otero *et al.*, 2021). Moreover, prion protein has been directly linked to apoptosis since PrP^{Sc} aggregates have been associated with activation of caspase 3 and caspase 8 proteins, triggering caspase-dependent pathways and resulting in apoptosis (Kristiansen *et al.*, 2005).

Tetanus neurotoxin (TeNT), a protein produced by *Clostridium tetani*, is the causative agent of tetanus, a potentially fatal condition (Farrar *et al.*, 2000). TeNT toxicity depends on the presence of an L chain with metalloprotease activity (Schiavo *et al.*, 2000), but its targeting to the neuronal synapses relies only on a 50 kDa carboxy-terminal non-toxic fragment known as TTC which is not only required but sufficient for neuron binding and internalization (Herrerros, Lalli, & Schiavo, 2000), retrograde transport and transsynaptic transport (Herrerros, Lalli, Montecucco, *et al.*, 2000). Hence, TTC has been used for targeting therapeutic molecules to the CNS (Coen *et al.*, 1997), and several molecules such as the insulin-like growth factor 1 (IGF-1), the glial-derived neurotrophic factor (GDNF) or the brain derived neurotrophic factor (BDNF), among others, have been successfully transported into neurons by linking them to TTC (Chian *et al.*, 2009; Ciriza *et al.*, 2008; Larsen *et al.*, 2006). Moreover, further studies have

shown that TTC is more than a carrier, and it also has neurotrophic properties. TTC mimics the action of natural neurotrophic ligands by binding to Trk receptors and activating Trk-dependent signaling, which leads to the activation of neuronal survival pathways and apoptosis inhibition (Toivonen *et al.*, 2010). Even though the detailed mechanism on how TTC activates Trk receptors is not known, activation of neuroprotective pathways by TTC binding to these receptors has been demonstrated in both *in vivo* and *in vitro* studies (Gil *et al.*, 2000; Mendieta *et al.*, 2009). TTC alone delays the onset of symptoms and functional deficits in ALS murine models, decreasing motoneuron death and prolonging mice lifespan (Ciriza *et al.*, 2008; Moreno-Igoa *et al.*, 2009) and in mouse models of spinal muscular atrophy (SMA), where it modulates autophagy markers and reduces apoptosis (Olivan *et al.*, 2016).

The aim of the present study was to test TTC as a potential therapy for prion diseases. Considering the impact of autophagy and apoptosis in both prion diseases (López-Pérez *et al.*, 2020) and ALS (Moreno-Igoa *et al.*, 2009; Oliván *et al.*, 2015), in which TTC has shown therapeutic results, and the potential of TTC as an anti-apoptotic and autophagy-regulator molecule, we assessed the apoptotic and autophagic mechanisms in the CNS of prion diseased murine models treated with TTC.

Materials and methods

Murine clinical assay

Two models of mice were used: C57BL6 (expressing the wild-type variant of murine PrP^C) and Tg338 transgenic mice (overexpressing ~ 8 × the VRQ variant of ovine PrP^C) (Laude *et al.*, 2002). Twenty-four animals of the Tg338 mouse line were intracerebrally inoculated with a second passage of sheep scrapie in Tg338, while twelve C57BL6 mice were intracerebrally challenged with the scrapie strain 22L.

Each mouse line was separated into two different groups: a control group (Tg338 n = 12; C57BL6 n = 6) and a treated group (Tg338 n = 12; C57BL6 n = 6). The treated group was intramuscularly inoculated with 1 µg of TTC recombinant protein (Moreno-Martinez *et al.*, 2020) in the quadriceps muscle once a month, for 6 months, while the control group was intramuscularly inoculated with PBS following the same pattern.

Groups were sex-balanced, with approximately half males and half females in all of them. Following the experimental design performed in previously published assays with TTC in neurodegenerative diseases (Moreno-Igoa *et al.*, 2009; Moreno-Martinez *et al.*, 2020), no negative controls (prion uninfected mice, treated and untreated) were included since no neurodegeneration was supposed to appear at the ages the animals were sacrificed, and therefore no TTC-related effects were expected.

Mice were monitored daily for the onset of neurological signs. All animals were humanely euthanized by cervical dislocation when clinical signs of disease were detected (*i.e.* locomotor disorders, poor body condition and any signs of impaired feeding ability), and their brains collected. Brains were sagittally divided into two, and half of the brain was preserved in formaldehyde for its further use in histopathological and immunohistochemical analyses, while the other half was divided in two parts, one containing the frontal cortex, which was preserved frozen for further biomolecular analyses, and the other containing the rest of the areas, which was collected in RNeasy Lysis Solution for its use in gene expression analyses. No significant signs of distress or pain were observed in the animals other than those related to the onset of neurological signs, at which time they were euthanized. Kaplan–Meier survival curves were drawn and statistically significant differences in survival curves were assessed with the Mantel–Cox log-rank test ($p < 0.05$).

Histological and immunohistochemical analyses

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

antibody (1:500, Dako Agilent, Santa Clara, CA, USA), followed by development with NBT/BCIP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

To perform immunohistochemical and histopathological studies, sagittal sections from paraffin-embedded mouse brains (4 μ m thick) were cut and collected on glass slides and dried at 56 °C for 24 h. Immunohistochemistry was used for the detection of NeuN, the activated (cleaved) form of caspase-3, LC3B and p62 to assess neuronal survival, apoptosis, and autophagic mechanisms, respectively. Antigen retrieval was performed with citrate buffer (pH 6.0) for 10 min at 96 °C, and endogenous peroxidase activity was blocked using a blocking reagent (Dako Agilent) for 15 min. Next, sections were incubated with primary antibodies anti-LC3B (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, sc-271625), anti-p62 (1:200; Enzo LifeSciences, PW9860) and anti-NeuN (1:100, Abcam, Cambridge, UK, ab104224) during 1 h at room temperature and anti-caspase-3 (1:50; Santa Cruz Biotechnology, sc-56052) overnight at 4 °C. Then, samples were incubated with an enzyme-conjugated Envision polymer (Dako Agilent) for 30 min at room temperature and DAB (diaminobenzidine, Dako Agilent) was used as the chromogen. For each marker, all animals were stained in a single batch in order to reduce possible staining intensity differences due to the immunohistochemistry performance. The specificity of the immunohistochemical technique was determined by the absence of immunostaining in mouse brain sections in which the primary antibody incubation was omitted. Neuropathological changes and spongiform lesions were studied by hematoxylin–eosin staining.

Brain sections were examined using a Zeiss Axioskop 40 optical microscope. Evaluation was blindly performed in all animals, in nine encephalic areas: frontal cortex (Fc), septal area/striatum (Sa), Parietal cortex (Pc), hippocampus (Hc), thalamus (Th), hypothalamus (Ht), mesencephalon (Mes), medulla oblongata (Mobl) and cerebellum (Cbl) (Fraser & Dickinson, 1968). The cerebellum was not evaluated for LC3B, p62 and NeuN immunohistochemistry since no immunostaining was found in this area. Spongiosis and PrP^{Sc} deposition were semiquantitatively scored on a scale of 0 (lack of spongiosis/ PrP^{Sc} deposit) to 5 (very intense spongiosis/ PrP^{Sc} deposit) since semiquantitative evaluation is the standard method to assess these features (Fraser & Dickinson, 1973). Semiquantitative evaluation for spongiosis and PrP^{Sc} was performed

twice for each mouse and brain area. Caspase-3 staining was quantitatively evaluated by counting all the stained cells present in the whole sagittal section of each mouse brain at a 20 × magnification. LC3B, p62 and NeuN immunostaining was assessed using the Image J software. The Image J assessed markers staining was evaluated by the colour deconvolution method as previously described (Mustafa *et al.*, 2015), which measures both the number of stained cells and the intensity at once. Two photographs (taken at 10 × magnification) of each brain area per mouse were evaluated. The used chromogen in the immunohistochemistry techniques was diaminobenzidine (DAB), and therefore the images were subjected to colour deconvolution using the “H DAB” algorithm, and the “Colour_2” image (showing the DAB staining) intensity colour was measured by the “Mean gray value”. Once the mean gray value for each photograph was obtained, the resulting intensity values were converted to optical density by using the following formula: $OD = \log (\text{maximum intensity}/\text{mean intensity})$, therefore quantifying the average darkness of the image due to DAB signal. Since empty areas within the image can bias the results reducing the average OD, only photographs in which tissue occupied the whole area were analysed. Statistically significant differences were determined using the Mann–Whitney U test ($p < 0.05$).

Western blot analyses

Briefly, 25 µg of total protein from the frontal cortex of four mice per group were subjected to 10% SDS/PAGE and transferred to PVDF membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After blocking at 4 °C overnight with 2% bovine serum albumin (Thermo Fisher Scientific), the membranes were incubated for 1 h at RT with the following primary antibodies diluted in blocking buffer: mouse monoclonal antiMAP-LC3B (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, sc-271625) and rabbit polyclonal anti p62 (1:1000, Enzo Life Sciences, PW9860). Next, the membranes were incubated for 1 h at RT with a HRP conjugated secondary antibody diluted 1:4000 in blocking buffer (goat anti-mouse IgG-HRP for MAP-LC3, or goat anti-rabbit IgG-HRP for p62; Santa Cruz Biotechnology). After washing, Western blots were developed using the ECL Plus Western Blotting system (GE Healthcare, UK) and visualized with VersaDoc imaging system (Bio-Rad). After detection of the interest protein, β-actin immunodetection was also performed in both membranes to normalize band intensity quantification. Membranes were washed with

PBST for 1 h at room temperature and then incubated with mouse monoclonal anti β -actin antibody (1:2000, Bio-Rad, VMA00048) for 2 h at room temperature and developed as described above.

The image J software was also used to quantify band intensity in Western blots. For this purpose, each band was individually selected and circumscribed with the rectangular ROI (region of interest) selection and then “Gels” function was used, obtaining the corresponding histograms for each band. This was followed by quantification of the peak area of intensity of the histograms. Obtained values were normalized through the measure of the intensity of β -actin bands. Statistically significant differences were determined using the Student’s t test ($p < 0.05$).

Gene expression analyses

Four genes described to be involved in autophagy were selected for the analysis of their expression profile in the brain of mice: *Atg5* (autophagy related 5), *Becn1* (Beclin 1), *Fbxw7* (F-box/WD repeat-containing protein 7) and *Gas5* (growth arrest-specific 5). Gene expression was quantified in the thalamic area (including thalamus, hypothalamus and the surrounding area) of mice since it showed a high accumulation of PrP^{Sc} and high scores of spongiform changes in both mouse models. Sagittally cut sections of the thalamic area (thalamus, hypothalamus and surrounding area) were collected in RNAlater™ Solution (Thermo Fisher Scientific). Total RNA was obtained from 80 mg of this area using a RNeasy Lipid Tissue Mini kit (QIAGEN®, Venlo, the Netherlands) and following the manufacturer’s recommended protocol. Complementary DNA (cDNA) was obtained from 200 ng of total RNA using qScript™ cDNA Supermix (Quanta Biosciences™, Beverly, MA, USA). Resulting cDNA was diluted 1:5 in water for further analyses. The quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed with TaqMan probes (Thermo Fisher Scientific) used for the amplification of the selected genes. PCR reactions were performed using TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), and PCR was carried out in a StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) using universal conditions. All reactions were run in triplicate in a total volume of 5 μ L, using 2.25 μ L of diluted cDNA. The expression of two housekeeping genes (*H6pd*, *Sdha*) was used to normalize results. Relative gene expression quantification was subsequently determined using normalized data and relative

quantification was performed using the $2^{-\text{ddCt}}$ method. Differences between experimental groups were evaluated using an unpaired Student's t test (two-tailed), with significance at $p < 0.05$.

Results

Survival time, histopathological lesions and PrP^{Sc} deposition do not significantly variate after intramuscular injection of TTC in prion infected mice

All mice were sacrificed at the onset of clinical signs. Signs of disease in C57BL6 included severe ataxia and poor body condition, while Tg338 showed slight locomotor disorders, kyphosis and poor body condition. For C57BL6 mice, the mean survival time for the treated group ($n = 6$) was 164 ± 7 days, while for the control group ($n = 6$) was 157 ± 4 days. Regarding Tg338 mice, mean survival times were 192 ± 12 days for the treated group ($n = 12$) and 176 ± 16 days for the control group ($n = 12$). Although survival time means were higher for the treated group in both Tg338 and C57BL6, no significant differences between treated and control mice survival periods were found in any of the mouse lines when applying the Mantel-Cox log-rank test (Figure 1).

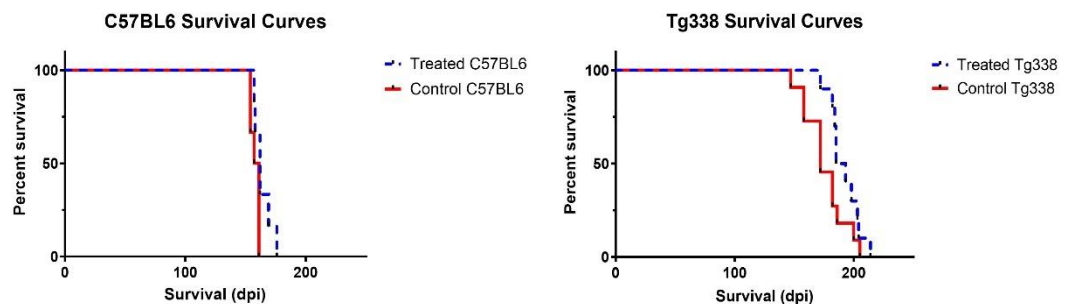


Figure 1. Effect of TTC injection in the survival of prion-infected mice. Figure shows Kaplan–Meier survival curves for C57BL6 mice and Tg338 mice. The Mantel–Cox log-rank test revealed no significant differences between groups.

Regarding prion-associated neuropathology, all mice of each line displayed similar neuropathological lesion profiles and PrP^{Sc} deposition patterns, despite belonging to the treated or control group. Spongiosis, the main histopathological lesion in prion diseases, was semiquantitatively evaluated in nine brain areas of all groups of

mice on a scale from 0, meaning an absence of vacuolization, to 5, meaning intense spongiosis (Figure 2A). Spongiform changes were mostly observed in the neuropil rather than in neurons. C57BL6 mice showed higher spongiform changes in cerebellum and thalamus, while in Tg338 mice the most severe lesions were observed in medulla oblongata, thalamus, hippocampus, parietal cortex and septal area/striatum (Figure 2B). Although treated mice seemed to display slightly lower lesion degrees in some brain areas in both C57BL6 and Tg338 mouse lines, no significant differences were found between the treated and control groups in any of the lines.

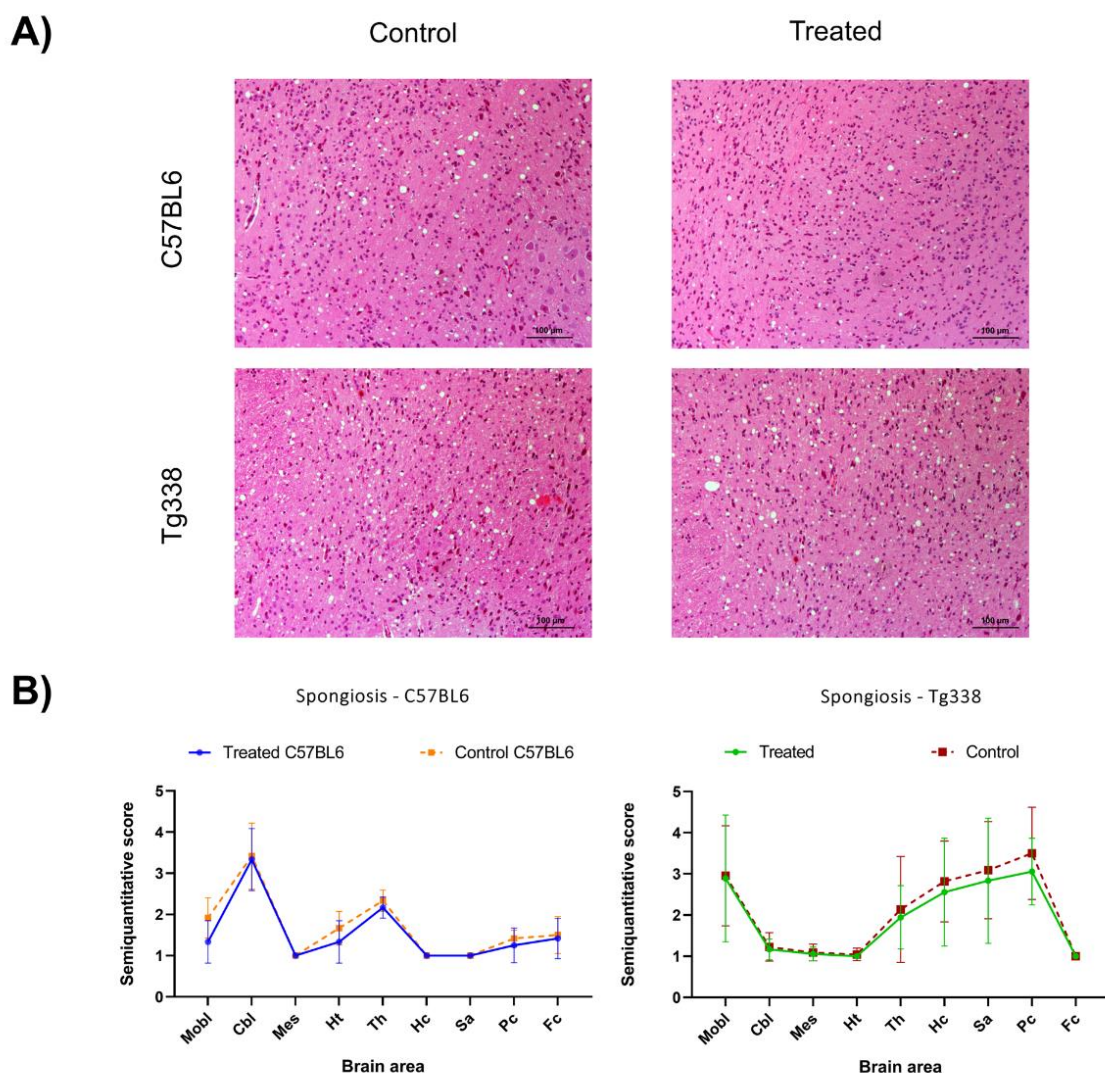


Figure 2. Spongiform changes in the brains of TTC-injected and control Tg338 and C57BL6 mice. A) Representative images of hematoxylin and eosin staining in the hypothalamus of clinical prion-infected C57BL6 and Tg338 mice. **B)** Graphics show comparisons of the semiquantitative evaluation (on a scale of 0, lack of spongiosis, to 5, very intense spongiosis) of these lesions in TTC-injected and control groups of

both mouse lines in medulla oblongata (Mobl), cerebellum (Cbl), mesencephalon (Mes), hypothalamus (Ht), thalamus (Th), hippocampus (Hc), septal area/striatum (Sa), Parietal cortex (Pc) and frontal cortex (Fc). Spongiosis levels are similar in the control and treated groups. No significant differences were found using the Mann–Whitney U test.

Concerning PrP^{Sc} deposits, evaluated by PET-Blot and semiquantitative scoring, C57BL6 mice showed higher deposition at the cerebellum, cortex, thalamus and hypothalamus, while in Tg338 mice deposition profiles were characterized by peak scores at the hypothalamus, thalamus, mesencephalon and medulla oblongata (Figure 3A). Deposition scores were similar in control and TTC-treated mice, and no statistically significant changes were detected comparing groups of each mouse line in any of the brain areas (Figure 3B).

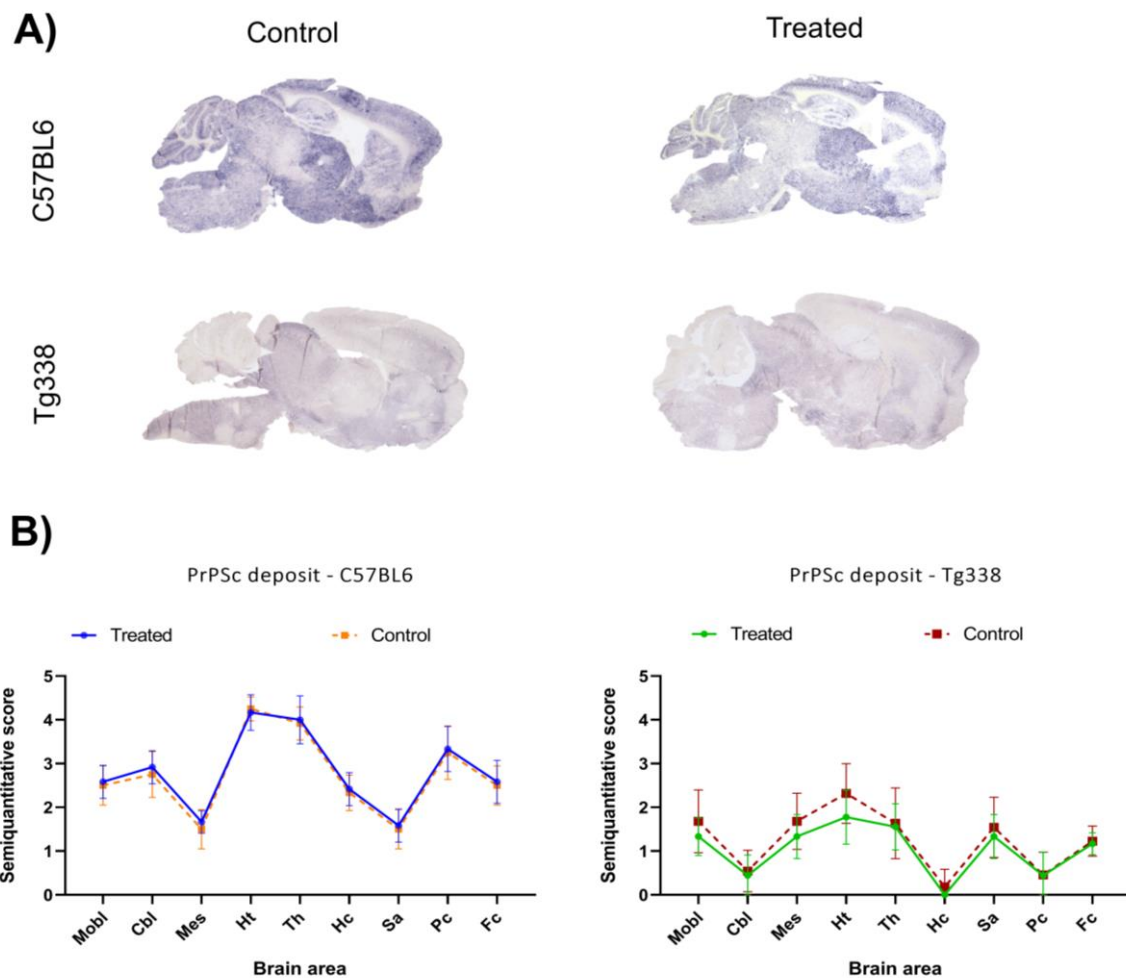


Figure 3. PrP^{Sc} deposition in the brains of Tg338 and C57BL6 mice TTC-injected and control groups. A) Representative images of PrP^{Sc} deposits detected by PET-blot method in the brain of C57BL6 and Tg338 mice. **B)** Graphics show comparisons of the semiquantitative evaluation (on a scale of 0, lack of staining,

to 5, staining present at maximum intensity) of these deposits in TTC-injected and control groups of Tg338 and C57BL6 mice in medulla oblongata (Mobl), cerebellum (Cbl), mesencephalon (Mes), hypothalamus (Ht), thalamus (Th), hippocampus (Hc), septal area/striatum (Sa), Parietal cortex (Pc) and frontal cortex (Fc). Mice belonging to each of the lines showed similar deposition scores. No significant differences of PrP^{Sc} deposition were found using the Mann–Whitney U test.

The pro-apoptotic activated form of caspase-3 is reduced in TTC-treated mice with a clinical prion disease

Immunohistochemical assessment of the active form of caspase-3 revealed an increase of apoptotic processes in non-treated mice compared to TTC-injected animals. Caspase-3 immunostaining revealed isolated immunopositive neurons scattered throughout the brain. Apoptotic nuclei were also observed in some stained cells. Stained neurons were quantified and the treated animals, both in line C57BL6 and in line Tg338, presented a significant lower number of apoptotic cells (Figure 4). When statistically compared with the Mann–Whitney U test, significant differences were found between the TTC-treated and control group in both mouse lines.

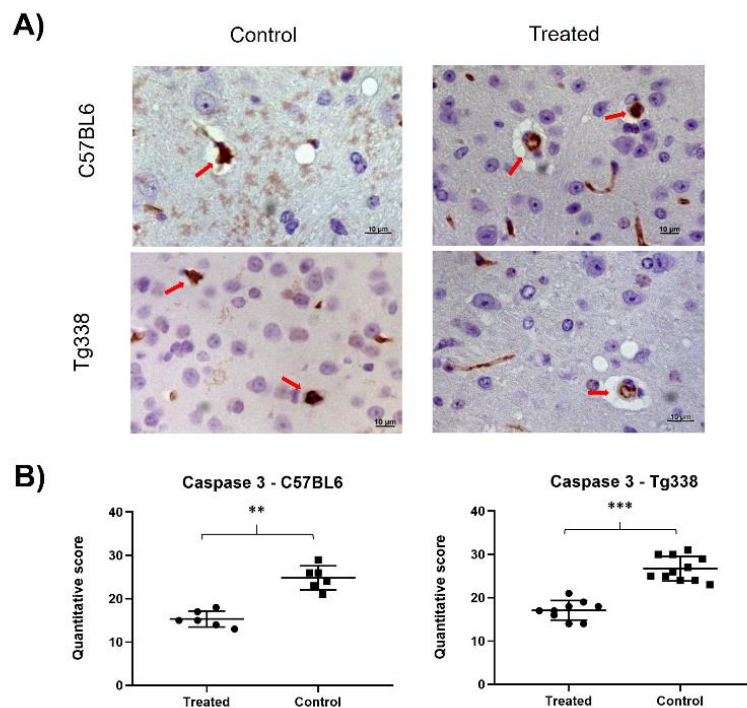


Figure 4. Caspase-3 expression levels in CNS are higher in control mice than in TTC-treated mice. A) Caspase-3 immunopositive cells (arrows) in the central nervous system of mice. **B)** Graphics show the quantitative determination of caspase-3 stained cells in the brains of treated and control groups of C57BL6

and Tg338 mice. Both mouse lines showed a lower number of immunopositive cells in the treated group, and significant differences appeared between groups when testing them with the Mann–Whitney U test (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$).

Mice treated with intramuscular injections of TTC show differential regulation of autophagy markers in the brain compared to controls

LC3B and p62 proteins were immunohistochemically evaluated in order to determine whether the injection of TTC influenced the regulation of autophagy in prion diseases. Immunohistochemical determination of these two autophagy markers revealed differential regulation of autophagic mechanisms in mice treated with TTC injection. Regarding LC3B, an increase of immunolabelling was noticed in all brain areas of both C57BL6 and Tg338 TTC-treated mice compared to their controls (Figure 5B). This difference was statistically significant after performing the Mann–Whitney U test in mesencephalon, hypothalamus, thalamus and parietal cortex in C57BL6 mice and in all the evaluated brain areas except the hippocampus in Tg338 mice. LC3B immunostaining pattern was defined by consistent intraneuronal labeling affecting most of the neurons and by diffuse staining of the neuropil. Although they showed the same pattern, the control groups displayed a lower number of stained cells along with lower immunostaining intensities (Figure 5A).

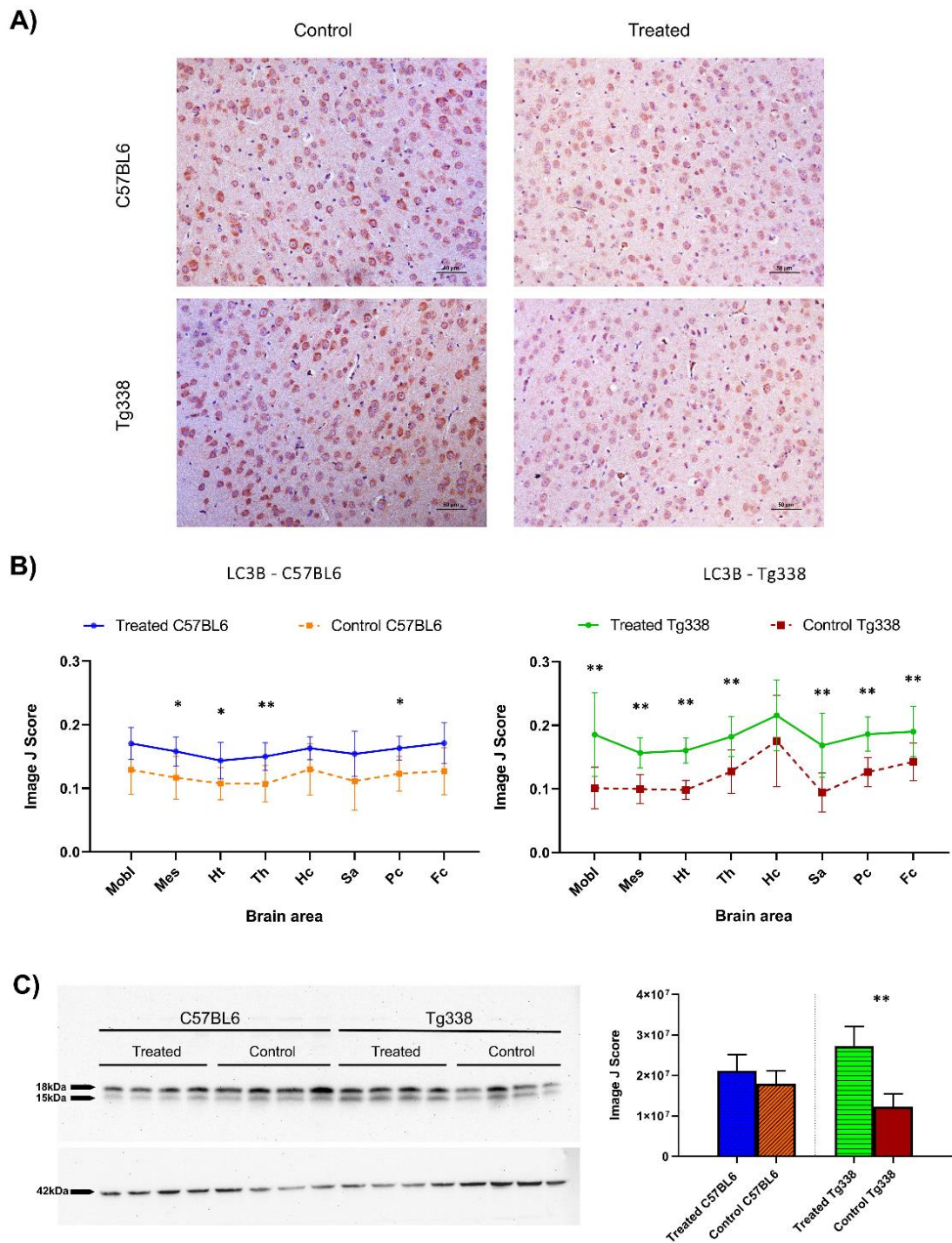


Figure 5. LC3B determination in Tg338 and C57BL6 prion infected mice after TTC intramuscular injection.

A) Different staining levels of LC3B immunostaining found in mice cerebral cortex, showing a cytoplasmic staining in neurons. **B)** Comparison of the evaluation through Image J software of the LC3B immunostaining in TTC injected and control groups of Tg338 and C57BL6 lines in medulla oblongata (Mobl), mesencephalon (Mes), hypothalamus (Ht), thalamus (Th), hippocampus (Hc), septal area/striatum (Sa), parietal cortex (Pc) and frontal cortex (Fc). Treated mice of both lines show higher LC3B

accumulation. Significant differences were studied using the Mann–Whitney U test ($*p < 0.05$ and $**p < 0.01$) and found in Mes, Ht, Th and Pc in C57BL6 mice and in Mobl, Mes, Ht, Th, Pc, Sa and Fc in Tg338 mice. **C)** Western Blot analyses of LC3B in the frontal cortex of the four groups of mice. Distinctive bands at ~ 18 kDa and ~ 15 kDa, corresponding to the lipidated and non-lipidated forms of LC3B. β -Actin immunodetection is shown at ~ 42 kDa. Significant differences were found between treated and untreated mice in the Tg338 line when using the Student's t test ($**p < 0.01$).

On the contrary, treated mice of both lines showed clearly lower accumulation of p62 in comparison to their respective controls. TTC-injected mice displayed lower immunostaining scores in all the CNS analysed areas in both mouse lines. Differences were significant in medulla oblongata, hypothalamus, thalamus, frontal cortex and parietal cortex in C57BL6 mice and, as in LC3B evaluation, all brain areas but the hippocampus in Tg338 mice (Figure 6B). The immunolabeling for p62 was characterized by neuronal and glial intracellular staining and granular staining of the neuropil. All mice presented this pattern, but treated mice showed lesser staining intensities and a lower number of stained cells (Figure 6A).

The specificity of the antibodies and protein expression of these two autophagy markers were also tested by Western Blot in the frontal cortex of both treated and untreated C57BL6 and Tg338 mice. LC3B immunoblot revealed two bands at ~ 18 kDa and ~ 15 kDa, corresponding to the lipidated and non-lipidated forms of this protein (Figure 5C). After signal band quantification of the interest proteins and normalization of the results by β -actin quantification, significant differences were found in the Tg338 line, where treated mice displayed higher protein levels than the control group, in agreement with the results of the immunohistochemistry. Regarding p62 immunoblot analyses, a single band at ~ 62 kDa was detected (Figure 6C), and significant differences were found for Tg338 mice, the control group showing higher expression levels of this protein than treated animals, also in accordance with the immunohistochemical analyses for this protein.

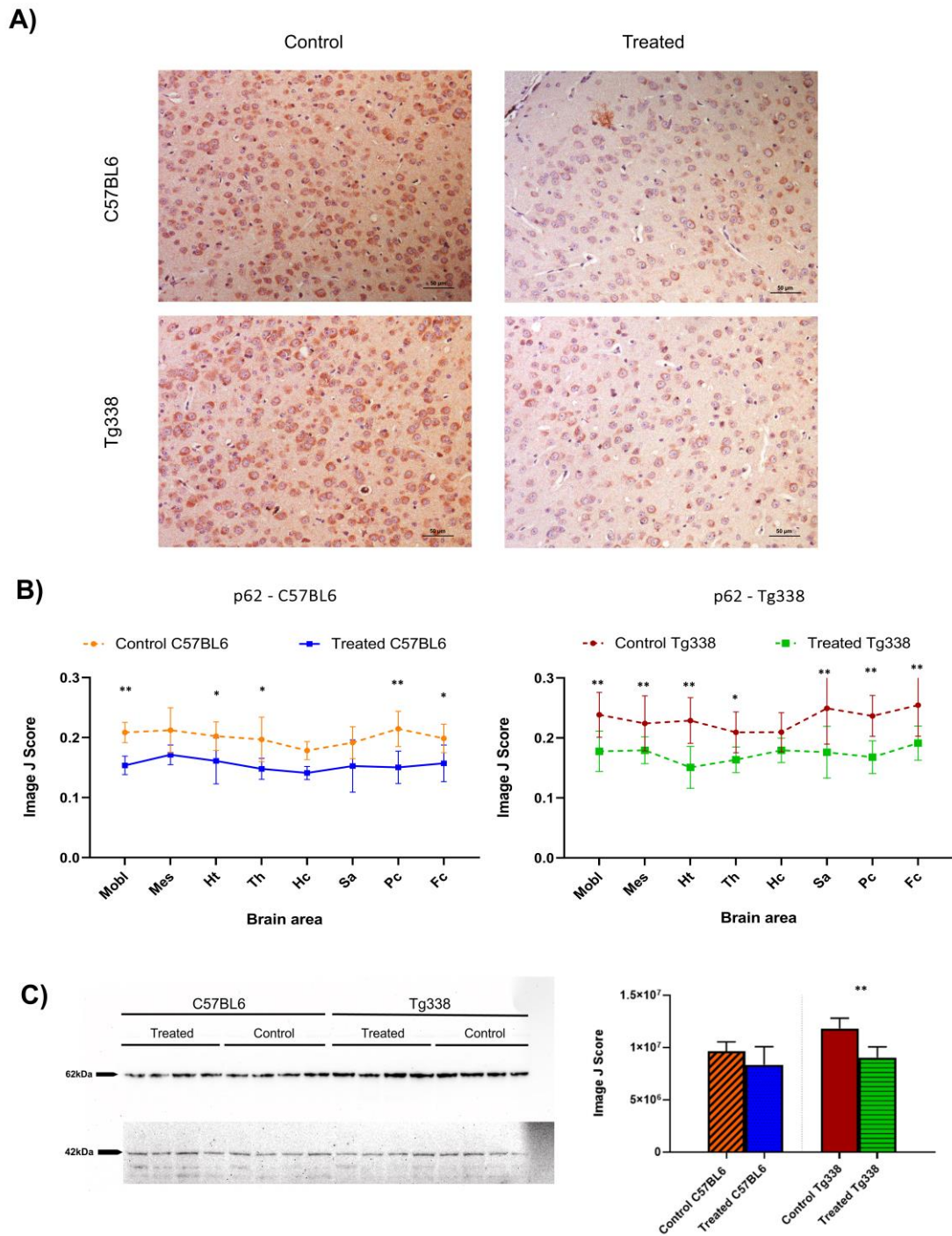


Figure 6. Assessment of p62 expression in Tg338 and C57BL6 prion infected mice after TTC intramuscular injection. A) Representative images of p62 immunostaining in cerebral cortex of mice, where a cytoplasmic labeling can be observed. **B)** Evaluation of p62 staining in brains of control and treated C57BL6 and Tg338 mice using the Image J software in the aforementioned brain areas. Treated mice of both lines displayed lower scores for p62 immunolabeling. Evaluation of significant differences was performed using the Mann–Whitney U test ($*p < 0.05$ and $**p < 0.01$) and significant differences were found in Mobl, Ht, Th, Pc and Fc in C57BL6 mice and in Mobl, Mes, Ht, Th, Pc, Sa and Fc in Tg338 mice. **C)** Western Blot for

the p62 protein in the frontal cortex different groups of mice. A single band at ~ 62 kDa confirms the specificity of the antibody. β -Actin immunodetection is shown at ~ 42 kDa. Significant differences were found between treated and untreated mice in the Tg338 line when using the Student's t test (** $p < 0.01$).

Four markers of autophagy (*Atg5*, *Becn1*, *Fbxw7* and *Gas5*) were analysed by real-time PCR in mice brain samples to determine their mRNA expression levels after TTC treatment. Expression of these genes was studied in the thalamic area (thalamus and hypothalamus) of Tg338 and C57BL6 TTC-treated and control mice. Figure 7 displays the mean dCt values of the analysed genes. *Becn1*, *Fbxw7* and *Gas5* displayed an upregulation and *Atg5* was downregulated in treated C57BL6 mice (Figure 7A). Differences in gene expression between TTC-treated and control mice were more remarkable in C57BL6 mice, where *Atg5* displayed a significant decrease of the expression ($p = 0.02$), while *Becn1* and *Fbxw7* showed a significant upregulation ($p = 0.0042$ and $p = 0.0043$, respectively) in the treated group. Significant changes were not detected in Tg338 mice (Figure 7B).

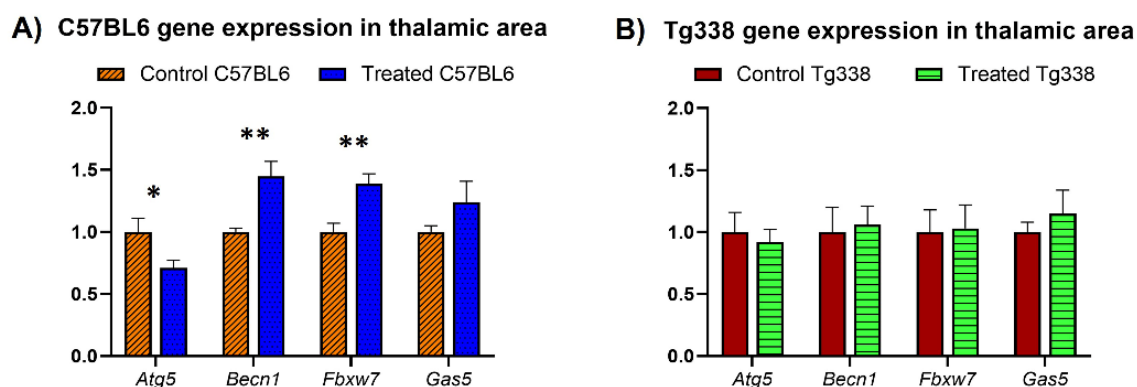


Figure 7. Autophagy-related gene expression profiles. mRNA expression profiles of *Atg5*, *Becn1*, *Fbxw7* and *Gas5* in the thalamus and hypothalamus of TTC-treated and controls C57BL6 and Tg338 mice. Relative expression levels are expressed as mean \pm standard deviation. Normalization of results was performed using the expression of *Sdha* and *H6pd* housekeeping genes. The expression values were determined using the 2^{-ddCt} method and differences between experimental groups were analysed using the Student's t test (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

Neuronal survival assessed through NeuN marker expression is higher in prion diseased mice treated with TTC

The NeuN protein is widely used to assess neuronal survival since it reflects the functional state of these cells. NeuN immunolabeling was observed as a strong immunolabeling of the nucleus along with a perinuclear staining affecting numerous cells (Figure 8A).

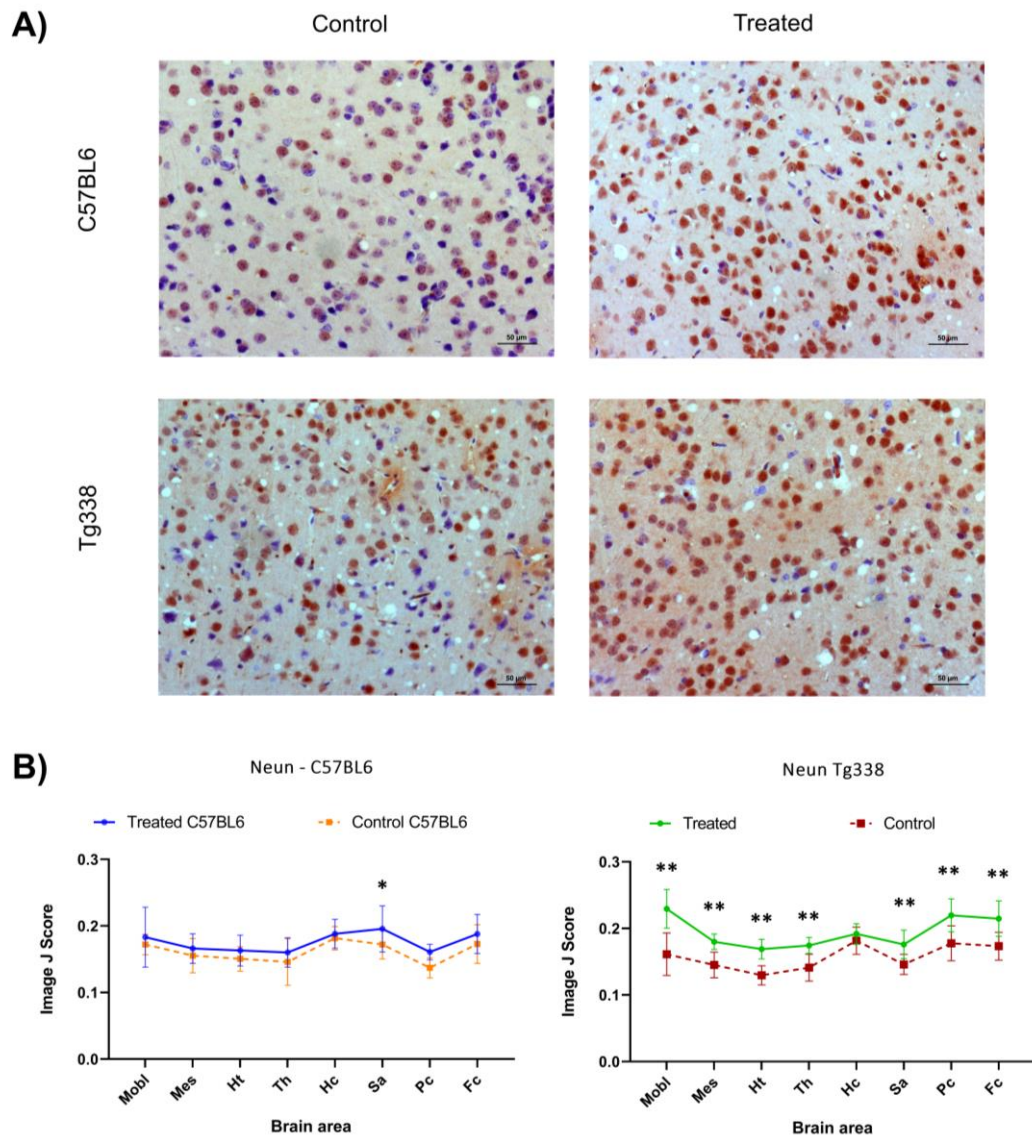


Figure 8. Immunohistochemical analyses of NeuN in the brains of TTC-injected and control Tg338 and C57BL6 mice. A) Representative pictures of different staining levels of NeuN immunostaining in cerebral cortex of C57BL6 and Tg338 mice, showing a nuclear and perinuclear staining in neurons. **B)** Comparison of the evaluation (using the Image J software) of the NeuN immunostaining in TTC-injected and control groups of Tg338 and C57BL6 lines in medulla oblongata (Mobl), mesencephalon (Mes), hypothalamus

(Ht), thalamus (Th), hippocampus (Hc), septal area/striatum (Sa), parietal cortex (Pc) and frontal cortex (Fc). A NeuN immunostaining increase was observed in all brain areas of treated mice, both in C57BL6 and Tg338 lines. Significant differences were evaluated using the Mann–Whitney U test ($*p < 0.05$ and $**p < 0.01$) and found in Sa in C57BL6 mice and in Mobl, Mes, Ht, Th, Pc, Sa and Fc in Tg338 mice.

Treated mice from both lines showed increased neuronal survival in all the analysed brain areas since the control group of both lines displayed a lower number of immunolabeled neurons. In C57BL6 mice, significant differences were found using the Mann–Whitney U test between the treated and control group in the septal area/striatum, while in Tg338 mice significant differences in NeuN expression appeared in all the analysed brain areas but the hippocampus (Figure 8B).

Discussion

Prion diseases are fatal neurodegenerative disorders in which the main pathogenic event is the conversion of PrP^C into PrP^{Sc}, leading to the accumulation of PrP^{Sc} in the central nervous system and therefore causing neuronal dysfunction and death resulting in spongiform degeneration. The neuroprotective role of the non-toxic C-terminal fragment of tetanus toxin has been related to antiapoptotic and pro-survival pathways, resembling neurotrophins, and demonstrated *in vitro* (Chaib-Oukadour *et al.*, 2004; Gil *et al.*, 2000) and *in vivo* in murine models of ALS and SMA (Ciriza *et al.*, 2008; Moreno-Igoa *et al.*, 2009; Olivan *et al.*, 2016). We report here the first assay with TTC in a model of prion-related neurodegeneration.

The role of apoptosis in prion-associated neurodegeneration is still unclear. This mechanism has been described in scrapie-infected mice several times (Giese & Kretzschmar, 2001; Kretzschmar *et al.*, 1997; Sisó *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 1997), and the activation of caspases and some alterations in apoptosis-related genes have been detected in the latest stages of human and animal prion diseases (Hetz, 2003; Lyahyai *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2009). Despite this, when challenging knock-out mice for the pro-apoptotic proteins caspase-12 or Bax with prions, no significant pathogenic changes or disease progression were found (Steele *et al.*, 2014; True-Krob & Chiesa, 2015). Hence, it has been suggested that in these diseases, apoptosis may not be especially

important for the onset and progression of the disease but a late process or, alternatively, that the main cell death mechanism in prion diseases might involve a non-apoptotic pathway (Mays & Soto, 2016).

TTC has been described as an anti-apoptotic molecule that binds to Trk receptors activating Trk-dependent signaling. This leads to the activation of pro-survival pathways such as MAPK/ERK and PI-3 K, which inhibit caspase-dependent apoptosis (Toivonen *et al.*, 2010). Reduction of apoptosis due to this molecule has already been described in ALS murine models, where decreased levels of the active form of caspase-3 after TTC injection have been reported (Moreno-Igoa *et al.*, 2009). In this study, we have observed that TTC also reduces caspase-3 related apoptosis in prion-infected mice. TTC treated-mice presented significantly lower levels of the active form of caspase-3 in their brains, thus confirming that, as in other neurodegenerative diseases, TTC could affect antiapoptotic pathways.

The cellular process of autophagy has several functions within we find response to nutrient starvation, intracellular clearance or elimination of pathogens (Mizushima & Hara, 2006), and it is also involved in the degradation of damaged proteins therefore being one of the most important protein homeostasis systems (Rubinsztein, 2006). These functions make autophagy a pro-survival mechanism, but it has also been reported to mediate a non-apoptotic cellular death (Kroemer & Jaattela, 2005). Due to this, the impairment of autophagy has been related to different pathologies, including neurodegenerative diseases (Larsen & Sulzer, 2002). Impaired protein homeostasis has been reported as one of the main causes of prion-associated toxicity (Goold *et al.*, 2015), and autophagy has been claimed to have a neuroprotective role against prion-mediated neurotoxicity (Aguzzi *et al.*, 2018; Forloni *et al.*, 2013; Goold *et al.*, 2015). Despite its initial cytoprotective role, it has also been proposed that when autophagy progresses unrestrained over a certain threshold, it might lead to the upregulation of cell death markers and activation of apoptosis or other cell death modalities (Mariño *et al.*, 2014).

The analysis of LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, which presents three isoforms — LC3A, LC3B and LC3C — and is present in the autophagosome membrane (Mizushima & Yoshimori, 2014)) and p62 (also known as SQSTM1, sequestosome 1, which acts as a substrate in autophagic degradation (Myeku &

Figueiredo-Pereira, 2011)) together is a good approach for the evaluation of autophagic activity (Niklaus *et al.*, 2017). LC3B is one of the most used markers to monitor autophagy in mammals (Suzuki *et al.*, 2014), and p62 accumulation reveals a dysregulation of autophagic mechanisms (Tanida, 2011). Moreover, the downregulation of LC3B and the accumulation of p62 have been reported in prion-infected clinical mice compared to non-diseased mice, suggesting an impairment of autophagy at the late stage of prion infection (López-Pérez, Toivonen, *et al.*, 2019). In our study, after TTC-injection, scrapie-diseased mice presented differences in the regulation of autophagy proteins compared to their controls. While LC3B showed an increase of immunolabelling in TTC-treated mice, p62 immunostaining intensity was lower in this group compared to their controls, which reflects an induction of autophagy as a result of this treatment. These differences were present in all the analysed brain areas, and in both Tg338 and C57BL6 mice.

To complement the autophagic-related protein expression studies, we assessed the autophagy at a gene-expression level through the analysis of the markers of autophagy *Becn1*, *Fbxw7*, *Gas5* and *Atg5* (López-Pérez *et al.*, 2020). After injection of TTC, we observed an upregulation of *Becn1*, *Fbxw7* and *Gas5* and a downregulation of *Atg5* transcripts. Downregulation of these positive autophagy gene regulators (*Becn1*, *Fbxw7*, *Gas5* and *Atg5*) has been described in the CNS of scrapie-infected mice (both wild-type or transgenic) and naturally scrapie infected sheep (López-Pérez, Otero, *et al.*, 2019; López-Pérez, Toivonen, *et al.*, 2019). Therefore, the observed upregulation of *Becn1*, *Fbxw7* and *Gas5* could reflect a recovery of autophagy dysregulation induced by prions after TTC injection. Gene expression differences were more noticeable in C57BL6 mice than in Tg338 mice. PrP^C seems to play a role in the regulation of the autophagic process (Shin *et al.*, 2013), and then overexpression of ovine PrP^C in Tg338 could affect autophagy modulation, at least at the transcript level as p62 and LC3B levels were similar in both models. Differences in autophagy-related proteins and gene expression under TTC treatment show an effect of TTC in the autophagic machinery regulation involved in prion diseases. Similarly, TTC alters/modulates autophagy mechanisms in muscle and spinal cord of murine SMA models (Olivan *et al.*, 2016) where TTC induces downregulation of p62 and *Atg5* as in our assay but, in contrast to our results, decreased

LC3 and *Becn1* levels. As mentioned above, the genetic background can be crucial in the response of animals to TTC treatment, mainly at the transcript level. This or the moment and tissue used for the analysis could explain these differences.

The NeuN protein, localized in the nucleus and perinuclear cytoplasm of most neurons in the central nervous system of mammals, reflects the functional state of these cells (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015) and therefore is used as a marker of neuronal survival. This neuronal marker has been reported to decrease in prion infected mice during prion disease due to severe neuronal loss (Jalland *et al.*, 2016). Our results show that NeuN immunolabelling was higher in scrapie diseased mice after TTC-injection in both mouse lines. Although sometimes mild, this increase on neuronal survival could be observed in all brain areas. The increase in neuronal survival could be observed in the treated group of both lines, but the statistical significance was higher in Tg338. The overexpression of PrP^C is known to affect several factors, from different molecular pathways (Rachidi *et al.*, 2003) to strain selection in prion diseases (Le Dur *et al.*, 2017). Moreover, PrP^C has been reported to display a neuroprotective role (Lo *et al.*, 2007). Therefore, Tg338 PrP^C overexpression could be affecting not only autophagy mechanisms, as previously proposed, but also the response of other survival pathways to TTC administration. The fact that neuronal survival was higher in the TTC-treated group even though spongiosis was similar in TTC-treated and control mice could be related to the reduction of the apoptosis observed in treated mice.

The finding that TTC affected apoptosis and autophagy and that this was linked to an increase on neuronal survival in TTC-treated mice suggests that TTC is able to reduce apoptosis and to regulate autophagy. Moreover, the differences in p62, LC3 and NeuN expression between control and TTC-injected groups could be observed in all brain areas, suggesting that TTC is able to diffuse to the whole brain.

Currently, there are no effective therapeutic or prophylactic treatments for prion diseases. Given the complex pathogenesis of these disorders, a wide variety of therapeutic strategies has been proposed, those aiming at reducing PrP^{Sc} accumulation being of special importance, since this protein is the underlying neurotoxic agent (Goold *et al.*, 2015). There is experimental evidence that the induction of autophagic activity through drugs reduces the levels of PrP^{Sc} (Heiseke *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2013), but it

has been observed that the administration of these drugs once neuroinvasion has already taken place does not cause a clear degradation of PrP^{Sc} deposits in the CNS. Thus, it is plausible that autophagic regulation after intracerebral prion inoculation does not lead to a decrease in PrP^{Sc} deposition. In agreement with this, we observed that, although TTC affects autophagy, it does not avoid PrP^{Sc} accumulation. This explains the fact that both TTC-treated and control mice developed similar PrP^{Sc} and spongiosis scores, and as a result their survival periods were similar. However, given the autophagy regulatory characteristics that TTC shows in prion disease models, further investigations on TTC effects after prion oral or intraperitoneal inoculation or in prioninfected cultured cells could be useful to elucidate the effects of TTC on autophagy in these diseases, and its connection with PrP^{Sc} propagation.

In summary, even though TTC has not affected vacuolation or PrP^{Sc} accumulation, it shows neuroprotective properties through the regulation of autophagic mechanisms and reduction of caspase-dependent apoptosis, thus leading to an increase of neuronal survival. These preliminary findings reinforce the role of TTC as a regulator of apoptosis and autophagy, and more importantly, as a neuroprotective molecule.

Ethics approval. C57BL6 mice were obtained from the breeding colony at CEETE (Zaragoza, Spain). The transgenic murine line Tg338 was developed by H. Laude and J.L. Vilette (INRA, Jouy-en-Josas, France) (Laude *et al.*, 2002). This line was provided by O. Andréoletti (ENVT-INRA, Toulouse, France) and was maintained and bred in our facilities. All procedures involving animals adhered to the guidelines included in the Spanish law for Animal Protection RD53/2013 and the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental purposes. The project was approved by the Ethics Committee for Animal Experiments from the University of Zaragoza and performed under their supervision.

References

- Aguzzi, A., Lakkaraju, A. K. K., & Frontzek, K. (2018). Toward Therapy of Human Prion Diseases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *58*(1), 331-351. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010617-052745
- Boellaard, J. W., Schlote, W., & Tateishi, J. (1989). Neuronal autophagy in experimental Creutzfeldt-Jakob's disease. *Acta Neuropathologica*, *78*(4), 410-418. doi: 10.1007/bf00688178
- Chaib-Oukadour, I., Gil, C., & Aguilera, J. (2004). The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin rescues cerebellar granule neurones from apoptotic death: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of Neurochemistry*, *90*(5), 1227-1236. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02586.x
- Chian, R.-J., Li, J., Ay, I., Celia, S. A., Kashi, B. B., Tamrazian, E., Matthews, J. C., Bronson, R. T., Rossomando, A., Pepinsky, R. B., Fishman, P. S., Brown, R. H., & Francis, J. W. (2009). IGF-1:Tetanus toxin fragment C fusion protein improves delivery of IGF-1 to spinal cord but fails to prolong survival of ALS mice. *Brain Research*, *1287*, 1-19. doi: 10.1016/j.brainres.2009.06.066
- Ciriza, J., García-Ojeda, M., Martín-Burriel, I., Agulhon, C., Miana-Mena, F., Muñoz, M., Zaragoza, P., Brûlet, P., & Osta, R. (2008). Antiapoptotic activity maintenance of Brain Derived Neurotrophic Factor and the C fragment of the tetanus toxin genetic fusion protein. *Open Life Sciences*, *3*(2). doi: 10.2478/s11535-008-0011-z
- Coen, L., Osta, R., Maury, M., & Brulet, P. (1997). Construction of hybrid proteins that migrate retrogradely and transynaptically into the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(17), 9400-9405. doi: 10.1073/pnas.94.17.9400
- Farrar, J. J., Yen, L. M., Cook, T., Fairweather, N., Binh, N., Parry, J., & Parry, C. M. (2000). Tetanus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *69*(3), 292-301. <https://doi.org/10.1136/jnnp.69.3.292>
- Forloni, G., Artuso, V., Roiter, I., Morbin, M., & Tagliavini, F. (2013). Therapy in prion diseases. *Curr Top Med Chem*, *13*(19), 2465-2476. doi: 10.2174/15680266113136660173
- Fraser, H., & Dickinson, A. G. (1968). The sequential development of the brain lesions of scrapie in three strains of mice. *Journal of Comparative Pathology*, *78*(3), 301-311. doi: 10.1016/0021-9975(68)90006-6
- Fraser, H., & Dickinson, A. G. (1973). Scrapie in mice. *Journal of Comparative Pathology*, *83*(1), 29-40. doi: 10.1016/0021-9975(73)90024-8
- Frost, B., & Diamond, M. I. (2010). Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, *11*(3), 155-159. doi: 10.1038/nrn2786

- Giese, A., & Kretzschmar, H. A. (2001). Prion-induced neuronal damage--the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies. *Curr Top Microbiol Immunol*, 253, 203-217. doi: 10.1007/978-3-662-10356-2_10
- Gil, C., Chaib-Oukadour, I., Pelliccioni, P., & Aguilera, J. (2000). Activation of signal transduction pathways involving trkA, PLCgamma-1, PKC isoforms and ERK-1/2 by tetanus toxin. *FEBS Lett*, 481(2), 177-182. doi: 10.1016/s0014-5793(00)02002-0
- Goold, R., McKinnon, C., & Tabrizi, S. J. (2015). Prion degradation pathways: Potential for therapeutic intervention. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 66, 12-20. doi: 10.1016/j.mcn.2014.12.009
- Gray, F., Chrétien, F., Adle-Biassette, H., Dorandeu, A., Ereau, T., Delisle, M.-B., Kopp, N., Ironside, J. W., & Vital, C. (1999). Neuronal Apoptosis in Creutzfeldt-Jakob Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58(4), 321-328. doi: 10.1097/00005072-199904000-00002
- Gusel'nikova, V. V., & Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*, 7(2), 42-47.
- Heiseke, A., Aguib, Y., & Schatzl, H. M. (2010). Autophagy, prion infection and their mutual interactions. *Curr Issues Mol Biol*, 12(2), 87-97.
- Herreros, J., Lalli, G., Montecucco, C., & Schiavo, G. (2000). Tetanus toxin fragment C binds to a protein present in neuronal cell lines and motoneurons. *J Neurochem*, 74(5), 1941-1950. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0741941.x
- Herreros, J., Lalli, G., & Schiavo, G. (2000). C-terminal half of tetanus toxin fragment C is sufficient for neuronal binding and interaction with a putative protein receptor. *Biochem J*, 347 Pt 1, 199-204.
- Hetz, C. (2003). Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *The EMBO Journal*, 22(20), 5435-5445. doi: 10.1093/emboj/cdg537
- Jalland, C. M. O., Scheffler, K., Benestad, S. L., Moldal, T., Ersdal, C., Gunnes, G., Suganthan, R., Bjørås, M., & Tranulis, M. A. (2016). Neil3 induced neurogenesis protects against prion disease during the clinical phase. *Scientific Reports*, 6(1). doi: 10.1038/srep37844
- Kretzschmar, H. A., Giese, A., Brown, D. R., Herms, J., Keller, B., Schmidt, B., & Groschup, M. (1997). Cell death in prion disease. *J Neural Transm Suppl*, 50, 191-210. doi: 10.1007/978-3-7091-6842-4_19
- Kristiansen, M., Messenger, M. J., Klöhn, P.-C., Brandner, S., Wadsworth, J. D. F., Collinge, J., & Tabrizi, S. J. (2005). Disease-related Prion Protein Forms Aggregates in Neuronal Cells

- Leading to Caspase Activation and Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38851-38861. doi: 10.1074/jbc.M506600200
- Kroemer, G., & Jaattela, M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer*, 5(11), 886-897. doi: 10.1038/nrc1738
- Larsen, K. E., Benn, S. C., Ay, I., Chian, R.-J., Celia, S. A., Remington, M. P., Bejarano, M., Liu, M., Ross, J., Carmillo, P., Sah, D., Phillips, K. A., Sulzer, D., Pepinsky, R. B., Fishman, P. S., Brown, R. H., & Francis, J. W. (2006). A glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF):tetanus toxin fragment C protein conjugate improves delivery of GDNF to spinal cord motor neurons in mice. *Brain Research*, 1120(1), 1-12. doi: 10.1016/j.brainres.2006.08.079
- Larsen, K. E., & Sulzer, D. (2002). Autophagy in neurons: a review. *Histol Histopathol*, 17(3), 897-908. doi: 10.14670/HH-17.897
- Laude, H., Vilette, D., Le Dur, A., Archer, F., Soulier, S., Besnard, N., Essalmani, R., & Vilotte, J.-L. (2002). New *in vivo* and *ex vivo* models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives. *Comptes Rendus Biologies*, 325(1), 49-57. doi: 10.1016/s1631-0691(02)01393-8
- Le Dur, A., Lai, T. L., Stinnakre, M.-G., Laisné, A., Chenais, N., Rakotobe, S., Passet, B., Reine, F., Soulier, S., Herzog, L., Tilly, G., Rézaei, H., Béringue, V., Vilotte, J.-L., & Laude, H. (2017). Divergent prion strain evolution driven by PrPC expression level in transgenic mice. *Nature Communications*, 8(1). doi: 10.1038/ncomms14170
- Liberski, P. P., Sikorska, B., Bratosiewicz-Wasik, J., Carleton Gajdusek, D., & Brown, P. (2004). Neuronal cell death in transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases) revisited: from apoptosis to autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(12), 2473-2490. doi: 10.1016/j.biocel.2004.04.016
- Llorens, F., Thüne, K., Sikorska, B., Schmitz, M., Tahir, W., Fernández-Borges, N., Cramm, M., Gotzmann, N., Carmona, M., Streichenberger, N., Michel, U., Zafar, S., Schuetz, A.-L., Rajput, A., Andréoletti, O., Bonn, S., Fischer, A., Liberski, P. P., Torres, J. M., Ferrer, I., & Zerr, I. (2017). Altered Ca²⁺ homeostasis induces Calpain-Cathepsin axis activation in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 5(1). doi: 10.1186/s40478-017-0431-y
- Lo, R. Y.-Y., Shyu, W.-C., Lin, S.-Z., Wang, H.-J., Chen, S.-S., & Li, H. (2007). New Molecular Insights into Cellular Survival and Stress Responses: Neuroprotective Role of Cellular Prion Protein (PrPC). *Molecular Neurobiology*, 35(3), 236-244. doi: 10.1007/s12035-007-8003-y

- López-Pérez, Ó., Badiola, J. J., Bolea, R., Ferrer, I., Llorens, F., & Martín-Burriel, I. (2020). An Update on Autophagy in Prion Diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. doi: 10.3389/fbioe.2020.00975
- López-Pérez, Ó., Otero, A., Filali, H., Sanz-Rubio, D., Toivonen, J. M., Zaragoza, P., Badiola, J. J., Bolea, R., & Martín-Burriel, I. (2019). Dysregulation of autophagy in the central nervous system of sheep naturally infected with classical scrapie. *Scientific Reports*, 9(1). doi: 10.1038/s41598-019-38500-2
- López-Pérez, Ó., Toivonen, J. M., Otero, A., Solanas, L., Zaragoza, P., Badiola, J. J., Osta, R., Bolea, R., & Martín-Burriel, I. (2019). Impairment of autophagy in scrapie-infected transgenic mice at the clinical stage. *Laboratory Investigation*, 100(1), 52-63. doi: 10.1038/s41374-019-0312-z
- Lyahyai, J., Bolea, R., Serrano, C., Monleón, E., Moreno, C., Osta, R., Zaragoza, P., Badiola, J. J., & Martín-Burriel, I. (2006). Correlation between Bax overexpression and prion deposition in medulla oblongata from natural scrapie without evidence of apoptosis. *Acta Neuropathologica*, 112(4), 451-460. doi: 10.1007/s00401-006-0094-4
- Lyahyai, J., Bolea, R., Serrano, C., Vidal, E., Pumarola, M., Badiola, J. J., Zaragoza, P., & Martín-Burriel, I. (2007). Differential expression and protein distribution of Bax in natural scrapie. *Brain Research*, 1180, 111-120. doi: 10.1016/j.brainres.2007.08.085
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., & Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), 81-94. doi: 10.1038/nrm3735
- Mays, C. E., & Soto, C. (2016). The stress of prion disease. *Brain Research*, 1648, 553-560. doi: 10.1016/j.brainres.2016.04.009
- Mendieta, L., Venegas, B., Moreno, N., Patricio, A., Martinez, I., Aguilera, J., & Limon, I. D. (2009). The carboxyl-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin prevents dopaminergic degeneration and improves motor behavior in rats with striatal MPP(+)-lesions. *Neurosci Res*, 65(1), 98-106. doi: 10.1016/j.neures.2009.06.001
- Mizushima, N., & Hara, T. (2006). Intracellular Quality Control by Autophagy: How Does Autophagy Prevent Neurodegeneration? *Autophagy*, 2(4), 302-304. doi: 10.4161/auto.2945
- Mizushima, N., & Yoshimori, T. (2014). How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy*, 3(6), 542-545. doi: 10.4161/auto.4600
- Moon, J.-H., Lee, J.-H., Md. Nazim, U., Lee, Y.-J., Seol, J.-W., Eo, S.-K., Lee, J.-h., & Park, S.-Y. (2016). Human prion protein-induced autophagy flux governs neuron cell damage in primary neuron cells. *Oncotarget*, 7(21), 29989-30002. doi: 10.18632/oncotarget.8802

- Moreno-Igoa, M., Calvo, A. C., Penas, C., Manzano, R., Oliván, S., Muñoz, M. J., Mancuso, R., Zaragoza, P., Aguilera, J., Navarro, X., & Osta Pinzolas, R. (2009). Fragment C of tetanus toxin, more than a carrier. Novel perspectives in non-viral ALS gene therapy. *Journal of Molecular Medicine*, *88*(3), 297-308. doi: 10.1007/s00109-009-0556-y
- Moreno-Martinez, L., de la Torre, M., Munoz, M. J., Zaragoza, P., Aguilera, J., Calvo, A. C., & Osta, R. (2020). Neuroprotective Fragment C of Tetanus Toxin Modulates IL-6 in an ALS Mouse Model. *Toxins*, *12*(5). doi: ARTN 33010.3390/toxins12050330
- Mustafa, H., El Awdan, S., Hegazy, G., & Abdel Jaleel, G. (2015). Prophylactic role of coenzyme Q10 and Cynara scolymus L on doxorubicin-induced toxicity in rats: Biochemical and immunohistochemical study. *Indian Journal of Pharmacology*, *47*(6). doi: 10.4103/0253-7613.169588
- Myeku, N., & Figueiredo-Pereira, M. E. (2011). Dynamics of the Degradation of Ubiquitinated Proteins by Proteasomes and Autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(25), 22426-22440. doi: 10.1074/jbc.M110.149252
- Nassif, M., & Hetz, C. (2014). Targeting autophagy in ALS: A complex mission. *Autophagy*, *7*(4), 450-453. doi: 10.4161/auto.7.4.14700
- Niklaus, M., Adams, O., Berezowska, S., Zlobec, I., Graber, F., Slotta-Huspenina, J., Nitsche, U., Rosenberg, R., Tschan, M. P., & Langer, R. (2017). Expression analysis of LC3B and p62 indicates intact activated autophagy is associated with an unfavorable prognosis in colon cancer. *Oncotarget*, *8*(33), 54604-54615. doi: 10.18632/oncotarget.17554
- Oliván, S., Calvo, A. C., Gasco, S., Muñoz, M. J., Zaragoza, P., & Osta, R. (2015). Time-Point Dependent Activation of Autophagy and the UPS in SOD1G93A Mice Skeletal Muscle. *PLoS One*, *10*(8). doi: 10.1371/journal.pone.0134830
- Oliván, S., Calvo, A. C., Rando, A., Herrando-Grabulosa, M., Manzano, R., Zaragoza, P., Tizzano, E. F., Aguilera, J., & Osta, R. (2016). Neuroprotective Effect of Non-viral Gene Therapy Treatment Based on Tetanus Toxin C-fragment in a Severe Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *9*. doi: 10.3389/fnmol.2016.00076
- Otero, A., Betancor, M., Erana, H., Fernandez Borges, N., Lucas, J. J., Badiola, J. J., Castilla, J., & Bolea, R. (2021). Prion-Associated Neurodegeneration Causes Both Endoplasmic Reticulum Stress and Proteasome Impairment in a Murine Model of Spontaneous Disease. *Int J Mol Sci*, *22*(1). doi: 10.3390/ijms22010465
- Pattison, I. H., & Jones, K. M. (1967). The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *Vet Rec*, *80*(1), 2-9. doi: 10.1136/vr.80.1.2

- Prusiner, S. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, *216*(4542), 136-144. doi: 10.1126/science.6801762
- Rachidi, W., Vilette, D., Guiraud, P., Arlotto, M., Riondel, J., Laude, H., Lehmann, S., & Favier, A. (2003). Expression of Prion Protein Increases Cellular Copper Binding and Antioxidant Enzyme Activities but Not Copper Delivery. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(11), 9064-9072. doi: 10.1074/jbc.M211830200
- Rubinsztein, D. C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, *443*(7113), 780-786. doi: 10.1038/nature05291
- Schiavo, G., Matteoli, M., & Montecucco, C. (2000). Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev*, *80*(2), 717-766. doi: 10.1152/physrev.2000.80.2.717
- Schulz-Schaeffer, W. J., Tschöke, S., Kranefuss, N., Dröse, W., Hause-Reitner, D., Giese, A., Groschup, M. H., & Kretzschmar, H. A. (2000). The Paraffin-Embedded Tissue Blot Detects PrPSc Early in the Incubation Time in Prion Diseases. *The American Journal of Pathology*, *156*(1), 51-56. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64705-0
- Serrano, C., Lyahyai, J., Bolea, R., Varona, L., Monleón, E., Badiola, J. J., Zaragoza, P., & Martín-Burriel, I. (2009). Distinct spatial activation of intrinsic and extrinsic apoptosis pathways in natural scrapie: association with prion-related lesions. *Veterinary Research*, *40*(5). doi: 10.1051/vetres/2009024
- Shin, H.-Y., Oh, J.-M., & Kim, Y.-S. (2013). The Functional Role of Prion Protein (PrPC) on Autophagy. *Pathogens*, *2*(3), 436-445. doi: 10.3390/pathogens2030436
- Sisó, S., Puig, B., Varea, R., Vidal, E., Acín, C., Prinz, M., Montrasio, F., Badiola, J., Aguzzi, A., Pumarola, M., & Ferrer, I. (2002). Abnormal synaptic protein expression and cell death in murine scrapie. *Acta Neuropathologica*, *103*(6), 615-626. doi: 10.1007/s00401-001-0512-6
- Steele, A. D., Hetz, C., Yi, C. H., Jackson, W. S., Borkowski, A. W., Yuan, J., Wollmann, R. H., & Lindquist, S. (2014). Prion Pathogenesis is Independent of Caspase-12. *Prion*, *1*(4), 243-247. doi: 10.4161/pri.1.4.5551
- Suzuki, H., Tabata, K., Morita, E., Kawasaki, M., Kato, R., Dobson, R. C., Yoshimori, T., & Wakatsuki, S. (2014). Structural basis of the autophagy-related LC3/Atg13 LIR complex: recognition and interaction mechanism. *Structure*, *22*(1), 47-58. doi: 10.1016/j.str.2013.09.023
- Tanida, I. (2011). Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal*, *14*(11), 2201-2214. doi: 10.1089/ars.2010.3482
- Toivonen, J. M., Olivan, S., & Osta, R. (2010). Tetanus toxin C-fragment: the courier and the cure? *Toxins (Basel)*, *2*(11), 2622-2644. doi: 10.3390/toxins2112622

- True-Krob, H. L., & Chiesa, R. (2015). The Elusive Role of the Prion Protein and the Mechanism of Toxicity in Prion Disease. *PLOS Pathogens*, *11*(5). doi: 10.1371/journal.ppat.1004745
- Williams, A., Lucassen, P. J., Ritchie, D., & Bruce, M. (1997). PrP Deposition, Microglial Activation, and Neuronal Apoptosis in Murine Scrapie. *Experimental Neurology*, *144*(2), 433-438. doi: 10.1006/exnr.1997.6424
- Xu, Y., Tian, C., Wang, S.-B., Xie, W.-L., Guo, Y., Zhang, J., Shi, Q., Chen, C., & Dong, X.-P. (2014). Activation of the macroautophagic system in scrapie-infected experimental animals and human genetic prion diseases. *Autophagy*, *8*(11), 1604-1620. doi: 10.4161/auto.21482
- Yao, H., Zhao, D., Khan, S. H., & Yang, L. (2013). Role of autophagy in prion protein-induced neurodegenerative diseases. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *45*(6), 494-502. doi: 10.1093/abbs/gmt022

ESTUDIO 2

Neurogranin and Neurofilament Light Chain as Preclinical Biomarkers in Scrapie

El texto que se describe a continuación corresponde con el artículo publicado en la revista científica International Journal of Molecular Sciences:

*Betancor M., Pérez-Lázaro S., Otero A., Marín B., Martín-Burriel I., Blennow K., Badiola J.J., Zetterberg H., Bolea R. (2022).
Int. J. Mol. Sci. doi: 10.3390/ijms23137182*

Neurogranin and Neurofilament Light Chain as Preclinical Biomarkers in Scrapie

Abstract

Prion diseases are diagnosed in the symptomatic stage, when the neuronal damage is spread throughout the central nervous system (CNS). The assessment of biological features that allow the detection of asymptomatic cases is needed, and, in this context, scrapie, where pre-symptomatic infected animals can be detected through rectal biopsy, becomes a good study model. Neurogranin (Ng) and neurofilament light chain (NfL) are proteins that reflect synaptic and axonal damage and have been studied as cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers in different neurodegenerative disorders. In this study, we evaluated Ng and NfL both at the protein and transcript levels in the CNS of preclinical and clinical scrapie-affected sheep compared with healthy controls and assessed their levels in ovine CSF. The correlation between these proteins and the main neuropathological events in prion diseases, PrP^{Sc} deposition and spongiosis, was also assessed. The results show a decrease in Ng and NfL at the protein and gene expression levels as the disease progresses, and significant changes between the control and preclinical animals. On the contrary, the CSF levels of NfL increased throughout the progression of the disease. Negative correlations between neuropathological markers of prion disease and the concentration of the studied proteins were also found. Although further research is needed, these results suggest that Ng and NfL could act as biomarkers for neurodegeneration onset and intensity in preclinical cases of scrapie.

Keywords

Prion · Prion diseases · Scrapie · Biomarkers · Neurodegeneration · Neurogranin · Neurofilament light chain

Introduction

Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs), also known as prion diseases, are fatal neurodegenerative disorders that include the different forms of Creutzfeldt–Jakob disease (CJD) in humans, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle, and scrapie in sheep and goats, among others (Prusiner, 1982). They are caused by prions, which induce the conversion of the cellular prion protein (PrP^C) into a misfolded form known as PrP^{Sc}, which accumulates in the central nervous system (CNS), leading to spongiform degeneration and neuronal loss (Wood *et al.*, 1997). Hitherto, in humans, prion diseases can only be identified and diagnosed in symptomatic patients (Hermann *et al.*, 2021); therefore, it is not known whether cerebrospinal fluid (CSF) tests would detect non-symptomatic patients of CJD. In sporadic CJD (sCJD), characterized by rapidly progressive dementia and ataxia (Puoti *et al.*, 2012), two established markers in the routine diagnostics are 14-3-3 and total tau in CSF, both considered as markers of neuronal damage (Otto *et al.*, 2002). Moreover, the real-time quaking-induced conversion assay (RTQuIC), which directly detects the pathogen, is used as a highly specific and sensitive test in CSF (Cramm *et al.*, 2015). In sheep scrapie, contrary to human cases, non-asymptomatic prion-infected animals can be easily detected by rectal biopsy (González *et al.*, 2008). A previous study (Llorens *et al.*, 2018) demonstrated that CSF 14-3-3, tau, and PrP seeding activity (RT-QuIC) tests can also be useful in the identification of cases of scrapie, even in preclinical stages. Moreover, this study found the 14-3-3 and tau concentrations to be higher in the CSF of preclinical animals compared with controls, suggesting that the underlying neurodegenerative mechanisms in prion diseases could be occurring in asymptomatic stages.

Neurogranin (Ng, formerly named p17, also known as RC3 and BICKS) is a 78 amino acid post-synaptic protein with a molecular weight of ~12 kDa (Nazir *et al.*, 2020; Xiang *et al.*, 2020). This protein is known to be principally expressed in the telencephalon of adult mammals, especially in the cerebral cortex, hippocampus, and striatum (Alvarez-Castelao & Schuman, 2015), as a neuronal postsynaptic protein, which is specifically located in the neuronal soma and dendrites (Represa *et al.*, 1990). Ng intracellularly binds to calmodulin (CaM) (Prichard *et al.*, 1999) and phosphatidic acid (PA) (Domínguez-González *et al.*, 2007), playing an important role in long-term

potentiation and enhancing synaptic plasticity and functioning (Xiang *et al.*, 2020), which are growing concerns in the pathogenesis of several neurological diseases (Bereczki *et al.*, 2017; Blennow *et al.*, 2019; De Vos *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2015). In mice, aging has been associated with a reduction in Ng expression, which has been implicated in age-related cognitive impairment (Mons *et al.*, 2008), and Ng knockout mice have presented deficits in spatial memory and long-term potentiation (Pak *et al.*, 2000), whereas the upregulation of Ng can restore and strengthen neuron connections and improve cognitive deficit (Jeon *et al.*, 2018; Zhong *et al.*, 2009). Blennow *et al.*, (2019), studied Ng as a neuronal damage marker in symptomatic CJD and Alzheimer's disease patients (AD), and found that the CSF Ng levels in CJD were increased compared with healthy controls and even with AD, thereby representing a good biomarker to differentiate CJD from AD. Ng expression in brain tissue was decreased in clinical CJD cases compared with controls, whereas its levels in CSF were higher in clinical cases. This results in a negative correlation between the protein concentrations in brain tissue and CSF, i.e., a potential mobilization of the protein from degenerating dendrites into the CSF. Moreover, in CJD, the CSF Ng concentration did not differ between the early and late stages of the disease, supporting that synaptic damage is an early event in prion diseases.

Neurofilaments (Nfs) are proteins of the cytoskeleton principally located in large, myelinated neurons. They play an important role in neurons, conferring structural stability to the axons, and are composed of three different subunits: neurofilament light chain (NfL, 68 kDa), neurofilament medium chain (NfM, 160 kDa), and neurofilament heavy chain (NfH, 200 kDa) (Yuan *et al.*, 2017). NfL is the most abundant and soluble subunit of Nfs, which makes it the most reliable Nfs subunit to be measured in biological fluids. When neuronal damage occurs, NfL is released to the interstitial fluid, which communicates with the CSF and the blood. Therefore, studying NfL as a biomarker for neurological diseases has gained attention, and this protein has been reported to be increased in blood and CSF in a variety of neurological disorders, such as AD, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), frontotemporal dementia (FTD), or multiple sclerosis (MS) (Gaetani *et al.*, 2019). Regarding prion diseases, NfL has been found to be increased in the CSF and blood of CJD clinical cases (Kanata *et al.*, 2019; Steinacker *et al.*, 2016;

van Eijk *et al.*, 2010). Moreover, NfL appears to be increased in the serum of preclinical sheep, pinpointing it as a potential biomarker for scrapie (Zetterberg *et al.*, 2019). However, further studies on NfL's behavior through the pathogenesis of prion diseases and, particularly, on its concentrations in preclinical cases are needed.

As previously mentioned, currently, in humans, prion diseases are diagnosed in the symptomatic stage (Hermann *et al.*, 2021). At this stage, the neuronal damage is already massive, and the benefit of possible treatments would be limited. Hence, the assessment of biological features allowing the detection of asymptomatic cases is needed. In this context, scrapie, where preclinical animals can be detected through rectal biopsy (González *et al.*, 2008), becomes a good model to evaluate the biomarkers of naturally occurring prion disease in its early stages. Since synaptic and axonal damage are believed to be early pathogenic events in prion diseases (Hilton *et al.*, 2013; Soto & Satani, 2011), biomarkers that reflect early dysfunction at these levels might be valuable for early diagnosis. The CSF and the CNS are directly in contact, the former reflecting the latter's biochemistry and pathophysiology status; therefore, potentially promising biomarkers might be studied in both nervous tissue and the CSF. Thus, our hypothesis is that the markers of synaptic and axonal damage will be reduced in brain tissue and increased in the CSF as the disease progresses, and that this change will be noticeable, even in the preclinical stages, reflecting the neuropathological events occurring in prion diseases. Therefore, the objective of this study is to evaluate Ng and NfL in the brain tissue and CSF of preclinical and clinical sheep naturally affected with scrapie, and compare the results with those obtained in healthy controls.

Materials and Methods

Animals and sample collection

A total of 21 female *Rasa Aragonesa* sheep, aged between 4 and 6 years, were included in this study. These animals belonged to three different groups in terms of their classical scrapie condition: clinical, preclinical, and uninfected. All animals displayed an ARQ/ARQ genotype regarding the *PRNP* gene. Control animals (n = 8) were selected from a herd in which no scrapie cases had been reported. Scrapie-infected animals, both

clinical (n = 8) and preclinical (n = 5), were obtained from two different scrapie-affected herds. Characteristics from each animal are detailed in the supplementary materials (Table S1). Sheep in the preclinical stage were identified by immunohistochemical analyses of rectal mucosa biopsies (González *et al.*, 2008) and sacrificed by pentobarbital overdose before clinical signs were detectable. Animals in the clinical stage were identified by the observation of scrapie associated clinical signs, which included pruritus and scratching of the tail root, lumbar area, and limbs, neurological signs, such as ataxia and head tremors, teeth grinding, wool loss, and cachexia. Clinical animals were confirmed to be scrapie-positive by the detection of PrP^{Sc} in the brain by immunohistochemical analyses.

Once the animals were sacrificed, two replicate samples from nine different areas of the CNS (frontal cortex, basal ganglia, parietal cortex, thalamus, occipital cortex, hippocampus, mesencephalon, obex, and spinal cord) were collected in formaldehyde (10%) and embedded in paraffin for further use in histopathological and immunohistochemical analyses or preserved by freezing for further biomolecular analyses. In addition, samples from four areas (frontal cortex, thalamus, hippocampus, and obex) were collected in RNAlaterTM solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for use in gene expression analyses, and 1 mL to 1.5 mL of the CSF from each animal was collected and conserved by freezing at -80°C for further analyses.

Histological and immunohistochemical analyses

To perform immunohistochemical and histopathological studies, paraffin-embedded sections from the nine previously mentioned areas (4 µm thick) were used. Neuropathological changes and spongiform lesions were studied by hematoxylin–eosin staining. PrP^{Sc} was detected using the monoclonal primary antibody L42 (1:500, R-Biopharm, Darmstadt, Germany) after formic acid treatment and proteinase K digestion, as previously described (Monleon *et al.*, 2004).

Immunohistochemistry for the detection of Ng and NfL was performed after antigen retrieval with citrate buffer (pH 6.0) for 20 min at 96°C, and endogenous peroxidase activity blocking using a precast solution (Dako Agilent, Glostrup, Denmark). Sections were incubated with the primary antibodies Ng36 (1:400; in-house generated, Department of Psychiatry and Neurochemistry, Mölndal, Sweden (Kvartsberg *et al.*,

2019)) or anti-NfL (1:500, Dako Agilent, Glostrup, Denmark, M076229-2) overnight at 4°C. Then, the samples were incubated with an anti-mouse enzyme-conjugated Envision polymer (Dako Agilent, Glostrup, Denmark) for 30 min at room temperature (RT). DAB (diaminobenzidine, Dako Agilent, Glostrup, Denmark) was used as the chromogen. To reduce possible staining intensity differences due to the immunohistochemistry performance, all animals were stained in a single batch for each marker and area. Negative controls were performed both by using an IgG1 isotype control antibody (mouse IgG1, kappa monoclonal (MOPC-21)—isotype control, ab18443, Abcam, Cambridge, UK) and by the omission of the primary antibody.

Brain sections were examined using a Zeiss Axioskop 40 optical microscope (Zeiss, Jena, Germany). All samples were blindly analyzed. Spongiosis and PrP^{Sc} deposition were semiquantitatively evaluated twice per area by scoring on a scale of 0 (lack of spongiosis/ PrP^{Sc} deposit) to 5 (very intense spongiosis/ PrP^{Sc} deposit) following the standard method to assess these features (Fraser & Dickinson, 1973). Ng and NfL immunostainings were assessed using the Image J software. Two photographs of each brain area per sheep were evaluated. The Image J color deconvolution method, measuring both the number of stained cells and the immunostaining intensity, was used as previously described (Betancor *et al.*, 2021).

Cerebrospinal fluid analyses

CSF NfL concentration was measured using an in-house enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the NfL21 and NfL23 monoclonal antibodies, as described in detail elsewhere (Gaetani *et al.*, 2018). An in-house ELISA based on the Ng2 and Ng36 monoclonal antibodies, as previously described in detail (Kvartsberg *et al.*, 2019), was used for CSF Ng measurement. The measurements were performed in one round of experiments by a board-certified laboratory technician who was blinded to diagnostic information. Intra-assay coefficients of variation were below 10%.

Western blot analyses

Twenty-five micrograms of total protein from the frontal cortex of four sheep per group (clinical, preclinical, and controls) were subjected to electrophoresis in 10% SDS/PAGE gels and transferred to PVDF membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After

blocking at room temperature for 1 h with 2% bovine serum albumin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), the membranes were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies Ng36 (1:2000; in-house generated, Department of Psychiatry and Neurochemistry, Mölndal, Sweden) and anti-NfL (1:1000, Dako Agilent, Glostrup, Denmark, M076229-2) against Ng and NfL, respectively, diluted in PBST (1X phosphate-buffered saline, 0.1% Tween). After that, the membranes were incubated for 1 h at RT with an HRP-conjugated secondary antibody diluted 1:5000 in PBST (goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Membranes were washed and then the signal was developed using the ECL Plus Western Blotting system (GE Healthcare, UK) and visualized with the VersaDoc imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Gene expression analyses

The expression profile of the genes neurogranin (*NRGN*) and neurofilament light chain (*NEFL*) was assessed in four brain areas (frontal cortex, thalamus, hippocampus, and obex). The total RNA was obtained from 100 mg of tissue preserved in RNAlater™ Solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using a RNeasy Lipid Tissue Mini kit (QIAGEN®, Venlo, The Netherlands) following the manufacturer's recommended protocol. Complementary DNA (cDNA) was obtained from 1 µg of total RNA using qScript™ cDNA Supermix (Quanta Biosciences™, Beverly, MA, USA), and the resulting cDNA was diluted 1:5 in pure water for further analyses. Primers for *NRGN* and *NEFL* were designed by using the Primer3Plus tool (Untergasser *et al.*, 2012). To make them cDNA-specific, the primers were designed to expand exon–exon junctions. The quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed using SYBR® Green master mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) and carried out in a StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using universal conditions. All reactions were run in triplicate in a total volume of 10 µL using 2 µL of diluted cDNA. The expression of the housekeeping genes GAPDH and SDHA was measured using previously described primer sequences and conditions (Lyahyai *et al.*, 2010) and used to normalize the results. Relative gene expression quantification was then performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The sequences, accession numbers, and concentrations of the used primers can be found in Table 1.

Table 1. Primers used in the gene expression analyses.

Gene	Forward (F) and Reverse (R) Primer Sequence (5'-3')	Concentration (nM)	Accession number
NRGN	F AACCTCCATCCCAGCCAAG	400	XM_027959688.2
	R CCCGAAACTCGCCTGTA	400	
NEFL	F CATTAGCGCTATGCAGGACA	400	XM_015093090.3
	R GCTGCAATCTCAATGTCCAA	400	
GAPDH	F TCCATGACCACTTTGGCATCGT	900	AF_035421
	R GTCTTCTGGGTGGCAGTGA	900	
SDHA	F CATCCACTACATGACGGAGCA	300	AY_970969
	R ATCTTGCCATCTTCAGTTCTGCTA	300	

Data analysis and statistics

SPSS (SPSS Statistics for Windows, Version 17.0, Chicago, IL, USA) software was used for the statistical analyses. Graphs were generated with GraphPad Prism 8.0 (San Diego, CA, USA). All quantitative data were tested for normality with the Shapiro–Wilk test. Between-group differences in histological and immunohistochemical scores, as well as in the CSF protein levels, were determined using the one-way analysis of variance (ANOVA) test followed by the Bonferroni *post hoc* test. Statistical analyses of the qPCR data were conducted by comparing the mean dCt values for each gene. For the statistical comparison, the one-way ANOVA test followed by the Bonferroni *post hoc* test was also used. Differences between groups were considered to be significant at $p < 0.05$. Spearman's ρ correlation was used to assess the correlation between prion-related lesions and the expression of the studied proteins.

Results

Ng expression is downregulated in scrapie-infected sheep

An immunohistochemical assessment of Ng expression was performed in the frontal cortex, basal ganglia, parietal cortex, thalamus, occipital cortex, hippocampus, mesencephalon, obex, and spinal cord of the three groups of sheep (clinical, preclinical, and controls). The resulting immunostaining pattern was defined by a uniform intraneuronal labeling that affected most of the neurons and by a slight diffuse staining

of the neuropil. This pattern was consistent in the three groups of sheep, though, in general, the control group displayed a higher number of stained cells along with higher immunostaining intensities, followed by the preclinical animals, and clinical sheep showed the weakest staining (Figure 1A).

The Ng immunolabeling scores were measured using Image J software and displayed a trend to be higher in the control group compared with the clinical and preclinical sheep for all of the studied brain areas, except for the hippocampus (Figure 1B). In addition, Ng immunostaining was more intense in preclinical sheep compared with the clinical animals in most brain areas. Statistically significant differences were detected between the negative and clinical animals in all areas except for the hippocampus and spinal cord. The negative and preclinical groups showed significant differences in the thalamus ($p < 0.01$), obex, and parietal cortex ($p < 0.05$). No differences were found between the preclinical and clinical animals, though a tendency was observed at the parietal cortex ($p = 0.05$). Figure S1 shows a schematic map of the brain displaying the degree of Ng upregulation. The specificity of the Ng36 antibody, which was used against Ng in sheep nervous tissue, was confirmed by Western blot in the frontal cortex of the preclinical, clinical, and control sheep. Ng36 revealed a single band at ~12 kDa, corresponding to Ng's molecular weight (Figure 1C).

The expression of the Ng-encoding gene (*NRGN*) was analyzed by quantitative PCR in four brain areas (obex, hippocampus, thalamus, and frontal cortex) of the three sheep groups to determine their mRNA expression levels throughout the course of the disease. Figure 1D displays the mean dCt values of *NRGN*. The preclinical and clinical animals displayed a tendency toward the downregulation of the gene compared with controls in three of the studied brain areas (obex, thalamus, and frontal cortex), this being stronger in the clinical group, thus reflecting a trend toward decreasing regulation as the disease progressed. Significant differences were detected between the clinical and control animals at the thalamus level ($p < 0.05$)

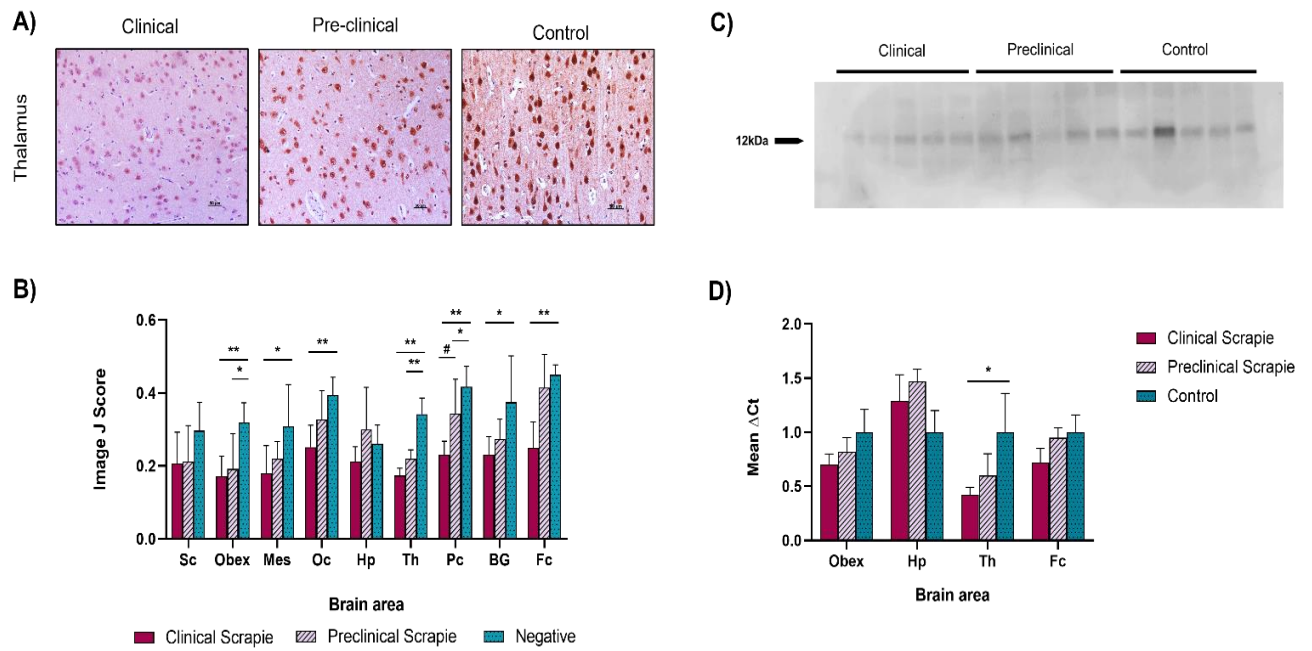


Figure 1. Assessment of Ng expression in clinical and preclinical scrapie-infected sheep and control sheep. **A)** Representative images of Ng immunostaining from clinical (n = 8), preclinical (n = 5), and control (n = 8) sheep, where cytoplasmic labeling is observed. **B)** Evaluation of Ng staining in the brains of clinical, preclinical, and control animals using Image J software in the spinal cord (Sc), obex, mesencephalon (Mes), occipital cortex (Oc), hippocampus (Hp), thalamus (Th), parietal cortex (Pc), basal ganglia (BG), and frontal cortex (Fc). Control sheep showed the highest scores in most of the assessed areas (except the hippocampus), followed by preclinical animals, while clinical sheep displayed the lowest scores in all brain areas. Evaluation of differences between groups was performed using the one-way ANOVA test followed by the Bonferroni *post hoc* test (# $p = 0.05$, * $p < 0.05$, and ** $p < 0.01$). The data shown in the figure represent the mean and the standard error of the mean (mean ± SEM). **C)** Western blot analyses for Ng in the frontal cortex of different groups of sheep using the Ng36 antibody. The detection of a band at ~12 kDa confirms the specificity of the antibody. **D)** mRNA expression profiles of the Ng-encoding gene in the obex, hippocampus, thalamus, and frontal cortex of clinical, preclinical, and control sheep. Relative expression levels are expressed as the mean ± standard deviation. Normalization of the results was performed using the expression of *SDHA* and *GAPDH* housekeeping genes. The expression values were determined using the $2^{\Delta\Delta Ct}$ method, and differences between experimental groups were analyzed using the one-way ANOVA test, followed by the Bonferroni *post hoc* test (* $p < 0.05$).

NfL expression is downregulated in most brain areas of scrapie-infected sheep

NfL protein expression was immunohistochemically assessed in the same areas as described for Ng. The observed immunolabeling pattern was characterized by a consistent staining of the neuropil and grey matter and intracytoplasmic staining in some neurons, especially located in dendrites. This immunostaining pattern was

observed in the three analyzed groups, although higher immunolabeling intensities were found in the control group, and lower intensities were observed in the clinical group in all of the studied brain areas (Figure 2A).

The immunolabeling intensity was measured using Image J software (Rasband, W.S., U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and the assessment of the differences between groups was performed using the one-way ANOVA test in each brain area (Figure 2B). In all of the assessed brain areas, the immunostaining intensity for NfL was higher in the control group, followed by preclinical animals and clinical animals, which exhibited the lowest intensities. After performing statistical analyses, significant differences were observed between negative and clinical animals in the obex, mesencephalon, thalamus, parietal cortex, basal ganglia, and frontal cortex ($p < 0.01$). Negative and preclinical animals showed significant differences in the thalamus and obex ($p < 0.05$), and clinical and preclinical sheep in the mesencephalon and parietal cortex ($p < 0.05$).

The specificity of the anti-NfL (M076229-2, Dako Agilent, Glostrup, Denmark) antibody against NfL in sheep nervous tissue was tested by Western blot in the frontal cortex of preclinical, clinical, and control sheep, revealing a single band at ~68 kDa, corresponding to NfL (Figure 2C).

Quantitative PCR was performed to assess the expression of *NEFL*, the gene that encodes the NfL protein, in the four brain areas previously used to study *NRGN* expression (obex, Hp, Th, and Fc) in the three study groups. Figure 2D shows the mean dCt values of *NEFL*. Although no significant differences were found between groups, in the obex and thalamus, we can observe a tendency toward the downregulation of *NEFL* as the disease progressed. Similar levels of expression were found in the frontal cortexes of clinical, preclinical, and control sheep.

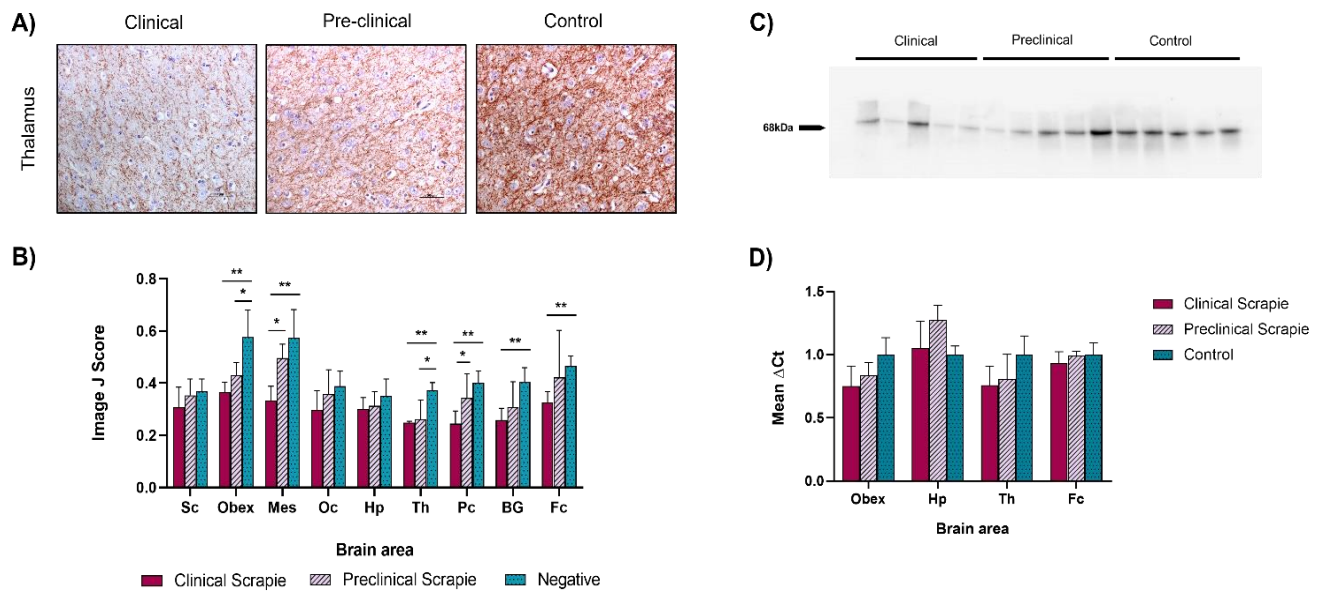


Figure 2. Study of NfL expression scrapie-infected and control sheep. **A)** Images show the immunostaining pattern for NfL found in the thalamus of the different study groups: clinical (n = 8), preclinical (n = 5), and control (n = 8) sheep. Axonal and dendritic labeling can be observed. **B)** Comparison of NfL Image J scores in the different studied brain areas of the three sheep groups: spinal cord (Sc), obex, mesencephalon (Mes), occipital cortex (Oc), hippocampus (Hp), thalamus (Th), parietal cortex (Pc), basal ganglia (BG), and frontal cortex (Fc). Control sheep exhibited the highest scores in all brain areas, followed by preclinical animals, while clinical sheep showed the lowest scores. Evaluation of differences between groups was performed using the one-way ANOVA test followed by the Bonferroni *post hoc* test (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$). Data represent the mean \pm SEM. **C)** Western blot analyses for NfL in the frontal cortex of sheep. Samples corresponding to the frontal cortices of clinical, preclinical, and negative sheep were analyzed. A single band at ~68 kDa was detected, confirming the specificity of the anti-NfL antibody. **D)** Figure showing the mRNA expression profiles of the NfL-encoding gene in the obex, hippocampus, thalamus, and frontal cortex of the three groups of sheep. Relative expression levels are expressed as the mean \pm standard deviation. The results were normalized using the expression of SDHA and GAPDH housekeeping genes. The expression values were determined using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, and differences between experimental groups were assessed using the one-way ANOVA test followed by the Bonferroni *post hoc* test. No significant differences were found.

Scrapie-related neuropathological features in sheep and correlation with Ng and NfL protein expression

PrP^{Sc} deposition in sheep brains was evaluated by immunohistochemistry and semiquantitatively scored (from 0, meaning no PrP^{Sc} staining, to 5, meaning intense PrP^{Sc} immunolabeling) in the previously mentioned brain areas. All clinical and

preclinical animals showed PrP^{Sc} deposition and spongiosis; therefore, all were included in the study of these features. As expected, negative controls showed no PrP^{Sc} deposition in the brain. The PrP^{Sc} deposition pattern was similar between the clinical and preclinical sheep, although the preclinical group showed lower scores. Peak scores were detected in the obex and thalamus, agreeing with previous descriptions of the PrP^{Sc} spreading pattern in sheep scrapie (Gossner *et al.*, 2011). The results are shown in Figure 3A, B.

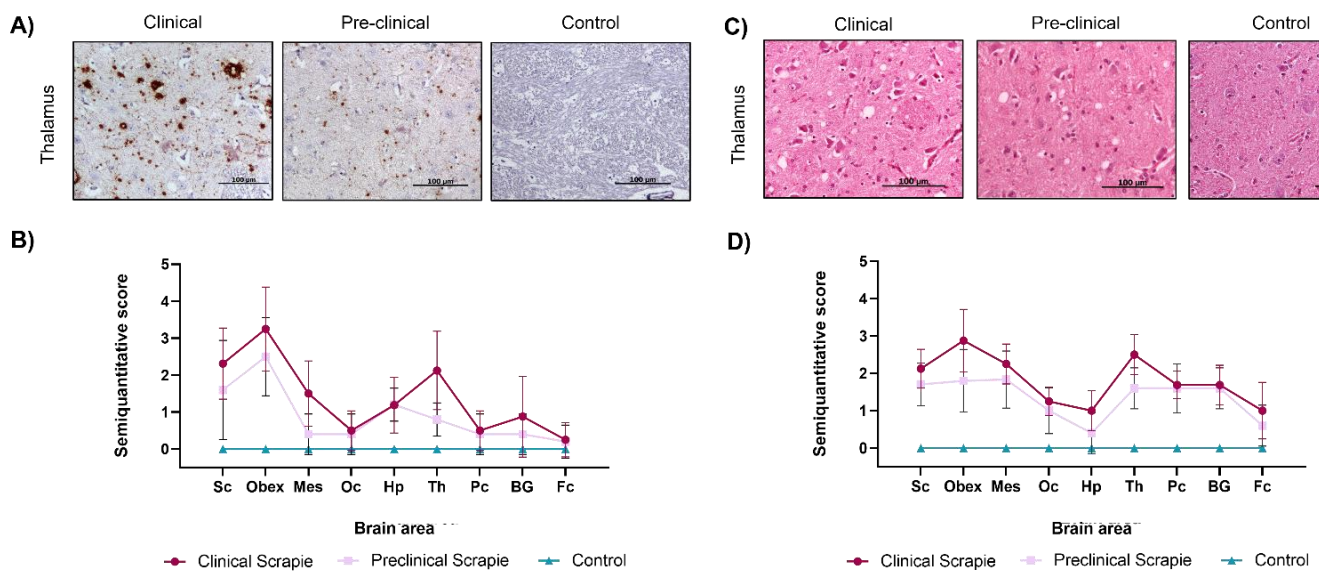


Figure 3. PrP^{Sc} deposition and spongiform changes in the brains of clinical (n = 8), preclinical (n = 5), and control (n = 8) sheep. A) Representative images of PrP^{Sc} deposits detected by immunohistochemistry in the obex and thalamus of the three groups of sheep. B) Graphics showing comparisons of the semiquantitative evaluation (on a scale of 0—lack of staining—to 5—staining present at maximum intensity) of these deposits and representing the mean \pm SEM in the following areas: spinal cord (Sc), mesencephalon (Mes), occipital cortex (Oc), thalamus (Th), hippocampus (Hp), thalamus (Th), parietal cortex (Pc), basal ganglia (BG), and frontal cortex (Fc). C) Representative images of hematoxylin and eosin staining in the obex and thalamus of clinical, preclinical, and control sheep. D) Graphic results of the semiquantitative evaluation (on a scale of 0—lack of spongiosis—to 5—very intense spongiosis) of these lesions in the three sheep groups, representing the mean \pm SEM, in the previously mentioned areas: spinal cord (Sc), mesencephalon (Mes), thalamus (Th), hippocampus (Hp), thalamus (Th), parietal cortex (Pc), basal ganglia (BG), and frontal cortex (Fc).

Spongiosis, which is the main histopathological lesion in prion diseases, was also semi-quantitatively evaluated in the same areas of the three groups of sheep on a scale from 0, meaning an absence of vacuoles, to 5, meaning intense spongiosis. No spongiosis was reported in the control group, while the clinical and preclinical groups presented vacuoles in the neuropil and neurons of all brain areas (Figure 3C). As observed in the PrP^{Sc} deposition, clinical and preclinical animals displayed similar spongiosis patterns, which were slightly lower in preclinical animals, and both groups showed higher scores in the obex and thalamus (Figure 3D). Spearman's ρ correlation was calculated in four brain areas (obex, hippocampus, thalamus, and frontal cortex) between the immunohistochemical scores for Ng and NfL and the scores of the neuropathological prion-associated features (PrP^{Sc} deposition and spongiosis) in all sheep at once to determine whether there was a correlation between prion-related lesions and the expression of these proteins. Correlation values and statistical significances can be found in Table 2.

Table 2. Spearman's correlation values between scores of Ng and NfL expression and prion-associated histopathological lesions in different brain areas. Spearman's correlation * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$. n.s.: no statistically significant value. Ng: Neurogranin; NfL: Neurofilament light chain; Hp: Hippocampus; Th: Thalamus; Fc: Frontal cortex.

		Ng	NfL	PrP ^{Sc}	Spongiosis
Obex	Ng	-	0.4918*	-0.6006**	-0.7227***
	NfL	0.4918*	-	-0.7755****	-0.7497***
	PrP ^{Sc}	-0.6006**	-0.7755****	-	0.8633****
	Spongiosis	-0.7227***	-0.7497***	0.8633****	-
Hp	Ng	-	0.2959 n.s.	-0.2786 n.s.	-0.2238 n.s.
	NfL	0.2959 n.s.	-	-0.2145 n.s.	-0.2313 n.s.
	PrP ^{Sc}	-0.2786 n.s.	-0.2145 n.s.	-	0.7921****
	Spongiosis	-0.2238 n.s.	-0.2313 n.s.	0.7921****	-
Th	Ng	-	0.6994***	-0.8124****	-0.8038****
	NfL	0.6994***	-	-0.8130****	-0.6530**
	PrP ^{Sc}	-0.8124****	-0.8130****	-	0.8112****
	Spongiosis	-0.8038****	-0.6530**	0.8112****	-
Fc	Ng	-	0.2240 n.s.	-0.2587 n.s.	-0.5540**
	NfL	0.2240 n.s.	-	-0.1579 n.s.	-0.3233 n.s.
	PrP ^{Sc}	-0.2587 n.s.	-0.1579 n.s.	-	0.4971*
	Spongiosis	-0.5540**	-0.3233 n.s.	0.4971*	-

As expected, PrP^{Sc} deposition and spongiosis displayed a positive and significant correlation in all of the studied brain areas. Regarding Ng expression, a negative correlation was found with both PrP^{Sc} and spongiosis. Spongiosis and Ng were negatively correlated in all of the studied areas, with this correlation being significant in three of them: obex, thalamus, and frontal cortex. Ng expression and PrP^{Sc} deposition also showed a negative significant correlation in the obex and thalamus. NfL also displayed negative correlations with the scrapie-related neuropathological features, and this correlation was significant in the obex and thalamus. The association between the Ng and NfL protein expressions was also assessed, and a positive correlation was found, which was significant in the thalamus and obex.

Ng and NfL concentrations in sheep CSF

The Ng and NfL concentrations in ovine CSF were studied using two in-house ELISA tests as previously described (Gaetani *et al.*, 2018; Kvartsberg *et al.*, 2019). The NfL ELISA test (based on the NfL21 and NfL23 antibodies) was able to detect sheep NfL. However, Ng determinations could not be performed, since the ELISA based on the Ng2 and Ng36 antibodies was not able to detect ovine Ng, probably due to the differences between the Ng2 antibody and the amino acid sequence of sheep Ng. Regarding the NfL concentrations in sheep CSF, the highest levels were detected in the clinical group of sheep (30,250 ± 6240 pg/mL), followed by the preclinical animals (9118 ± 3145 pg/mL), and finally the control group (775 ± 131 pg/mL) (Figure 4). The NfL concentrations were significantly different in the clinical versus control groups ($p < 0.05$).

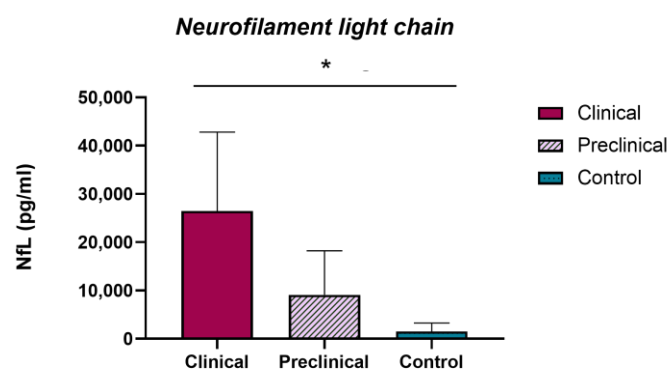


Figure 4. Analysis of CSF NfL levels in scrapie-infected and non-infected sheep. Clinical (n = 8), preclinical (n = 5), and control (n = 8) groups are shown. Representations of the NfL concentrations (pg/mL) found in

the CSF of the three study groups are shown. Differences between groups were studied using the one-way ANOVA test followed by the Bonferroni *post hoc* test. NfL concentration in CSF was significantly different between the clinical and control groups (* $p < 0.05$). Data are expressed as the mean \pm SEM.

Discussion

Prion diseases are fatal neurodegenerative disorders in which the main pathogenic event is the conversion of PrP^C into PrP^{Sc}, leading to the accumulation of PrP^{Sc} in the central nervous system and causing neuronal dysfunction and cell death, which results in spongiform degeneration. The infection of the nervous tissue by prions is characterized by extensive spongiform degeneration with massive neuronal loss, synaptic alterations, neuroinflammation, and the accumulation of protein aggregates (Castilla *et al.*, 2004). This process of neuronal loss begins with the presence of PrP^{Sc}, causing changes in neurons associated with stress and a glial response. The damage progresses and alters synaptic transmission, which leads to neuronal death (Soto & Satani, 2011).

One of the ways in which prion-induced neurodegeneration might affect the synapse is through the loss of function of PrP^C. Hitherto, the physiological role of PrP^C is still unclear, since no anatomical or developmental impairment has been observed in many previous studies using animal models with PrP^C depletion (Benestad *et al.*, 2012; Mallucci *et al.*, 2002). Nevertheless, physiological alterations have been reported in some PrP^C-ablated models, including abnormalities in synaptic transmission, specifically in cognition (Westergard *et al.*, 2007). Moreover, PrP^C has been localized at both pre- and post-synaptic membranes, and on synaptic vesicles (Herms *et al.*, 1999; Moya *et al.*, 2000), and it has also been found to interact with different proteins that take part in synaptic release (Spielhauer & Schätzl, 2001). These findings further support its role in neuronal synaptic transmission and synaptic plasticity (Collinge *et al.*, 1994). The other way through which prion-induced pathogenesis could affect the synapse is the endoplasmic reticulum (ER) pathway. Different studies have demonstrated that the accumulation of PrP^{Sc} induces ER stress (Otero *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2012), activating pro-apoptotic pathways (Nakagawa *et al.*, 2000). ER stress alters Ca²⁺ homeostasis, which regulates calcineurin (CaN), a type 2 phosphatase involved in synaptic function,

memory, and cell death (Mansuy, 2003), and it has been proven that PrP^{Sc} accumulation causes synaptic dysfunction via CaN dysregulation (Soto & Satani, 2011).

Ng and NfL are synaptic and axonal markers that could reflect these alterations in prion diseases. After CNS axonal and synaptic damage, Ng and NfL are released to the interstitial fluid (Gaetani *et al.*, 2019; Xiang *et al.*, 2020), which directly communicates with the CSF. Therefore, in this study, we assessed the expression of these two markers at the protein and gene levels in the brains of sheep throughout the pathogenesis of natural scrapie.

Reductions in Ng expression in preclinical scrapie-affected sheep as compared with negative controls were significant in several brain areas, such as the thalamus and obex. This could be explained by the fact that the thalamus and obex are among the first regions where PrP^{Sc} accumulates in the CNS (Baldauf *et al.*, 1997). The results obtained in the clinical and control groups of this study agree with those of previous studies in which Ng was evaluated as a biomarker of neurodegeneration in humans affected by CJD. The Ng levels were found to be significantly decreased in the brains of CJD patients compared with healthy controls, as assessed by immunohistochemistry (Blennow *et al.*, 2019). As previously mentioned, scrapie, where preclinical naturally infected animals can be detected, is a model that allows comparative pathology to assess biopathological markers in the early stages of prion disease. In this study, clinical and preclinical animals showed very similar levels of Ng expression in all of the brain areas evaluated, thus agreeing with the hypothesis that synaptic damage is an early event in natural scrapie previously proposed for other natural and experimental prion diseases (Blennow *et al.*, 2019; Hilton *et al.*, 2013). We also observed that the expression levels of Ng were lower in the preclinical group compared with the control group in all brain areas but the hippocampus. It is true that, since the preclinical animals included in this study were naturally infected, it is not possible to know exactly in which stage of infection they were in at the moment of culling. However, all preclinical animals came from the same herd, were within the same age, and showed similar neuropathological characteristics; hence, we believe they are a representative preclinical group for the study. Nevertheless, further studies using prion-inoculated transgenic mouse models expressing ovine PrP would be useful to confirm the results found in this study for both Ng and NfL.

To complement the protein expression studies, we assessed *NRGN* gene expression in four brain areas. In the frontal cortex, thalamus, and obex, the expression of the *NRGN* gene was decreased in clinical and preclinical animals compared with controls, and this downregulation was stronger in the clinical group. In the hippocampus, however, the controls showed a downregulation of the Ng-encoding gene compared with the other groups, while the preclinical animals exhibited an upregulation. All of these results agree with those found in the assessment of protein expression by immunohistochemistry. Susceptibility to prion infection varies between different brain areas (Carroll *et al.*, 2016; Makarava, Chang, Molesworth, *et al.*, 2020); therefore, this could explain the differences found in the hippocampus, since neuropathological changes in this area were less intense than those observed in the rest of the brain. Moreover, the results of recent studies in murine prion models suggest that the hippocampus is more resistant to prion infection than other brain regions, such as the thalamus and brainstem (Makarava, Chang, & Baskakov, 2020).

The results of NfL immunohistochemical evaluation were very similar to those found for Ng. The immunostaining was higher in the control group in all brain areas, followed by preclinical animals and then clinical animals. As described for Ng, the differences in NfL protein expression between the control and preclinical groups were higher and significant in brain areas showing more severe neurodegeneration (*i.e.*, the thalamus and obex). These results, especially the significant differences found between the preclinical and the control group, agree with the statement that axonal damage is an early event in prion diseases (Liberki, 2019). Regarding the *NEFL* gene expression, in the areas of the frontal cortex, thalamus, and obex, this gene showed a downregulation trend in clinical and preclinical animals compared with controls, this being more pronounced in clinical animals. However, in the hippocampus, the controls showed the lowest *NEFL* expression levels, while the preclinical animals exhibited the highest expression levels. These results found in the hippocampus disagree with those found for NfL protein expression in the same brain area. *NEFL* mRNA has been found to be altered in other neurodegenerative diseases, such as ALS (Strong *et al.*, 2007; Volkening *et al.*, 2009), and this finding in the hippocampus supports a different response in this area to prion associated pathogenesis.

The results of the correlation analyses between scrapie-related neuropathological features in sheep and Ng and NfL proteins showed, as expected, that there is a relationship between the present quantity of the studied proteins in the brains and prion-associated neurodegeneration. Moreover, the thalamus and the obex, which are, as previously mentioned, two of the brain areas earlier and more severely affected by prions (Baldauf *et al.*, 1997), showed a strong significant negative correlation between the histopathological markers and Ng and NfL expression, indicating that the neuropathological phenomena occurring in prion diseases directly influence the quantity of these proteins in brain tissue. This negative correlation between Ng and NfL and prion pathology detected by immunohistochemistry could be, in part, due to the neuronal loss occurring in the infected animals. However, the qPCR results also showed decreases in Ng and NfL expression in the preclinical and clinical sheep. In addition, we also detected an increase in NfL in the CSF; therefore, we do not believe that the reduction of staining found in immunohistochemistry was only due to the neuronal loss that develops in prion diseases.

Regarding the CSF tests, even though no statistical differences were observed, the CSF NfL mean values were higher in preclinical sheep compared with controls, in agreement with the previous results found for 14-3-3 and tau (Llorens *et al.*, 2018). This again supports that the underlying neurodegenerative mechanisms of prion diseases can also occur in the asymptomatic stages of the disease and, although NfL is an unspecific marker of axonal damage, it could be useful in the identification of preclinical prion cases combined with other proteins, such as tau and 14-3-3. Unfortunately, Ng measurements in the CSF could not be performed. However, our results for Ng expression in the brain tissue suggest Ng as a useful tool for the identification of preclinical cases of prion diseases. Ng has been reported to be increased in the CSF of human clinical cases of AD and sCJD, this being a stronger increase in sCJD compared with AD (Blennow *et al.*, 2019). Therefore, although other neurodegenerative diseases could also affect the levels of Ng both in the brain tissue and the CSF, it could be used in combination with other biomarkers, such as 14-3-3 or tau, also found to be higher in the CSF in preclinical cases of scrapie (Llorens *et al.*, 2018). This opens a valuable path in

research for the development of tests capable of measuring Ng in CSF to assess its value as a preclinical biomarker.

This study, as with others evaluating preclinical biomarkers of prion disease (Llorens *et al.*, 2018), focused on scrapie. However, these results could be extrapolated to human prion diseases. The identification of biopathological markers allowing the detection of prion disease cases in the asymptomatic stages, in which the neuronal damage is not yet massive, is needed to increase the efficiency of possible treatments whenever these are available. In this study, we corroborated that the concentration of two markers of synaptic and axonal damage, Ng and NfL, in brain tissue is affected by prion accumulation, and that this condition is noticeable, even in preclinical stages of prion-associated neurodegeneration. Therefore, although further research is needed, the obtained results strongly support the usefulness of Ng and NfL as preclinical biomarkers for prion diseases.

Ethics approval: This study was approved by the Ethical Advisory Commission for animal experimentation of the University of Zaragoza (identification code: P138/15) and performed under their supervision. All procedures involving animals adhered to the guidelines included in the Spanish law for Animal Protection RD53/2013 and the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental purposes.

References

- Alvarez-Castelao, B., & Schuman, E. M. (2015). The Regulation of Synaptic Protein Turnover. *Journal of Biological Chemistry*, 290(48), 28623-28630. doi: 10.1074/jbc.R115.657130
- Baldauf, E., Beekes, M., & Diringer, H. (1997). Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J Gen Virol*, 78 (Pt 5), 1187-1197. doi: 10.1099/0022-1317-78-5-1187
- Benestad, S. L., Austbø, L., Tranulis, M. A., Espenes, A., & Olsaker, I. (2012). Healthy goats naturally devoid of prion protein. *Veterinary Research*, 43(1). doi: 10.1186/1297-9716-43-87
- Bereczki, E., Bogstedt, A., Höglund, K., Tsitsi, P., Brodin, L., Ballard, C., Svenningsson, P., & Aarsland, D. (2017). Synaptic proteins in CSF relate to Parkinson's disease stage markers. *npj Parkinson's Disease*, 3(1). doi: 10.1038/s41531-017-0008-2
- Betancor, M., Moreno-Martinez, L., Lopez-Perez, O., Otero, A., Hernaiz, A., Barrio, T., Badiola, J. J., Osta, R., Bolea, R., & Martin-Burriel, I. (2021). Therapeutic Assay with the Non-toxic C-Terminal Fragment of Tetanus Toxin (TTC) in Transgenic Murine Models of Prion Disease. *Molecular Neurobiology*. doi: 10.1007/s12035-021-02489-5
- Blennow, K., Diaz-Lucena, D., Zetterberg, H., Villar-Pique, A., Karch, A., Vidal, E., Hermann, P., Schmitz, M., Ferrer Abizanda, I., Zerr, I., & Llorens, F. (2019). CSF neurogranin as a neuronal damage marker in CJD: a comparative study with AD. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 90(8), 846-853. doi: 10.1136/jnnp-2018-320155
- Carroll, J. A., Striebel, J. F., Rangel, A., Woods, T., Phillips, K., Peterson, K. E., Race, B., & Chesebro, B. (2016). Prion Strain Differences in Accumulation of PrP^{Sc} on Neurons and Glia Are Associated with Similar Expression Profiles of Neuroinflammatory Genes: Comparison of Three Prion Strains. *PLOS Pathogens*, 12(4). doi: 10.1371/journal.ppat.1005551
- Castilla, J., Hetz, C., & Soto, C. (2004). Molecular mechanisms of neurotoxicity of pathological prion protein. *Curr Mol Med*, 4(4), 397-403. doi: 10.2174/1566524043360654
- Collinge, J., Whittington, M. A., Sidle, K. C., Smith, C. J., Palmer, M. S., Clarke, A. R., & Jefferys, J. G. (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*, 370(6487), 295-297. doi: 10.1038/370295a0
- Cramm, M., Schmitz, M., Karch, A., Mitrova, E., Kuhn, F., Schroeder, B., Raeber, A., Vargas, D., Kim, Y.-S., Satoh, K., Collins, S., & Zerr, I. (2015). Stability and Reproducibility Underscore Utility of RT-QuIC for Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob Disease. *Molecular Neurobiology*, 53(3), 1896-1904. doi: 10.1007/s12035-015-9133-2

- De Vos, A., Bjerke, M., Brouns, R., De Roeck, N., Jacobs, D., Van den Abbeele, L., Guldolf, K., Zetterberg, H., Blennow, K., Engelborghs, S., & Vanmechelen, E. (2017). Neurogranin and tau in cerebrospinal fluid and plasma of patients with acute ischemic stroke. *BMC Neurology*, *17*(1). doi: 10.1186/s12883-017-0945-8
- Domínguez-González, I., Vázquez-Cuesta, Silvia N., Algaba, A., & Díez-Guerra, F. J. (2007). Neurogranin binds to phosphatidic acid and associates to cellular membranes. *Biochemical Journal*, *404*(1), 31-43. <https://doi.org/10.1042/bj20061483>
- Fraser, H., & Dickinson, A. G. (1973). Scrapie in mice. *Journal of Comparative Pathology*, *83*(1), 29-40. doi: 10.1016/0021-9975(73)90024-8
- Gaetani, L., Blennow, K., Calabresi, P., Di Filippo, M., Parnetti, L., & Zetterberg, H. (2019). Neurofilament light chain as a biomarker in neurological disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *90*(8), 870-881. doi: 10.1136/jnnp-2018-320106
- Gaetani, L., Hoglund, K., Parnetti, L., Pujol-Calderon, F., Becker, B., Eusebi, P., Sarchielli, P., Calabresi, P., Di Filippo, M., Zetterberg, H., & Blennow, K. (2018). A new enzyme-linked immunosorbent assay for neurofilament light in cerebrospinal fluid: analytical validation and clinical evaluation. *Alzheimers Res Ther*, *10*(1), 8. doi: 10.1186/s13195-018-0339-1
- González, L., Dagleish, M. P., Martin, S., Dexter, G., Steele, P., Finlayson, J., & Jeffrey, M. (2008). Diagnosis of preclinical scrapie in live sheep by the immunohistochemical examination of rectal biopsies. *Veterinary Record*, *162*(13), 397-403. doi: 10.1136/vr.162.13.397
- Gossner, A. G., Foster, J. D., Fazakerley, J. K., Hunter, N., & Hopkins, J. (2011). Gene expression analysis in distinct regions of the central nervous system during the development of SSBP/1 sheep scrapie. *Veterinary Microbiology*, *147*(1-2), 42-48. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.05.043
- Hermann, P., Appleby, B., Brandel, J.-P., Caughey, B., Collins, S., Geschwind, M. D., Green, A., Haik, S., Kovacs, G. G., Ladogana, A., Llorens, F., Mead, S., Nishida, N., Pal, S., Parchi, P., Pocchiari, M., Satoh, K., Zanusso, G., & Zerr, I. (2021). Biomarkers and diagnostic guidelines for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *The Lancet Neurology*, *20*(3), 235-246. doi: 10.1016/s1474-4422(20)30477-4
- Hermes, J., Tings, T., Gall, S., Madlung, A., Giese, A., Siebert, H., Schürmann, P., Windl, O., Brose, N., & Kretschmar, H. (1999). Evidence of Presynaptic Location and Function of the Prion Protein. *The Journal of Neuroscience*, *19*(20), 8866-8875. doi: 10.1523/jneurosci.19-20-08866.1999
- Hilton, K. J., Cunningham, C., Reynolds, R. A., & Perry, V. H. (2013). Early Hippocampal Synaptic Loss Precedes Neuronal Loss and Associates with Early Behavioural Deficits in Three

- Distinct Strains of Prion Disease. *PLoS One*, 8(6), e68062. doi: 10.1371/journal.pone.0068062
- Jeon, S. G., Kang, M., Kim, Y.-S., Kim, D.-H., Nam, D. W., Song, E. J., Mook-Jung, I., & Moon, M. (2018). Intrahippocampal injection of a lentiviral vector expressing neurogranin enhances cognitive function in 5XFAD mice. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(3), e461-e461. doi: 10.1038/emm.2017.302
- Kanata, E., Golanska, E., Villar-Pique, A., Karsanidou, A., Dafou, D., Xanthopoulos, K., Schmitz, M., Ferrer, I., Karch, A., Sikorska, B., Liberski, P. P., Sklaviadis, T., Zerr, I., & Llorens, F. (2019). Cerebrospinal fluid neurofilament light in suspected sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Clin Neurosci*, 60, 124-127. doi: 10.1016/j.jocn.2018.09.031
- Kvartsberg, H., Lashley, T., Murray, C. E., Brinkmalm, G., Cullen, N. C., Hoglund, K., Zetterberg, H., Blennow, K., & Portelius, E. (2019). The intact postsynaptic protein neurogranin is reduced in brain tissue from patients with familial and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 137(1), 89-102. doi: 10.1007/s00401-018-1910-3
- Liberski, P. P. (2019). Axonal changes in experimental prion diseases recapitulate those following constriction of postganglionic branches of the superior cervical ganglion: a comparison 40 years later. *Prion*, 13(1), 83-93. doi: 10.1080/19336896.2019.1595315
- Llorens, F., Barrio, T., Correia, A., Villar-Pique, A., Thune, K., Lange, P., Badiola, J. J., Schmitz, M., Lachmann, I., Bolea, R., & Zerr, I. (2018). Cerebrospinal Fluid Prion Disease Biomarkers in Pre-clinical and Clinical Naturally Occurring Scrapie. *Mol Neurobiol*, 55(11), 8586-8591. doi: 10.1007/s12035-018-1014-z
- Lyahyai, J., Serrano, C., Ranera, B., Badiola, J. J., Zaragoza, P., & Martin-Burriel, I. (2010). Effect of scrapie on the stability of housekeeping genes. *Anim Biotechnol*, 21(1), 1-13. doi: 10.1080/10495390903323851
- Makarava, N., Chang, J. C., & Baskakov, I. V. (2020). Region-Specific Sialylation Pattern of Prion Strains Provides Novel Insight into Prion Neurotropism. *Int J Mol Sci*, 21(3). doi: 10.3390/ijms21030828
- Makarava, N., Chang, J. C., Molesworth, K., & Baskakov, I. V. (2020). Region-specific glial homeostatic signature in prion diseases is replaced by a uniform neuroinflammation signature, common for brain regions and prion strains with different cell tropism. *Neurobiol Dis*, 137, 104783. doi: 10.1016/j.nbd.2020.104783
- Mallucci, G. R., Ratté, S., Asante, E. A., Linehan, J., Gowland, I., Jefferys, J. G. R., & Collinge, J. (2002). Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *The EMBO Journal*, 21(3), 202-210. doi: 10.1093/emboj/21.3.202

- Mansuy, I. M. (2003). Calcineurin in memory and bidirectional plasticity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(4), 1195-1208. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.10.046
- Monleon, E., Monzon, M., Hortells, P., Vargas, A., Acin, C., & Badiola, J. J. (2004). Detection of PrPsc on lymphoid tissues from naturally affected scrapie animals: comparison of three visualization systems. *J Histochem Cytochem*, 52(2), 145-151. doi: 10.1177/002215540405200201
- Mons, N., Enderlin, V., Jaffard, R., & Higuieret, P. (2008). Selective age-related changes in the PKC-sensitive, calmodulin-binding protein, neurogranin, in the mouse brain. *Journal of Neurochemistry*, 79(4), 859-867. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00646.x
- Moya, K. L., Sales, N., Hassig, R., Creminon, C., Grassi, J., & Di Giamberardino, L. (2000). Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain. *Microscopy Research and Technique*, 50(1), 58-65. doi: 10.1002/1097-0029(20000701)50:1<58::Aid-jemt9>3.0.Co;2-5
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., & Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature*, 403(6765), 98-103. doi: 10.1038/47513
- Nazir, F. H., Camporesi, E., Brinkmalm, G., Lashley, T., Toomey, C. E., Kvartsberg, H., Zetterberg, H., Blennow, K., & Becker, B. (2020). Molecular forms of neurogranin in cerebrospinal fluid. *Journal of Neurochemistry*, 157(3), 816-833. doi: 10.1111/jnc.15252
- Otero, A., Betancor, M., Erana, H., Fernandez Borges, N., Lucas, J. J., Badiola, J. J., Castilla, J., & Bolea, R. (2021). Prion-Associated Neurodegeneration Causes Both Endoplasmic Reticulum Stress and Proteasome Impairment in a Murine Model of Spontaneous Disease. *Int J Mol Sci*, 22(1). doi: 10.3390/ijms22010465
- Otto, M., Wiltfang, J., Cepek, L., Neumann, M., Mollenhauer, B., Steinacker, P., Ciesielczyk, B., Schulz-Schaeffer, W., Kretzschmar, H. A., & Poser, S. (2002). Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*, 58(2), 192-197. doi: 10.1212/wnl.58.2.192
- Pak, J. H., Huang, F. L., Li, J., Balschun, D., Reymann, K. G., Chiang, C., Westphal, H., & Huang, K. P. (2000). Involvement of neurogranin in the modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, synaptic plasticity, and spatial learning: A study with knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21), 11232-11237. doi: 10.1073/pnas.210184697
- Prichard, L., Deloulme, J. C., & Storm, D. R. (1999). Interactions between neurogranin and calmodulin in vivo. *J Biol Chem*, 274(12), 7689-7694. doi: 10.1074/jbc.274.12.7689

- Prusiner, S. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, *216*(4542), 136-144. doi: 10.1126/science.6801762
- Puoti, G., Bizzi, A., Forloni, G., Safar, J. G., Tagliavini, F., & Gambetti, P. (2012). Sporadic human prion diseases: molecular insights and diagnosis. *The Lancet Neurology*, *11*(7), 618-628. doi: 10.1016/s1474-4422(12)70063-7
- Represa, A., Deloulme, J. C., Sensenbrenner, M., Ben-Ari, Y., & Baudier, J. (1990). Neurogranin: immunocytochemical localization of a brain-specific protein kinase C substrate. *J Neurosci*, *10*(12), 3782-3792.
- Soto, C., & Satani, N. (2011). The intricate mechanisms of neurodegeneration in prion diseases. *Trends Mol Med*, *17*(1), 14-24. doi: 10.1016/j.molmed.2010.09.001
- Spielhaupter, C., & Schätzl, H. M. (2001). PrPC Directly Interacts with Proteins Involved in Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(48), 44604-44612. doi: 10.1074/jbc.M103289200
- Steinacker, P., Blennow, K., Halbgebauer, S., Shi, S., Ruf, V., Oeckl, P., Giese, A., Kuhle, J., Slivarichova, D., Zetterberg, H., & Otto, M. (2016). Neurofilaments in blood and CSF for diagnosis and prediction of onset in Creutzfeldt-Jakob disease. *Sci Rep*, *6*, 38737. doi: 10.1038/srep38737
- Strong, M. J., Volkening, K., Hammond, R., Yang, W., Strong, W., Leystra-Lantz, C., & Shoesmith, C. (2007). TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *35*(2), 320-327. doi: 10.1016/j.mcn.2007.03.007
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, *40*(15), e115-e115. doi: 10.1093/nar/gks596
- van Eijk, J. J., van Everbroeck, B., Abdo, W. F., Kremer, B. P., & Verbeek, M. M. (2010). CSF neurofilament proteins levels are elevated in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Alzheimers Dis*, *21*(2), 569-576. doi: 10.3233/JAD-2010-090649
- Volkening, K., Leystra-Lantz, C., Yang, W., Jaffee, H., & Strong, M. J. (2009). Tar DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43), 14-3-3 proteins and copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) interact to modulate NFL mRNA stability. Implications for altered RNA processing in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Brain Research*, *1305*, 168-182. doi: 10.1016/j.brainres.2009.09.105
- Wang, S.-B., Shi, Q., Xu, Y., Xie, W.-L., Zhang, J., Tian, C., Guo, Y., Wang, K., Zhang, B.-Y., Chen, C., Gao, C., & Dong, X.-P. (2012). Protein Disulfide Isomerase Regulates Endoplasmic

- Reticulum Stress and the Apoptotic Process during Prion Infection and PrP Mutant-Induced Cytotoxicity. *PLoS One*, 7(6). doi: 10.1371/journal.pone.0038221
- Westergard, L., Christensen, H. M., & Harris, D. A. (2007). The cellular prion protein (PrPC): Its physiological function and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1772(6), 629-644. doi: 10.1016/j.bbadis.2007.02.011
- Wood, J. L., McGill, I. S., Done, S. H., & Bradley, R. (1997). Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *Vet Rec*, 140(7), 167-174. doi: 10.1136/vr.140.7.167
- Xiang, Y., Xin, J., Le, W., & Yang, Y. (2020). Neurogranin: A Potential Biomarker of Neurological and Mental Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12. doi: 10.3389/fnagi.2020.584743
- Yang, J., Korley, F. K., Dai, M., & Everett, A. D. (2015). Serum neurogranin measurement as a biomarker of acute traumatic brain injury. *Clinical Biochemistry*, 48(13-14), 843-848. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2015.05.015
- Yuan, A., Rao, M. V., Veeranna, & Nixon, R. A. (2017). Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(4). doi: 10.1101/cshperspect.a018309
- Zetterberg, H., Bozzetta, E., Favole, A., Corona, C., Cavarretta, M. C., Ingravalle, F., Blennow, K., Pocchiari, M., & Meloni, D. (2019). Neurofilaments in blood is a new promising preclinical biomarker for the screening of natural scrapie in sheep. *PLoS One*, 14(12), e0226697. doi: 10.1371/journal.pone.0226697
- Zhong, L., Cherry, T., Bies, C. E., Florence, M. A., & Gerges, N. Z. (2009). Neurogranin enhances synaptic strength through its interaction with calmodulin. *The EMBO Journal*, 28(19), 3027-3039. doi: 10.1038/emboj.2009.236

Supplementary materials

Table S1. Demographic details of the animals included in the study.

Specie	Group	ID	PRNP polimorfism	Herd	Age at culling
Sheep (<i>Ovis aries</i>)	Negative	1	ARQ/ARQ	A	4
		2	ARQ/ARQ	A	4
		3	ARQ/ARQ	A	4
		4	ARQ/ARQ	A	5
		5	ARQ/ARQ	A	5
		6	ARQ/ARQ	A	5
		7	ARQ/ARQ	A	6
		8	ARQ/ARQ	A	6
	Preclinical	9	ARQ/ARQ	B	4
		10	ARQ/ARQ	B	4
		11	ARQ/ARQ	B	4
		12	ARQ/ARQ	B	4
		13	ARQ/ARQ	B	5
	Clinical	14	ARQ/ARQ	C	4
		15	ARQ/ARQ	C	4
		16	ARQ/ARQ	C	5
		17	ARQ/ARQ	C	5
		18	ARQ/ARQ	C	5
		19	ARQ/ARQ	C	6
		20	ARQ/ARQ	C	6
		21	ARQ/ARQ	C	6

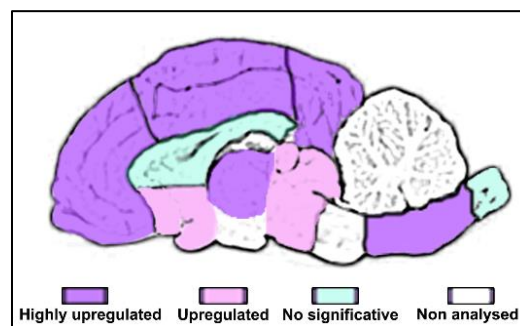


Figure S1. Schematic map of the brain showing the degree of Ng upregulation in control animals.

ESTUDIO 3

Study of the dynamics of 21kDa associated scrapie strains
upon serial passage of scrapie isolates in ovine PrP^C
expressing mice

Study of the dynamics of 21kDa associated scrapie strains upon serial passage of scrapie isolates in ovine PrP^C expressing mice

Abstract

Prions, which cause transmissible spongiform encephalopathies (TSE), are protein-only pathogens whose tertiary and quaternary structure may differ causing the existence of different strains or conformers. Each of these strains causes the phenotypic variability observed in prion diseases, and also has distinct capacity to infect different species. In scrapie, several strains can be propagated by bioassays from a same isolate, therefore pointing that in certain cases these strains coexist in the original isolate. Characterizing the circulating scrapie strains is crucial to assess its potential transmission to different species and for scrapie control and eradication purposes. Thus, the objective of this study is to assess the presence and dynamics of the 21kDa associated scrapie strains in scrapie isolates and their evolution during their serial transmission in a bioassay in mice expressing ovine PrP^C by Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA). Brain samples from sheep and mice experimentally infected with prions were subjected to PMCA under different conditions to evaluate the amount and proportion of subcomponents contained in them. Results show that PMCA can be used under certain conditions were the 19kDa phenotype, which has been associated to a scrapie strain, is apparently not amplifiable. Under these same conditions, PMCA is able to amplify the 21kDa subcomponent of scrapie, associated to several distinct scrapie strains, detecting this subcomponent in homogenates showing a 19kDa signature. PMCA is also able to spot the tissue-dependent differential selection occurring in bioassays, and therefore it would be an efficient proceeding to use in prion strain-related investigations. More importantly, the overall outcome suggests that some of the natural scrapie isolates used in the study contained mixtures of strains and that coinfection with several components may frequently occur.

Introduction

Prions are proteinaceous pathogens that cause the neurodegenerative diseases called transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), which include scrapie in small ruminants, the bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle and the Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans, among others (Prusiner, 1982). Prions are the result of the conformational change of the physiological protein PrP^C into its abnormal isoform termed PrP^{Sc}. After this change, prions have self-replication capacity causing the conformational change of PrP^C (Prusiner, 1998). Although prions are protein-only pathogens lacking nucleic acids, the existence of multiple strains for different TSEs has been recognized, even within the same host species (Bruce, 1993; Zlotnik & Rennie, 1963). It is believed that the existence of different strains is caused by conformational variations at the level of the tertiary and quaternary structure of PrP^{Sc}, which can adopt different folding states, thus manifesting specific phenotypic characteristics, such as different incubation periods, neuropathology, clinical signs and biochemical features, such as the electrophoretic mobility and the glycosylation pattern of PrP^{Sc} (Bessen & Marsh, 1992; Gretzschel *et al.*, 2005). Due to the lack of genetic material, the differentiation of TSE strains cannot be carried out by conventional methods used for viruses or bacteria, and therefore the specific features previously mentioned are used in its characterization (DeArmond & Prusiner, 1993; Fraser & Dickinson, 1968).

Evidence on the phenomenon of prion strains has led to the formulation of different models on the nature, transmission capacity and emergence of prions. The “conformational selection” model (Collinge & Clarke, 2007) proposes that for a PrP sequence there is a limited number of stable conformers or strains, and therefore only a limited number of prion strains could induce its misfolding. The host’s PrP^C would only allow a limited number of PrP^{Sc} conformations to induce its misfolding, and thus, only a confined number of strains would be able to propagate within the same host. Within the framework of the conformational selection model, it has been proposed that prion isolates could be composed by mixtures of different conformers or substrains in which one of these substrains would predominate and determine the phenotype of the disease. Under selective pressure, for example, in an interspecies propagation, one of the subdominant conformers could emerge as a dominant strain differing from the

original one. There is diverse evidence to the fact that prion isolates (both natural and experimental) can contain several substrains in different proportions. In these isolates, one of the PrP^{Sc} conformations acts as dominant giving rise to the manifestation of its phenotypic characteristics, but several passages of experimental prion transmission can lead to the isolation of different substrains (Barrio *et al.*, 2020; Chapuis *et al.*, 2016; Le Dur *et al.*, 2017; Notari *et al.*, 2007). Another theory about the emergence of the different prion conformations is the “deformed templating” hypothesis (Makarava & Baskakov, 2013). This theory argues that if the conformers present in the infectious isolate are not capable of replicating in the host, a distortion of the amyloid fiber is produced by incorporating new molecules leading to the *de novo* emergence of conformers.

Bioassays, which consist of serial passages of infectious material in animals (usually mice), have been widely used in TSE research. These are, to date, one of the most sensitive techniques when it comes to assessing prion infectivity and strain characteristics. Furthermore, serial passage of prions in transgenic mouse lines allows the characterization of prion strains (Fraser & Dickinson, 1968). From the bioassays performed in murine models through the experimental inoculation of prions, it has been possible to identify and typify a large number of different prion strains, from scrapie (both sheep and goats), BSE, and human prions causing sCJD and GSS (Bruce, 1993; Morales *et al.*, 2007). Amplification of prions *in vivo*, as mentioned, occurs when PrP^{Sc} interacts with the physiological protein PrP^C, acting as a template and transmitting its abnormal conformation (Prusiner, 1998). PMCA (protein misfolded cyclic amplification) is an *in vitro* prion replication technique which consists of several cycles of incubation and sonication of a PrP^{Sc} "seed" in a substrate containing PrP^C, simulating the *in vivo* propagation of prions. In this process, PrP^{Sc} recruits PrP^C molecules and induces their misfolding, giving rise to new seeds that will later replicate the process cyclically, increasing the amount of *de novo* generated PrP^{Sc} exponentially (Castilla *et al.*, 2005; Saá *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 2002). Thus, PMCA allows the detection of minute amounts of prions through their amplification, and therefore it can be used for the detection of PrP^{Sc} in samples where the concentration of PrP^{Sc} is very low (Atarashi *et al.*, 2007; Gonzalez-Romero *et al.*, 2008; Thorne *et al.*, 2012). In addition, PMCA is able to only

amplify certain prion strains depending on the substrate and co-factors used in the reaction (Thorne *et al.*, 2012). Moreover, prions generated *in vitro* using this technique can retain their infectivity and their biochemical, structural, and neuropathological characteristics. This makes PMCA a very useful tool for studying strain phenomena and transmission barriers since it is a good substitute for bioassays, that have disadvantages such as requiring long periods and the use of many experimental animals (Castilla *et al.*, 2005).

Scrapie is an endemic prion disease in small ruminants (Fediaevsky *et al.*, 2010; Fediaevsky *et al.*, 2008). Previously published studies have demonstrated the capacity of some classical scrapie isolates to transmit to humanized mice (Cassard *et al.*, 2014) and also, although further studies in interspecies propagation are needed, have suggested atypical scrapie as a possible origin of BSE, which is transmissible to humans (Huor *et al.*, 2019; Marin *et al.*, 2021). Therefore, there is significant evidence suggesting that the transmission barrier does not constitute an absolute protection against the zoonotic risk of prions circulating in animal populations. As previously stated, the properties of each strain, along with the different strains contained in each isolate, and its ability to be transmitted to different species are closely related. This suggests the need for an evaluation of strain properties and circulating strains in the scrapie isolates. Thus, characterizing and holding control of the scrapie strains are crucial to assess its potential to cross the human species barrier, and also for the control and eradication of scrapie. For this reason, this study aims to follow the dynamics of 21kDa associated scrapie strains upon the serial passage of different scrapie isolates in mice expressing ovine PrP. For this, we assess by PMCA the presence and quantity of 19kDa and 21kDa components present in the different scrapie isolates and evaluate their evolution during the serial transmission of these isolates in a previous bioassay.

Materials and Methods

Bioassay

A bioassay (Table 2, Results section) was performed using three inocula of ovine scrapie isolates containing different characterized strains: PS09, PS48 and PD377. The

ovine isolates were intracerebrally inoculated through three consecutive passages in Tg338 mice (overexpressing ~6 to 10-fold the ovine VRQ/VRQ PrP^C (Laude *et al.*, 2002) and a third passage was also performed in TgShpXI mice (which express ~8-fold ovine ARQ/ARQ PrP^C, hereafter referred to as tgARQ mice (Kupfer *et al.*, 2007). Mice were intracerebrally inoculated with 20 µl of the inocula. Buprenorphine (0.3 mg/kg) was subcutaneously administered after the inoculation to achieve analgesia. Mice were monitored daily for the onset of neurological signs, and when clinical signs of disease were detected (*i.e.* locomotor disorders, poor body condition and any signs of impaired feeding ability), animals were euthanized by cervical dislocation and their brains collected and frozen at -80°C.

Protein misfolding cyclic amplification (PMCA) seeds

PMCA seeds were prepared from different samples in PBS at 10% weight/volume from in single-use micro tubes and stored at -20°C. Then, seeds were diluted from 10⁻¹ to 10⁻⁸ dilution to semiquantify their infectious titer. In this study, brain and spleen homogenates from scrapie-infected sheep and mice were tested by PMCA. In order to set up PMCA conditions that only amplified the 21kDa component present in scrapie isolates, and not the 19kDa component, CNS samples of both sheep and mouse nervous tissue, with known amounts of the 21kDa and 19kDa subcomponents, were tested. PMCA seeds were obtained from the brains of TgARQ and Tg338 mice from the previous bioassay. These mice had been inoculated with different infectious tissues and isolates obtained from these mice displayed different glycosylation profiles. Seeds from sheep and mice which only contained the 19kDa subcomponent were included as controls. These seeds were obtained from sheep and Tg338 mice inoculated with the CH1641 scrapie strain, which has similar features to BSE (Foster & Dickinson, 1988) and sheep inoculated with the CH1641 strain after two several passages of these strain in Tg338 mice. On the other hand, to track the evolution of the 21kDa and 19kDa subcomponents during the serial transmission of scrapie isolates, samples from animals of the previous bioassay (Table 2) were tested. In the present study, both the original sheep inocula used in the bioassay and the brains and spleens from the Tg338 mice of the first passage were included.

PMCA substrate

Brains of uninfected transgenic TgARQ mice were used as substrate. Animals were sacrificed by CO₂ exposure and then perfused with PBS + 5mM EDTA; brains were harvested and immediately frozen at -80°C. The substrate was prepared at a concentration of 10% brain lysate in PMCA buffer. PMCA buffer was composed by PBS with 50 mM tris-HCl, pH 7.4, 5mM EDTA, 300 mM NaCl, 1% Triton X-100 and protease inhibitors. A tissue grinder was used to homogenize the brain tissue in PMCA buffer. Different PMCA reactions were performed in the tgARQ substrate using the following dextran concentrations: no dextran, 0.25%, 0.5% and 1% final concentration.

PMCA amplification

PMCA was performed mixing 5 µl of seed and 45 µl of substrate per well in a 96-well PCR microplate (Axygen Scientific, USA). One 128eflon bead (2,381 mm diameter) was added to each well. Amplification was performed in a Qsonica Q700 sonicator, using a water recirculation system. Microplates were then submitted to 96 cycles of 10 s sonication (75% power) followed by a 14 min and 50 s incubation period at 39.5°C temperature. After the PMCA round (24h), 5 µl of the reaction product were added to a new microplate containing 45 µl of fresh substrate and a new round with 96 cycles of sonication and incubation was performed. Three rounds were consecutively carried out for each sample, and each sample was run in duplicate. Unseeded substrate was used as negative control, and the positive control was performed either with C-BSE (Classical bovine spongiform encephalopathy) or the Dawson scrapie strain diluted from a 10⁻¹ to a 10⁻⁸ dilution. In order to limit cross-contamination risks linked to serial PMCA, rows of unseeded substrate were included between samples on each run when possible, and procedures were performed in different rooms using dedicated material.

PrP^{res} detection in amplification products

After three sonication rounds, Dot blot was used to analyse the presence of PrP^{res} the PMCA product. PMCA products (18 µl) were mixed with 2 µl of 3% SDS and treated with 5 µl of proteinase K (PK) (final concentration, 50 µg/ml) for 1 h at 37°C. To stop PK digestion, an equal volume of Laemmli buffer was added and samples were heated at 95°C for 5 min. Then, a 5 µl volume of the digested samples with Laemmli buffer were

mixed with 25 μ l of 1% SDS and vacuum transferred to a nitrocellulose membrane. After the transference, the membrane was briefly rinsed with PBS (0.1% Tween 20) and incubated for 30 min in PBST containing 2% BSA. To perform the immunodetection, the monoclonal antibody Sha31 (mAb, 1:8000 dilution in PBST+2% BSA), which recognizes residues 145-152 (YEDRYYRE) of PrP, was used (Feraudet *et al.*, 2005). Then, the membrane was incubated with a secondary antibody HRP-conjugated anti-mouse (1:5000 dilution; Bio-rad). Immunoblots were developed using ECL reagent (Pierce) and visualized using the Versa Doc Quantity One image analysis system (Bio- Rad).

Western Blot

To assess electromobility and glycoforms, 20 μ l of PMCA reaction product was mixed with 180 μ l of 10% negative brain sheep homogenate as previously described (Lacroux *et al.*, 2012). Then, the TeSeE Western blot kit (Bio-Rad, France) was used following the manufacturer's recommendations to perform the PrP^{res} extraction. After this, samples were subjected to a 12% SDS/PAGE and transferred to PVDF membranes. After blocking for 30 min in PBST containing 2% BSA, PrP^{res} immunodetection was performed with the monoclonal antibody Sha31 (mAb, 1:8000), a secondary antibody HRP-conjugated anti-mouse (1:5000; Bio-rad) and ECL substrate (Pierce) to reveal peroxidase activity.

Results

PMCA in TgARQ substrate amplifies the 21kDa but not the 19kDa scrapie

Prior to this study, a doubled cloned 19kDa scrapie in Tg338 had been tried to amplify by PMCA with negative results (unpublished results). In addition, TgARQ substrate with dextran at a 0.25% of final concentration had been proved to obtain the best amplification performances for 21kDa scrapie components (Figure S1, Supplementary materials). In order to corroborate that the previously tested conditions for PMCA did only amplify the 21kDa scrapie subcomponent, a series of PMCA analyses were performed using seeds which only contained the 19kDa subcomponent. Seeds were obtained from the brains of three different animal groups: three sheep inoculated with the CH1641 scrapie strain, three Tg338 mice inoculated with the CH1641 scrapie

strain, and three sheep inoculated with the brains of Tg338 mice after two several passages of the CH1641 scrapie strain in this mouse line. The Dawson scrapie strain (21kDa) was used as positive control. After three rounds of PMCA, no amplification was found in any of the 19kDa containing samples (Figure 1).

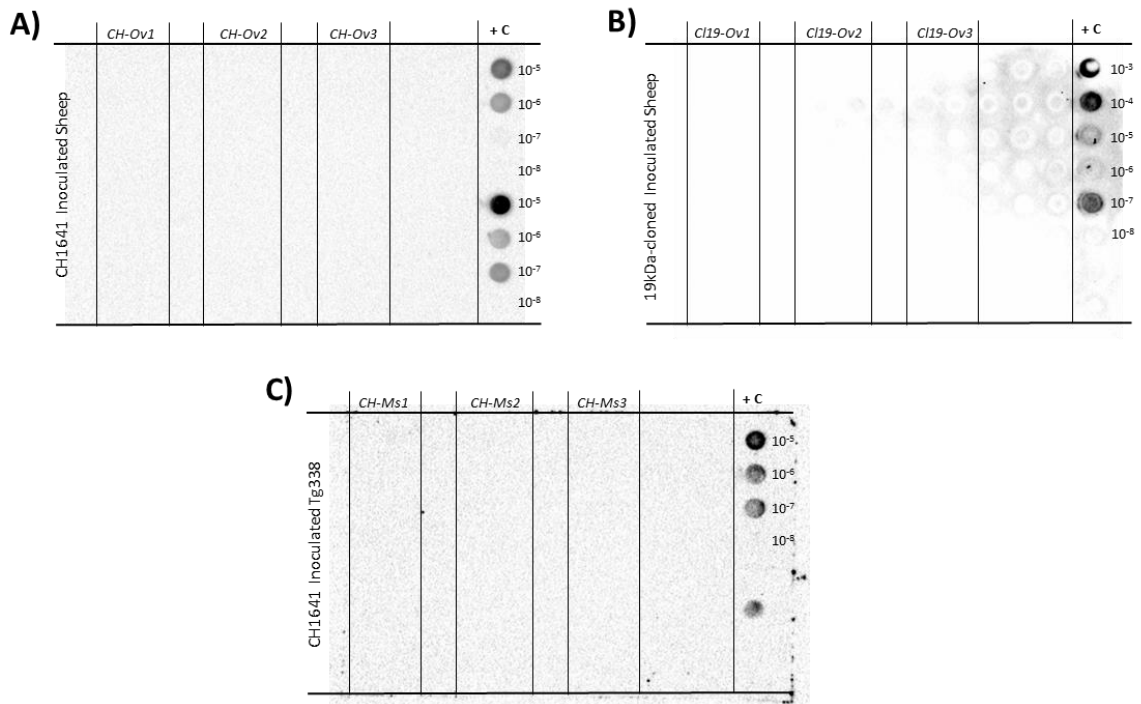


Figure 1. Dot Blot detection of PrP^{Sc} in 19kDa seeded PMCA. A) CH1641 -inoculated sheep (CH-Ov1, CH-Ov2, CH-Ov3); B) Sheep inoculated with CH1641 after two passages in Tg338 mice (Cl19-Ov1, Cl19-Ov2, Cl19-Ov3) and C) Tg338 mice inoculated with the CH1641 strain (CHMs1, CHMs2, CHMs3). All seeds were tested from a 10⁻¹ to a 10⁻⁸ dilution and run in duplicate. PMCA reactions were performed in TgARQ substrate using a 0.25% dextran concentration. A column of positive control of the Dawson scrapie strain (+ C) was included in each reaction using dilutions. After three rounds of sonication, all the tested samples showed no positivity.

In order to test the 21kDa component amplification efficiency with the established PMCA conditions, a new set of PMCA analyses were performed using the previously mentioned conditions (TgARQ substrate, 0.25% dextran) and including bioassayed-Tg338 and TgARQ seeds (Table 1) from a 10⁻¹ dilution to a 10⁻⁸ dilution. Each sample was run in duplicate.

Table 1. Brain mice seeds used in the PMCA method test.

Original inoculum	Mouse line	Passage	Inoculated tissue	Seed ID	Western blot profile
PS09	TgARQ	3 rd	Brain	PS09-3A	21kda
			Spleen	PS09-3B	21kda
PD377	TgARQ	3 rd	Brain	PD377-3A	21kda
			Spleen	PD377-3B	21kda
PS48	Tg338	2 nd	Spleen	PS48-2B	19kda

Seeds containing the 21kDa subcomponent showed consistent amplification since some of them were detected to a 10^{-8} dilution. These results corroborated that the previously set conditions are optimal to amplify the 21kDa scrapie component to very low titers. Nevertheless, 19kDa seeds did not propagate, and despite displaying two positive wells, when tested by Western blot these were proved to be a 21kDa contamination and a C-BSE contamination from the positive control. Western blot was also used to test the last positive dilution for different samples (Figure 2) and its molecular weight, all showing a 21kDa non-glycosylated band.

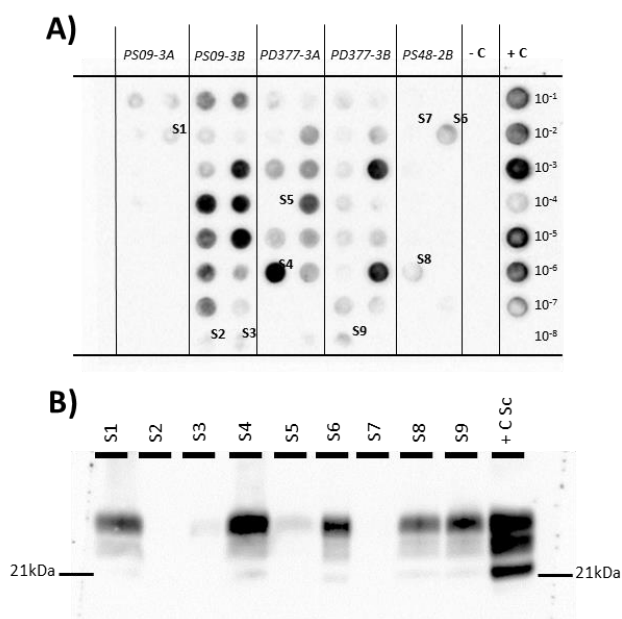


Figure 2. Detection of PrP^{Sc} by Dot Blot and Western blot in PMCA reactions seeded with serially diluted (10^{-1} - 10^{-8}) brain homogenate from the bioassayed mice. A) PrP^{Sc} detection by Dot Blot showed different amplification performances depending on the seed. Seeds containing the 21kDa scrapie subcomponent amplified to different dilution titers: PS09-3A amplified to a 10^{-2} dilution; PS09-3B to a 10^{-7} - 10^{-8} dilution; PD377-3A to a 10^{-6} dilution and PD377-3B to a 10^{-8} dilution. The 19kDa containing seed, PS48-2B, displayed positivity in two wells. A row of unseeded substrate (-C) and a C-BSE positive control (+C) were included. B) Western Blot was used to check the positivity and electrophoretic pattern of different

amplified samples. A PK digested classical scrapie isolate from the Dawson strain (+C Sc) was used as positive control and molecular weight marker. Twenty microliters of the Dot blot product were directly subjected to SDS/PAGE. All samples showed a 21kDa non-glycosylated band, except for S6, corresponding to PS48-2B, which exhibited a BSE-like pattern (19kDa and predominance of the diglycosylated band), and therefore was related to a contamination from the positive control.

Sheep brain inocula showing 19kDa molecular weight by Western Blot also contain 21kDa subcomponents as detected by PMCA

A bioassay was performed in ovine-PrP expressing transgenic mice. These were inoculated with ovine scrapie isolates containing the following scrapie strains: PS09 obtained from an ARQ/ARQ sheep, showing a 19kDa signature; PS48, obtained from a VRQ/VRQ sheep and showing a 19kDa signature; and PD377, from an ARQ/ARQ sheep and showing a 21kDa signature. Results on incubation periods and glycosylation profiles are shown in Table 2.

The three original inocula from sheep brain used in the bioassay were tested by PMCA. After three rounds in TgARQ substrate with 0.25% dextran concentration, the three inocula showed amplification. PS09, which had previously displayed a 19kDa molecular weight of the non-glycosylated band, amplified to a 10^{-5} - 10^{-6} dilution. PS48, which also had a 19kDa signature, was positive by PMCA to a 10^{-6} dilution. The 21kDa inoculum, PD377, amplified to a 10^{-8} dilution (Figure 3A). Last positive wells from each inoculum were tested by Western blot to confirm the molecular weight of the lower band, all of them exhibiting a 21kDa signature (Figure 3B).

Since 10^{-8} dilution amplifications were reached, a new series of PMCA was performed using the three isolates. To avoid cross-contamination, and since the PMCA method performance had already been tested, no positive control was included. The three inocula showed the same amplification performances previously obtained: PS09 to a 10^{-6} dilution; PS48 to a 10^{-6} dilution and PD377 to a 10^{-8} dilution (Figure 3C). Again, the last positive wells were tested by Western blot and all of them displayed a 21kDa molecular weight of the non-glycosylated band (Figure 3D).

Table 2. Bioassay of three sheep scrapie isolates in Tg338 and TgARQ mice.

Natural Isolate	1 st Passage Tg338	Inoculated tissue	2 nd Passage Tg338	Inoculated tissue	3 rd Passage Tg338	3 rd Passage TgARQ
PS09 19kDa	431 ± 18 dpi 19kDa	Brain	152 ± 4 dpi 19kDa	Brain	138 ± 1 dpi 19kDa	160 ± 9 dpi 21kDa
					Spleen	196 ± 14 dpi 19kDa
		Spleen	292 ± 52 dpi 21kDa	Brain	57 ± 1 dpi 21kDa	169 ± 8 dpi 21kDa
					Spleen	184 ± 34 dpi 19kDa
PS48 19kDa	145±23 dpi 19kDa	Brain	145 ± 5 dpi 19kDa	Brain	140 ± 2 dpi 19kDa	163 ± 8 dpi 19kDa
					Spleen	> 650 dpi Negative
		Spleen	151 ± 4 dpi 19kDa	Brain	138 ± 2 dpi 19kDa	169 ± 5 dpi 19kDa
					Spleen	313 ± 14 dpi 21kDa
PD377 21kDa	228±25 dpi 21kDa	Brain	141 ± 1 dpi 19kDa	Brain	138 ± 2 dpi 19kDa	178 ± 11 dpi 21kDa
					Spleen	ongoing
		Spleen	204 ± 36 dpi 21kDa	Brain	123 ± 12 dpi 21kDa	162 ± 4 dpi 21kDa
					Spleen	234 ± 50 dpi 21kDa

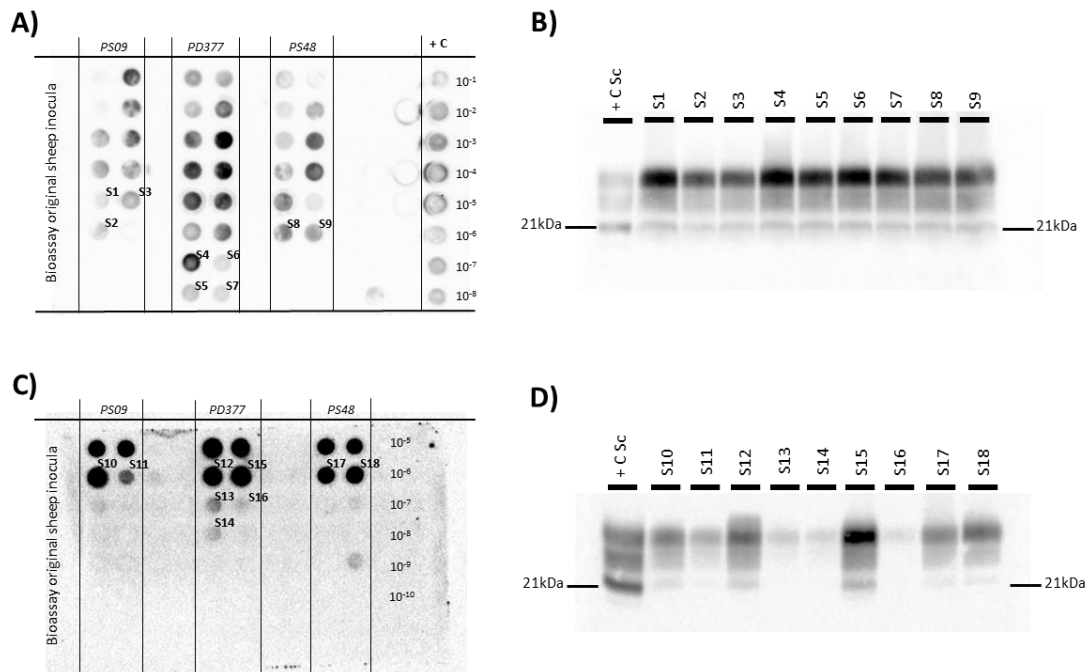


Figure 3. PrP^{Sc} detection by Dot Blot and Western blot in PMCA reactions seeded with the sheep brain inocula used in the bioassay. A) Dot Blot PrP^{Sc} detection showed different amplification performances for the three inocula. All samples were run in duplicate. PS09 amplified to a 10⁻⁵-10⁻⁶ dilution, PS48 to a 10⁻⁶ dilution and PD377 to a 10⁻⁸ dilution. Columns of unseeded substrate were placed between samples and a Dawson scrapie positive control (+ C) was included. B) Western Blot was used to check the positivity and electrophoretic pattern of the last amplified dilution in each inocula. A classical scrapie isolate from the Dawson strain (+C Sc) was used as positive control. All the tested PMCA products showed a 21kDa molecular weight of the lower band. C) Dot Blot PrP^{Sc} detection displayed the same results with lower dilutions. Samples were run in duplicate, and columns of unseeded substrate were placed between inocula. No positive control was included. D) Western blot resulted again in a 21kDa non-glycosylated band for the tested PMCA products. Dawson strain (+C Sc) was used as positive control.

Brain and spleen of scrapie-infected Tg338 mice show differential selection of PrP^{Sc} scrapie subcomponents

Brains and spleens from mice of the first passage of the scrapie inocula were tested by PMCA to determine to which dilution the 21kDa subcomponent amplified in each of these tissues. Six mice had been inoculated with each of the sheep inocula. Brains from each mouse group were prepared in PBS at 10% weight/volume then mixed

in a pool and this was used as seed for PMCA. The same procedure was performed with spleens.

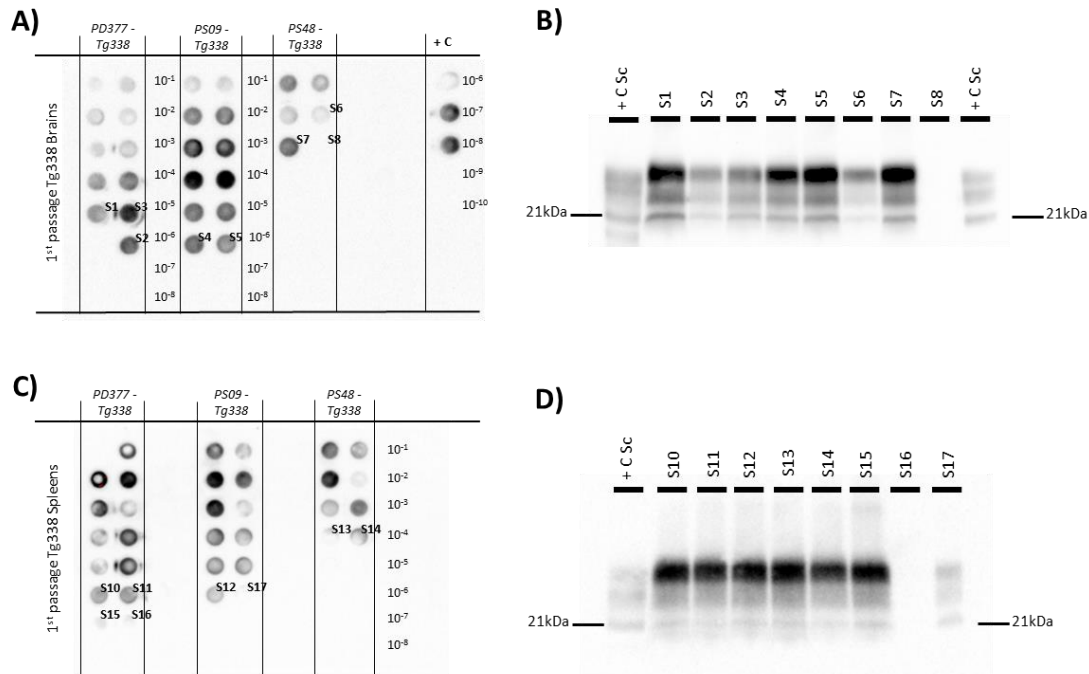


Figure 4. Detection of PrP^{Sc} by Dot Blot and Western blot in PMCA reactions seeded with serially diluted brain and spleen homogenate from Tg338 mice of the 1st passage. A) PrP^{Sc} detection by Dot Blot in Tg338 mouse brains showed the following amplification performances: PD377 amplified to a 10⁻⁵-10⁻⁶ dilution, PS09 to a 10⁻⁶ dilution and PS48 to a 10⁻²-10⁻³ dilution. Samples were run in duplicate, rows of unseeded substrate were placed between samples and a Dawson scrapie positive control (+ C) was included. B) Western Blot was performed in the last amplified dilution of each sample to test positivity and the molecular weight of the unglycosylated band. The Dawson scrapie strain was included as positive control (+C Sc). All the tested PMCA products showed a 21kDa molecular weight of the lower band. C) Dot Blot PrP^{Sc} detection in Tg338 mice spleens. PD377 amplified to a 10⁻⁷ dilution, PS09 to a 10⁻⁶ dilution and PS48 to a 10⁻⁴ dilution. Samples were run in duplicate and columns of unseeded substrate were placed between inocula. D) When positive, western blot resulted in a 21kDa non-glycosylated band for the tested sample. Dawson strain (+C Sc) was used as positive control.

After three sonication rounds, Tg338 brains showed different amplification performances. Brains from mice inoculated with the PD377 isolate, which had a 21kDa signature, and mice inoculated with the PS09 isolate, which had previously displayed a 19kDa molecular weight of the non-glycosylated band, amplified the 21kDa

subcomponent to a 10^{-6} dilution. Mice inoculated with the PS48, which also showed a 19kDa signature, were positive to a 10^{-2} - 10^{-3} dilution (Figure 4A).

Regarding the spleens of these mice, some differences in the amplification performances of the 21kDa subcomponent were found, with a slight increment of the amplification efficiencies. PD377-Tg338 spleens were positive to a 10^{-7} dilution, PS09-Tg338 spleens to a 10^{-6} dilution, and PS48-Tg338 spleens amplified to a 10^{-4} dilution (Figure 4C). Both brains and spleens amplification products were tested by Western blot to confirm the positive results and the molecular weight of the PMCA product (Figure 4B and 4D). The amplification performances of brains and spleens from the 1st passaged-Tg338 mice are summed up in Table 3.

Table 3. Amplification performances of the brains and spleens end-point titration from the 1st passaged Tg338 mice.

	Brain original signature	Amplification performance of 21kDa components	
		Brain	Spleen
PD377-Tg338	21kDa	10^{-6} dilution	10^{-7} dilution
PS09-Tg338	19kDa	10^{-6} dilution	10^{-6} dilution
PS48-Tg338	19kDa	10^{-2} - 10^{-3} dilution	10^{-4} dilution

Discussion

Scrapie, as previously said, is an endemic prion disease which has been circulating in the small ruminant population of Europe for centuries (Fediaevsky *et al.*, 2010; Fediaevsky *et al.*, 2008) due to its capacity to accumulate in peripheral tissues and biological fluids (Andreoletti *et al.*, 2002; Ligios *et al.*, 2005; Thomzig *et al.*, 2007) and the persistence of the prion in the environment (Georgsson *et al.*, 2006; Marin-Moreno *et al.*, 2016). Although its zoonotic potential is still under study, some isolates have been successfully transmitted to humanized mice reproducing features similar to those of sCJD in humans and classical BSE in cattle (Cassard *et al.*, 2014; Houston & Andreoletti, 2018; Huor *et al.*, 2019). Characterizing scrapie strains directly using data from the ovine hosts might be difficult since the different phenotypes observed might not reflect the existence of different strains but only the presence of one that dominates and defines that phenotype. Bioassays in genetically stable and modified murine models expressing

homologous PrP^C have helped to overcome this problem. For a long time, the diversity of scrapie strains has been widely studied performing bioassays in many different rodent models, allowing the identification and characterization of many scrapie strains (Bencsik *et al.*, 2007; Bruce *et al.*, 2002; Griffiths *et al.*, 2010; Thackray *et al.*, 2008). However, many passages are needed to adapt prion isolates and to identify different strains, therefore implying the use of great amounts of resources, animals and time.

As previously said, PMCA is an *in vitro* technique that allows the amplification and detection of very small quantities of prions. Moreover, this technique can be used to specifically amplify some strains of prions depending on the used conditions (Atarashi *et al.*, 2007; Gonzalez-Romero *et al.*, 2008; Thorne *et al.*, 2012). After testing a panel of samples from different origins containing both the 19kDa and the 21kDa subcomponents and also only containing the 19kDa component, in this study we demonstrate that PMCA can be used under conditions where the 19kDa scrapie component is not amplified, while the 21kDa components amplify to a 10⁻⁸ dilution. Consequently, the PMCA conditions set in this study might be used to detect 21kDa components that do not appear in bioassays until after several passages therefore consisting of a faster and more efficient way to characterize scrapie prion strains.

The question of the appearance and evolution of the different prion strains is still under debate. After the formulation of the “conformational selection” model (Collinge & Clarke, 2007) and based on its postulates, it has been proposed that natural prion isolates can be composed by mixtures of different strains in which one of these predominates and determines the phenotype of the disease. The transmission capacity and efficiency of prion isolates would be determined by the degree of overlap between the conformations present in the isolate and those allowed or favored by the host. However, this hypothesis does not explain the origin of the variability of conformers among prions, since it assumes that these conformations would appear spontaneously. In contrast to this, other authors (Makarava & Baskakov, 2013) defend the hypothesis of the “deformed templating”. According to this hypothesis, if the conformers in the infectious isolate are not capable of replicating in the environment offered by the host, a distortion of the amyloid fiber is produced leading to the emergence of *de novo* variants. These new conformers may not be able to propagate in the host, but through

the continuous occurrence of the generation of new variants, a conformer capable to replicate will eventually emerge.

In this study, the results of the analysis of the three natural scrapie sheep homogenates used as inocula in the bioassay show that despite their original molecular weight, the 21kDa conformer can be amplified from them *in vitro* using PMCA (Figure 3). Although two of the original inocula, PS09 and PS48, showed 19kDa signatures, PMCA amplified a 21kDa subcomponent from these isolates to a 10^{-6} dilution. After only three rounds of PMCA, the 21kDa substrain could be amplified *in vitro* with very good performances, while the bioassay required two (in the case of PS09) or three (for PS48) passages in mice to detect this subcomponent. Results obtained on the PS09 inoculum, which came from an ARQ/ARQ sheep, would agree with the conformational selection model theory since a conformer selection would have occurred upon propagation on a PrP^C of the same sequence (TgARQ substrate). Thus, results on this inoculum would show that despite its original molecular weight, it contained a remarkable quantity of the 21kDa subcomponent. Results on the PS48 inoculum could also fit this theory. However, since this inoculum was obtained from a VRQ/VRQ sheep, the 21kDa component detected in the PMCA may have arisen by mutation of the 19kDa prions in the inoculum when propagated on an ARQ substrate and thus in the presence of a transmission barrier. Overall, these results support the usefulness of PMCA as an alternative method to bioassay for the assessment of the co-existence of different subcomponents in sheep scrapie isolates, and more importantly, those found in the PS09 inoculum agree with the conformational selection hypothesis and with the results of other studies which point that in natural scrapie mixtures of prion components co-exist and co-propagate (Barrio *et al.*, 2020; Marin-Moreno *et al.*, 2021; Thackray *et al.*, 2012).

Along with the fact that natural scrapie isolates might be a mixture of components that co-propagate, previous results on bioassays also support that the distinct conformers are selectively propagated depending on the mouse line (Barrio *et al.*, 2020), PrP^C expression level (Le Dur *et al.*, 2017), and even the tissue in which the prion propagates. This latter effect can be observed in in this work. The results of the bioassay show a tendency of the Tg338 murine line to select or amplify the 19kDa

subcomponent in the brain while the spleen amplifies the 21kDa subcomponent (or does not select the 19kDa subcomponent). This phenomenon had already been described in previous studies in which ovine mouse models accumulated PrP^{Sc} with different banding patterns and biological properties in brain and spleen (Beringue *et al.*, 2012). It is not known the reason why brain and lymphoid organs select and propagate different prion conformers. Some hypotheses point to the differences in the PrP^C glycosylation (Katorcha *et al.*, 2014) and others to the different PrP^C expression level (Le Dur *et al.*, 2017) between these tissues as the cause of this phenomenon. However, despite the mechanisms through which each tissue selectively propagates distinct subcomponents are still unclear, in this study, we prove that PMCA is able to detect this differential amplification (Figure 4).

The PD377 inoculum, which showed a 21kDa signature and reached the highest amplification performances (up to the 10⁻⁸ dilution) in PMCA, led to the accumulation of a PrP^{Sc} with a 21kDa signature in the brains of the first-passage mice. These brains amplified up to the 10⁻⁶ dilution, and therefore a decrease in the amount of this subcomponent was already observed compared to the original inoculum. However, in the spleens of these first passage mice, the reduction was not as drastic, as they amplified the 21kDa subcomponent to the 10⁻⁷ dilution. Tissue-dependent selection of subcomponents is also well observed by PMCA in the case of the PS48 inoculum. This inoculum had a 19kDa signature on Western blot, and in PMCA amplified the 21kDa subcomponent to the 10⁻⁶ dilution. In the first passage, we see a significant reduction of this subcomponent, especially in the Tg338 brains where it only amplifies to the 10⁻²-10⁻³ dilutions. In the spleen this reduction is lower, amplifying up to the 10⁻⁴ dilution.

Although bioassays are an effective tool to evaluate strain properties and evolution, they imply elevated costs, not only in material and economic resources, but also in time. The results of this study prove that PMCA can be used as a reliable technique when it comes to discriminating prion subcomponents and evaluating their possible evolution and transmission, and that therefore it could be a good alternative method to bioassays in strain-related research. Furthermore, when we look at the results of the bioassay included in this study, we could say that, after several passages in Tg338 of 19kDa ovine isolates, a *de novo* appearance of certain 21kDa components

occurs. However, after the results obtained for the PS09 isolate, we see that, at least in this isolate, the 21kDa component was already present and that there has not been a *de novo* appearance, but rather a selection and/or amplification of it. Although the results obtained for the PS09 isolate support the conformational selection theory, the deformed templating theory could offer an explanation to the heterogeneity of prion strains, which is something that the conformational selection model cannot provide. These two hypotheses are not mutually exclusive, and the combination of both allows us to explain many of the strain divergence phenomena that have been observed both in natural prion diseases and in *in vivo* and *in vitro* experimental models (Baskakov, 2014).

Even so, as it has been said, the results obtained in this study would support the idea that natural cases of scrapie may be caused by a mixture of strains. Thus, the properties of the scrapie isolates would be directly related to the strains they contain, and its capacity of transmission would also be directly associated. Therefore, the evaluation of the circulating strains in the natural scrapie isolates and their strain characteristics are crucial not only to assess its zoonotic potential but also for scrapie control and eradication purposes, and should represent a primary objective of the research in prion diseases.

Ethics approval. The murine bioassay was performed at the INRA Toulouse/ENVT facilities. All animal experiments were performed in compliance with the institutional and French national guidelines in accordance with the European Community Council Directive 86/609/EEC. The experimental protocol was approved by the INRA Toulouse/ENVT ethics committee.

References

- Andreoletti, O., Lacroux, C., Chabert, A., Monnereau, L., Tabouret, G., Lantier, F., Berthon, P., Eychenne, F., Lafond-Benestad, S., Elsen, J. M., & Schelcher, F. (2002). PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J Gen Virol*, *83*(Pt 10), 2607-2616. doi: 10.1099/0022-1317-83-10-2607
- Atarashi, R., Moore, R. A., Sim, V. L., Hughson, A. G., Dorward, D. W., Onwubiko, H. A., Priola, S. A., & Caughey, B. (2007). Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein. *Nat Methods*, *4*(8), 645-650. doi: 10.1038/nmeth1066
- Barrio, T., Filali, H., Otero, A., Sheleby-Elías, J., Marín, B., Vidal, E., Béringue, V., Torres, J. M., Groschup, M., Andréoletti, O., Badiola, J. J., & Bolea, R. (2020). Mixtures of prion substrains in natural scrapie cases revealed by ovinised murine models. *Scientific Reports*, *10*(1). doi: 10.1038/s41598-020-61977-1
- Baskakov, I. V. (2014). The many shades of prion strain adaptation. *Prion*, *8*(2). doi: 10.4161/pri.27836
- Bencsik, A., Philippe, S., Debeer, S., Crozet, C., Calavas, D., & Baron, T. (2007). Scrapie strain transmission studies in ovine PrP transgenic mice reveal dissimilar susceptibility. *Histochem Cell Biol*, *127*(5), 531-539. doi: 10.1007/s00418-007-0276-8
- Beringue, V., Herzog, L., Jaumain, E., Reine, F., Sibille, P., Le Dur, A., Vilotte, J. L., & Laude, H. (2012). Facilitated cross-species transmission of prions in extraneural tissue. *Science*, *335*(6067), 472-475. doi: 10.1126/science.1215659
- Bessen, R. A., & Marsh, R. F. (1992). Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol*, *66*(4), 2096-2101. doi: 10.1128/JVI.66.4.2096-2101.1992
- Bruce, M. E. (1993). Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull*, *49*(4), 822-838. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072649
- Bruce, M. E., Boyle, A., Cousens, S., McConnell, I., Foster, J., Goldmann, W., & Fraser, H. (2002). Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *J Gen Virol*, *83*(Pt 3), 695-704. doi: 10.1099/0022-1317-83-3-695
- Cassard, H., Torres, J. M., Lacroux, C., Douet, J. Y., Benestad, S. L., Lantier, F., Lugan, S., Lantier, I., Costes, P., Aron, N., Reine, F., Herzog, L., Espinosa, J. C., Beringue, V., & Andreoletti, O. (2014). Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. *Nat Commun*, *5*, 5821. doi: 10.1038/ncomms6821

- Castilla, J., Saa, P., Hetz, C., & Soto, C. (2005). In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*, *121*(2), 195-206.
- Chapuis, J., Moudjou, M., Reine, F., Herzog, L., Jaumain, E., Chapuis, C., Quadrio, I., Boulliat, J., Perret-Liaudet, A., Dron, M., Laude, H., Rezaei, H., & Béringue, V. (2016). Emergence of two prion subtypes in ovine PrP transgenic mice infected with human MM2-cortical Creutzfeldt-Jakob disease prions. *Acta Neuropathologica Communications*, *4*(1). doi: 10.1186/s40478-016-0284-9
- Collinge, J., & Clarke, A. R. (2007). A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science*, *318*(5852), 930-936. doi: 10.1126/science.1138718
- DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1993). The neurochemistry of prion diseases. *J Neurochem*, *61*(5), 1589-1601. doi: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb09792.x
- Fediaevsky, A., Maurella, C., Noremark, M., Ingravalle, F., Thorgeirsdottir, S., Orge, L., Poizat, R., Hautaniemi, M., Liam, B., Calavas, D., Ru, G., & Hopp, P. (2010). The prevalence of atypical scrapie in sheep from positive flocks is not higher than in the general sheep population in 11 European countries. *BMC Vet Res*, *6*, 9. doi: 10.1186/1746-6148-6-9
- Fediaevsky, A., Tongue, S. C., Noremark, M., Calavas, D., Ru, G., & Hopp, P. (2008). A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. *BMC Vet Res*, *4*, 19. doi: 10.1186/1746-6148-4-19
- Feraudet, C., Morel, N., Simon, S., Volland, H., Frobert, Y., Creminon, C., Vilette, D., Lehmann, S., & Grassi, J. (2005). Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrPSc replication in infected cells. *J Biol Chem*, *280*(12), 11247-11258. doi: 10.1074/jbc.M407006200
- Foster, J. D., & Dickinson, A. G. (1988). The unusual properties of CH1641, a sheep-passaged isolate of scrapie. *Vet Rec*, *123*(1), 5-8. <https://doi.org/10.1136/vr.123.1.5>
- Fraser, H., & Dickinson, A. G. (1968). The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol*, *78*(3), 301-311. doi: 10.1016/0021-9975(68)90006-6
- Georgsson, G., Sigurdarson, S., & Brown, P. (2006). Infectious agent of sheep scrapie may persist in the environment for at least 16 years. *J Gen Virol*, *87*(Pt 12), 3737-3740. doi: 10.1099/vir.0.82011-0
- Gonzalez-Romero, D., Barria, M. A., Leon, P., Morales, R., & Soto, C. (2008). Detection of infectious prions in urine. *FEBS Lett*, *582*(21-22), 3161-3166. doi: 10.1016/j.febslet.2008.08.003
- Gretzschel, A., Buschmann, A., Eiden, M., Ziegler, U., Luhken, G., Erhardt, G., & Groschup, M. H. (2005). Strain typing of German transmissible spongiform encephalopathies field cases

- in small ruminants by biochemical methods. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 52(2), 55-63. doi: 10.1111/j.1439-0450.2005.00827.x
- Griffiths, P. C., Spiropoulos, J., Lockey, R., Tout, A. C., Jayasena, D., Plater, J. M., Chave, A., Green, R. B., Simonini, S., Thorne, L., Dexter, I., Balkema-Buschmann, A., Groschup, M. H., Beringue, V., Le Dur, A., Laude, H., & Hope, J. (2010). Characterization of atypical scrapie cases from Great Britain in transgenic ovine PrP mice. *J Gen Virol*, 91(Pt 8), 2132-2138. doi: 10.1099/vir.0.018986-0
- Houston, F., & Andreoletti, O. (2018). The zoonotic potential of animal prion diseases. *Handb Clin Neurol*, 153, 447-462. doi: 10.1016/B978-0-444-63945-5.00025-8
- Huor, A., Espinosa, J. C., Vidal, E., Cassard, H., Douet, J.-Y., Lugan, S., Aron, N., Marín-Moreno, A., Lorenzo, P., Aguilar-Calvo, P., Badiola, J., Bolea, R., Pumarola, M., Benestad, S. L., Orge, L., Thackray, A. M., Bujdoso, R., Torres, J.-M., & Andreoletti, O. (2019). The emergence of classical BSE from atypical/Nor98 scrapie. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(52), 26853-26862. doi: 10.1073/pnas.1915737116
- Katorcha, E., Makarava, N., Savtchenko, R., D'Azzo, A., & Baskakov, I. V. (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(9), e1004366. doi: 10.1371/journal.ppat.1004366
- Kupfer, L., Eiden, M., Buschmann, A., & Groschup, M. H. (2007). Amino acid sequence and prion strain specific effects on the in vitro and in vivo convertibility of ovine/murine and bovine/murine prion protein chimeras. *Biochim Biophys Acta*, 1772(6), 704-713. doi: 10.1016/j.bbadis.2006.10.009
- Lacroux, C., Vilette, D., Fernandez-Borges, N., Litaise, C., Lugan, S., Morel, N., Corbiere, F., Simon, S., Simmons, H., Costes, P., Weisbecker, J. L., Lantier, I., Lantier, F., Schelcher, F., Grassi, J., Castilla, J., & Andreoletti, O. (2012). Prionemia and leukocyte-platelet-associated infectivity in sheep transmissible spongiform encephalopathy models. *J Virol*, 86(4), 2056-2066. doi: 10.1128/JVI.06532-11
- Laude, H., Vilette, D., Le Dur, A., Archer, F., Soulier, S., Besnard, N., Essalmani, R., & Vilotte, J.-L. (2002). New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives. *Comptes Rendus Biologies*, 325(1), 49-57. doi: 10.1016/s1631-0691(02)01393-8
- Le Dur, A., Laï, T. L., Stinnakre, M.-G., Laisné, A., Chenais, N., Rakotobe, S., Passet, B., Reine, F., Soulier, S., Herzog, L., Tilly, G., Rézaei, H., Beringue, V., Vilotte, J.-L., & Laude, H. (2017). Divergent prion strain evolution driven by PrP^C expression level in transgenic mice. *Nature Communications*, 8(1). doi: 10.1038/ncomms14170

- Ligios, C., Sigurdson, C. J., Santucci, C., Carcassola, G., Manco, G., Basagni, M., Maestrale, C., Cancedda, M. G., Madau, L., & Aguzzi, A. (2005). PrPSc in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. *Nat Med*, *11*(11), 1137-1138. doi: 10.1038/nm1105-1137
- Makarava, N., & Baskakov, I. V. (2013). The evolution of transmissible prions: the role of deformed templating. *PLoS Pathog*, *9*(12), e1003759. doi: 10.1371/journal.ppat.1003759
- Marin-Moreno, A., Aguilar-Calvo, P., Espinosa, J. C., Zamora-Ceballos, M., Pitarch, J. L., Gonzalez, L., Fernandez-Borges, N., Orge, L., Androletti, O., Nonno, R., & Torres, J. M. (2021). Classical scrapie in small ruminants is caused by at least four different prion strains. *Vet Res*, *52*(1), 57. doi: 10.1186/s13567-021-00929-7
- Marin-Moreno, A., Espinosa, J. C., Fernandez-Borges, N., Piquer, J., Girones, R., Androletti, O., & Torres, J. M. (2016). An assessment of the long-term persistence of prion infectivity in aquatic environments. *Environ Res*, *151*, 587-594. doi: 10.1016/j.envres.2016.08.031
- Marin, B., Otero, A., Lugan, S., Espinosa, J. C., Marin-Moreno, A., Vidal, E., Hedman, C., Romero, A., Pumarola, M., Badiola, J. J., Torres, J. M., Androletti, O., & Bolea, R. (2021). Classical BSE prions emerge from asymptomatic pigs challenged with atypical/Nor98 scrapie. *Sci Rep*, *11*(1), 17428. doi: 10.1038/s41598-021-96818-2
- Morales, R., Abid, K., & Soto, C. (2007). The prion strain phenomenon: molecular basis and unprecedented features. *Biochim Biophys Acta*, *1772*(6), 681-691. doi: 10.1016/j.bbadis.2006.12.006
- Notari, S., Capellari, S., Langeveld, J., Giese, A., Strammiello, R., Gambetti, P., Kretzschmar, H. A., & Parchi, P. (2007). A refined method for molecular typing reveals that co-occurrence of PrPSc types in Creutzfeldt–Jakob disease is not the rule. *Laboratory Investigation*, *87*(11), 1103-1112. doi: 10.1038/labinvest.3700676
- Prusiner, S. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, *216*(4542), 136-144. doi: 10.1126/science.6801762
- Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(23), 13363-13383. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13363>
- Saá, P., Castilla, J., & Soto, C. (2006). Ultra-efficient Replication of Infectious Prions by Automated Protein Misfolding Cyclic Amplification. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(46), 35245-35252. doi: 10.1074/jbc.M603964200
- Soto, C., Saborio, G. P., & Anderes, L. (2002). Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends Neurosci*, *25*(8), 390-394. doi: 10.1016/s0166-2236(02)02195-1

- Thackray, A. M., Hopkins, L., Spiropoulos, J., & Bujdoso, R. (2008). Molecular and transmission characteristics of primary-passaged ovine scrapie isolates in conventional and ovine PrP transgenic mice. *J Virol*, *82*(22), 11197-11207. doi: 10.1128/JVI.01454-08
- Thackray, A. M., Lockey, R., Beck, K. E., Spiropoulos, J., & Bujdoso, R. (2012). Evidence for co-infection of ovine prion strains in classical scrapie isolates. *J Comp Pathol*, *147*(2-3), 316-329. doi: 10.1016/j.jcpa.2012.01.009
- Thomzig, A., Schulz-Schaeffer, W., Wrede, A., Wemheuer, W., Brenig, B., Kratzel, C., Lemmer, K., & Beekes, M. (2007). Accumulation of pathological prion protein PrP^{Sc} in the skin of animals with experimental and natural scrapie. *PLoS Pathog*, *3*(5), e66. doi: 10.1371/journal.ppat.0030066
- Thorne, L., Holder, T., Ramsay, A., Edwards, J., Taema, M. M., Windl, O., Maddison, B. C., Gough, K. C., & Terry, L. A. (2012). In vitro amplification of ovine prions from scrapie-infected sheep from Great Britain reveals distinct patterns of propagation. *BMC Veterinary Research*, *8*(1). doi: 10.1186/1746-6148-8-223
- Zlotnik, I., & Rennie, J. C. (1963). Further observations on the experimental transmission of scrapie from sheep and goats to laboratory mice. *J Comp Pathol*, *73*, 150-162. doi: 10.1016/s0368-1742(63)80018-1

Supplementary Material

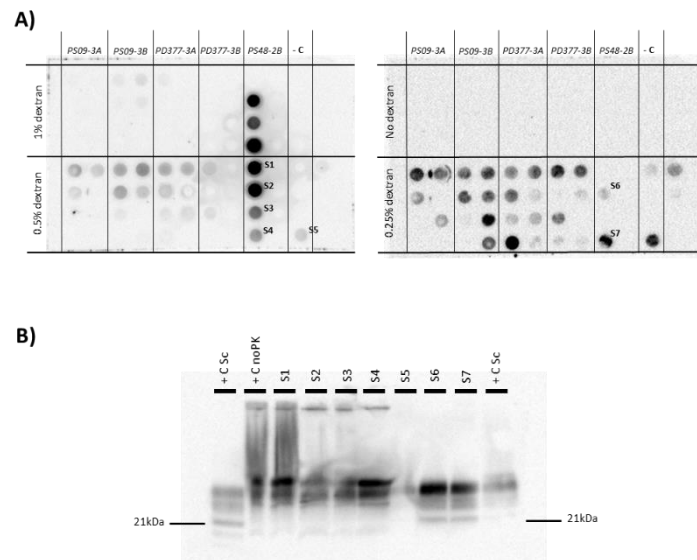


Figure S1. PMCA reactions performed in TgARQ substrate with different dextran concentrations using seeds from TgARQ and Tg338 mice brains. A) PrP^{Sc} detection by Dot Blot after the amplification of different scrapie seeds from Tg338 and TgARQ mice brains in TgARQ substrate. After three rounds of amplification, the best performances were obtained when using a 0.25% concentration of dextran. B) Western Blot was used to test the positivity of the samples. Two PK digested classical scrapie isolates from the Dawson strain (+C Sc) were included as positive controls and molecular weight markers. A non-PK digested positive control was also included (+ C noPK). Twenty microliters of the Dot blot product were directly subjected to SDS/PAGE. Samples S1 to S4 showed that its positivity was related to a lack of PK digestion. Samples S6 and S6 exhibited a molecular weight of the non-glycosylated band at 21kDa.

ESTUDIO 4

Scrapie recombinant strains in bank vole PrP transgenic mice: assessment of infectivity and derived neuropathology in comparison with brain-derived scrapie mouse strains

Scrapie recombinant strains in bank vole PrP transgenic mice: assessment of infectivity and derived neuropathology in comparison with brain-derived scrapie mouse strains.

Abstract

One of the major achievements in prion disease research has been the *in vitro* generation of infectious recombinant prions since it allows the production of unlimited amounts of prions and to easily generate and test distinct PrP sequences, including mutants. Nevertheless, and despite their seeding capability, the *in vitro* generated misfolded rec-PrP can differ in their pathogenicity being from absolutely harmless to lethal, limiting their use as good prion models. Being able to generate recombinant prions that retain the characteristics of mammal prions would have a great significance, as they could be used in further investigations to help understand the unknown aspects of the pathogenesis of prion diseases. In this study, we comparatively assess the characteristics of several scrapie mammal prion strains and their recombinant counterparts after their inoculation in a transgenic mouse model, which expresses the 109I PrP^C of the bank vole, in order to how their strain properties vary after their propagation on a recombinant protein. The 22L, RML, 263K and ME7 brain-derived strains of scrapie and their recombinant homologues were intracerebrally inoculated in the TgVole transgenic model. All of them, both brain-derived and recombinant, were capable of producing disease, thus confirming the usefulness of this mouse model for prion research. Moreover, we include a first description of the neuropathology related to these scrapie strains in the TgVole model. Results on the assessment in spongiosis and PrP^{Sc} deposition in the brains of mice show that the recombinant strains 22L-PMSA-2 and RML-PMSA-1, obtained after the *in vitro* replication of the strains 22L and RML respectively, did not display differences with their brain-derived homologues. On the other hand, the ME7 and 263K recombinant strains differed in their neuropathological characteristics to their brain-derived counterparts. The similarities found in the 22L and RML recombinant strains imply that they maintain their neuropathological properties after propagation in recombinant protein, and therefore could be a reliable model in further studies.

Introduction

Prions are self-propagating infectious proteins, which cause a group of fatal neurodegenerative disorders termed prion diseases or transmissible spongiform encephalopathies (TSE). Prion diseases can have sporadic, genetic or infectious origin but they all are characterized by spongiform changes, gliosis and neuronal degeneration in the central nervous system (CNS) (Prusiner, 1998), and share as the main pathological event the posttranslational conversion of the physiological cellular prion protein (PrP^C) into its misfolded isoform, PrP^{Sc} (Collins *et al.*, 2004). Thus, prions consist exclusively of this pathogenic protein, which replicates in an autocatalytic manner converting PrP^C into its pathogenic folding variant. This autocatalytic process leads to the accumulation of PrP^{Sc} in the affected tissues, particularly in the CNS (Bieschke *et al.*, 2004).

PrP^{Sc} can adopt different conformational variations at the level of the tertiary and quaternary structure and this leads to the manifestation of specific incubation periods, neuropathology, clinical signs and biochemical features (Bessen & Marsh, 1992). These PrP^{Sc} variations are known as strains, and its existence is believed to be caused by the conformational variability originated during the misfolding of PrP (Bessen *et al.*, 1995). Inoculation of prions in a different species from the original host usually results in the appearance of a phenomenon known as transmission barrier (Scott *et al.*, 2005), which restricts the transmission efficiency and provokes prolonged incubation periods and low the attack rates (Priola, 1999). Different strains show differential tropism for the brain areas, the formation of morphologically distinct aggregates, different self-templating and cross-seeding capacities and distinct ability to infect different species (Bruce, 2003). One factor that may influence both the transmission barrier and strain properties is PrP^C glycosylation. PrP^C has a structured globular domain at its C-terminal region which contains the two sites susceptible to glycosylation (N181 and N197 in the human PrP sequence) which can be differently occupied, giving rise to di-, mono-, and unglycosylated forms of PrP^C (Endo *et al.*, 1989). The role of PrP^C glycosylation in prion transmission capacity is still a controversial issue. Due to the differences in glycan proportions between PrP^C and PrP^{Sc} and since it was observed that PrP^C glycosylation affects prion deposition patterns, it was initially suggested that the level of PrP^C glycosylation could be related to its facility to convert to PrP^{Sc} (DeArmond

et al., 1997). Some subsequent experiments suggested that, despite the presence of glycans in PrP^C is not determinant when it comes to infective capacity, it does affect transmission efficiency both between individuals of the same species and between different species (Tuzi *et al.*, 2008; Wiseman *et al.*, 2015). Other studies suggested that PrP^C glycosylation is not essential neither to determine strain properties (Moudjou *et al.*, 2016; Piro *et al.*, 2009) nor to maintain the pathobiological features of some strains (Otero *et al.*, 2022).

From the bioassays carried out in murine models through the experimental inoculation of prions, it has been possible to identify and characterize a large number of different prion strains, especially from scrapie (Bruce, 1993; Morales *et al.*, 2007). Currently, most of the strains used in research come from the SSBP/1 strain of sheep scrapie. Sequenced passage in sheep and goats of a nervous tissue homogenate from three scrapie-infected sheep resulted in the isolation of this strain (Fraser & Dickinson, 1968). Subsequent transmission of the SSBP/1 strain to different experimental murine and hamster models led to the isolation of the murine scrapie strains 22L and RML, among others; and of the 263K hamster strain (Bruce, 1993; Chandler, 1963; Kimberlin & Walker, 1986). Another well-known murine scrapie strain that is also one of the most widely used in TSE research is ME7, which was also obtained from sheep infected with scrapie, in this case from the lymphoreticular system (Zlotnik & Rennie, 1963).

The study of prions has been highly difficult due to their proteinaceous nature and there are still several characteristics of prion diseases, such as the strain phenomenon, the interspecies transmission, or the neurotoxicity or the molecular mechanisms of misfolding, which remain poorly understood or unknown. Significant advances into deciphering these issues have been achieved using *in vivo* and cellular models, but these have some limitations such as their inherent complexity and costs. Although the mechanism by which PrP^C molecules are misfolded into infectious PrP^{Sc} has not yet been elucidated, the conversion of PrP^C into its pathological isoform does not only occur *in vivo*, but it can also be modeled in *in vitro* reactions. The use of *in vitro* conversion systems, such as the cell-free conversion assay (Bessen *et al.*, 1995), the protein misfolding cyclic amplification (PMCA) (Castilla *et al.*, 2005) or the protein misfolding shaking amplification (PMSA) (Eraña *et al.*, 2019) already served to

consolidate the protein-only hypothesis (Castilla *et al.*, 2005; Legname *et al.*, 2004) and represent a powerful tool to identify the mechanisms underlying prion formation and replication (Deleault *et al.*, 2007).

The *in vitro* generation of self-propagating infectious prions that can cause a TSE *in vivo* has been one of the biggest achievements into the investigation of prion diseases. Since the first description of a technique to generate large quantities of recombinant PrP (rec-PrP) (Hornemann *et al.*, 1997), a great amount of misfolded rec-PrP conformers have been generated using different *in vitro* proceedings (Bocharova *et al.*, 2005; Colby *et al.*, 2010; Deleault *et al.*, 2007; Legname *et al.*, 2004; Legname *et al.*, 2005; Makarava *et al.*, 2010). This has enabled the production of high pure rec-PrP to be used in further investigations and increased the value of cell-free systems for the research on prion diseases. However, and despite their seeding capability, at first many *in vitro* generated misfolded rec-PrP were poorly infectious *in vivo* and failed to cause a fatal neurodegenerative disorder (Legname *et al.*, 2004), limiting their use as good prion models. However, after the generation of a highly infectious misfolded rec-PrP which was able to cause prion disease by PMCA (Wang *et al.*, 2010), it was proved that prions generated *in vitro* could cause clinical disease *in vivo*. From then, multiple infectious recombinant prions have been generated (Fernández-Borges, Di Bari, *et al.*, 2017; Makarava *et al.*, 2010; Westaway *et al.*, 2017). Overall, these studies revealed that misfolded recPrP conformers can stably exist and propagate in many conformations that may differ in its pathogenicity and be from innocuous to lethal, and therefore showed that seeding activity may not be linked to prion pathogenic activity.

Most of the studies for the generation of *in vitro* prions have been carried out in mouse and hamster PrP, which are the most used TSE models in *in vivo* tests due to their short incubation periods (Legname *et al.*, 2004). Nevertheless, the bank vole (*Myodes glareolus*), another rodent species, and transgenic mice expressing bank vole PrP^C have recently raised as important models for TSE research. Bank voles' PrP^C is polymorphic, expressing methionine (M) or isoleucine (I) at codon 109 (Cartoni *et al.*, 2005). These animals are considered to be the "universal acceptor of prions" since they are susceptible to a large diversity of prion strains from different donor species (Agrimi *et al.*, 2008; Di Bari *et al.*, 2008; Mabbott *et al.*, 2014; Nonno *et al.*, 2006; Pirisinu *et al.*,

2016). In fact, the fastest known prion strain, whose survival times are about 35 days post-inoculation, was isolated from the adaptation of chronic wasting disease (CWD) prions to bank voles carrying isoleucine at codon 109, the CWD-vole strain (Di Bari *et al.*, 2013). Considering these advantages, the joining of bank vole rodent models and recombinant prions, which are widely versatile and easy to use, could be a valuable tool to help overcome the difficulties found in the study of prion diseases.

As said, the application of *in vitro* PrP^{Sc} replicating methodologies has led to the generation of a wide range of recombinant prions harboring characteristics of mammal or “brain-derived” prions. The generation of recombinant prions holding the characteristics of mammal TSE causing prions is of crucial importance, since the knowledge obtained from studies using recombinant prions could help understand not only the unknown aspects of TSE pathogenesis but also the role of misfolded proteins in other neurodegenerative disorders such as Alzheimer, Parkinson or Huntington diseases. So far, (unpublished results) we are aware that the bank vole recombinant protein has the ability to give rise to distinct recombinant prion strains *in vitro*, different from those already described generated through interspecific transmission, acquiring differential biochemical and biological properties, and to hold the propagation of known mammal prion strains. However, it is not known how phenotypically close the resulting misfolded recombinant PrPs (or recombinant prion strains) are to their brain-derived counterparts. Therefore, the aim of this study is to identify recombinant prion strains that faithfully reflect the properties of mammal prion strains, and which would therefore be an ideal model for further studies using recombinant PrP. For this, we comparatively assess the characteristics of different brain-derived prion strains and their recombinant counterparts after their bioassay in a mouse model expressing bank vole PrP^C, to determine if they are capable of efficiently propagate *in vitro* on recombinant protein and then *in vivo* maintaining their strain properties.

Materials and methods

Bioassay

The transgenic mouse line TgVole (Eraña *et al.*, 2019; Fernández-Borges, Di Bari, *et al.*, 2017), which expresses physiological levels of the *bank vole* 109I PrP, was used in this study. Animals were experimentally inoculated with both original and PMSA-adapted isolates (detailed in the next section). Two passages in transgenic mice were performed for each tested inocula. A diagram of the bioassay is shown in Figure S1, Supplementary materials. Mice were anesthetized with isoflurane and then intracerebrally inoculated into the right cerebral hemisphere with 20 µl of the inocula. A dose of buprenorphine (0.3 mg/kg) was subcutaneously administered after the inoculation to achieve analgesia. Following inoculation, mice were monitored daily for the onset of neurological signs. When clinical signs of disease were detected (*i.e.* ataxia, hyperexcitability, locomotor disorders, poor body condition and any signs of impaired feeding ability), animals were humanely euthanized by cervical dislocation and their brains collected. Brains were divided sagittally and one brain hemisphere was frozen at -80°C for biochemical analyses, while the other was fixed in 10% formalin for histopathological studies.

Inocula

All the inocula used in the first passage containing prion strains from hamster and mouse were prepared from 1% (w/v) brain homogenates in PBS + Protease inhibitor cocktail (Roche) from animals infected with 263K (263K infected syrian hamster from UCSD, San Diego), 22L (22L infected C57BL6 mouse from CISA-INIA, Madrid), RML (RML infected C57BL6 mouse from CIC bioGUNE, Bilbao) and ME7 (ME7 infected C57BL6 mouse from CISA-INIA, Madrid). PMSA-adapted (recombinant) inocula used in the first passage were prepared as previously described (Eraña *et al.*, 2019), using brain homogenates from the first passage of 22L, RML, 263K and ME7 in TgVole were as seeds. Procedures on the obtention of the PMSA-adapted recombinant strains are detailed in the following sections. Inocula used in the second passage were prepared from TgVole mouse brain tissue as 1% (w/v) homogenates in PBS. Table 1 shows a list of the used inocula.

Table 1. List of inocula included in the study. Origin of the mouse and hamster strains used in the inocula is detailed above. The obtention of the recombinant strains used in the inocula is described in the following sections.

<i>Inocula containing mouse and hamster strains</i>	<i>Inocula containing recombinant strains</i>
22L	22L-PMSA-1
	22L-PMSA-2
RML	RML-PMSA-1
	RML-PMSA-2
263K	263K-PMSA
ME7	ME7-PMSA-1
	ME7-PMSA-2

Preparation of PMSA substrates

Bacterial expression and purification of bank vole I109 recombinant PrP (amino acids 23-231) (rec-PrP) was performed as described previously (Fernández-Borges, Eraña, *et al.*, 2017) of recombinant bank vole PrP-based *in vitro* propagation substrates was performed as described previously (Eraña *et al.*, 2019). Briefly, the purified rec-PrP stored with 6 M of guanidine-HCl was diluted 1:5 in phosphate buffered saline (PBS, Hyclone) and dialyzed against PBS at 1:2,000 ratio for 1 h at room temperature. The dialyzed sample was centrifuged at 19,000 g for 15 min at 4 °C and the supernatant used for substrate preparation. Rec-PrP concentration in the supernatant was measured (BCA protein assay kit, Thermo Scientific) and adjusted to 20 µM concentration to reach a final concentration of 2 µM when diluted in the substrate. The protein, after dialysis and concentration adjustment was mixed with conversion buffer (CB) 1:9, and dextran sulfate sodium salt from *Leuconostoc spp.* with molecular weights ranging from 6,500 to 10,000 (Sigma-Aldrich) was added to a final concentration of 0.5 % (w/v) the substrate was aliquoted and stored at -80 °C until required. From each independent protein batch, several substrate preparations were done, performing independent dialysis for every preparation. Distinct substrate preparations were not mixed for the same experiment.

PMSA reaction for recombinant PrP misfolding and propagation *in vitro*

PMSA was performed using bank vole rec-PrP substrates complemented with dextran sulfate placed in 2 ml tubes with conical bottom and screw cap (Fisherbrand). The reaction temperature was set at 39 °C using either a Thermomixer (Eppendorf) or a Digital shaking Drybath (ThermoScientific) with internal temperature control, and shaking at 700 rpm continuously for 24 h PMSA rounds. Approximately 50 mg of 1 mm zirconium silicate beads (BioSpec Products, Inc.) were added to the reaction tubes, which were also used in all prion propagation experiments done by serial 24 h PMSA rounds through 1:10 dilution from the product of the previous round in fresh substrate. In this case, 10 % (w/V) brain homogenates in PBS + Protease inhibitor cocktail (Roche) from TgVole animals infected with 263K, 22L, RML and ME7 prion strains (origin detailed in section “Inocula”) were used as seeds for the first PMSA round, diluted 1:1000 in the PMSA substrate. After 24h PMSA, the reaction products were further diluted 1:10 in fresh substrate and submitted for another round of PMSA. Up to 5 serial rounds were performed, until protease resistant rec-PrP was detected in at least one tube for all the seeds used. Unseeded tubes were included in all rounds as controls for cross-contamination or spontaneous rec-PrP misfolding.

Misfolded recombinant PrP detection

PMSA products were transferred from the reaction tubes to clean Eppendorf tubes and digested by adding proteinase K (PK) (Roche) at 25 µg/ml for 1 h at 42 °C in an oven (Nahita). Immediately after digestion, samples were centrifuged at 19,000 *g* at 4 °C for 15 min, the supernatant was discarded and the pellet resuspended and washed with at least 700 µl of PBS (Fisher Bioreagents). After washing, samples were centrifuged for additional 5 min at 19,000 *g* and 4 °C, supernatant discarded, and the pellet resuspended in 15 µl of loading buffer 4X (NuPage LDS, Invitrogen), previously diluted to 1X with PBS. PK-resistant PrP detection was done through electrophoresis and total protein staining. For that, PK-digested and concentrated samples in loading buffer were boiled for 10 min at 100 °C and loaded onto 4-12 % acrylamide gels (NuPAGE Midi gel, Invitrogen Life Technologies), subjected to electrophoresis for 1 h and 20 min (10 min at 70 V, 10 min at 110 V and 1 h at 150 V) and stained with BlueSafe (NZYTech) for 1 h at room temperature.

Western Blot Analyses

The brains of diseased animals, previously homogenized at 10 % (w/V) in Phosphate buffered saline (PBS) (Fisher Bioreagents) with Protease inhibitor cocktail (Roche), were mixed with digestion buffer [2 % (w/V) Tween-20 (Sigma-Aldrich), 2 % (V/V) NP-40 (Sigma-Aldrich) and 5 % (w/V) Sarkosyl (Sigma-Aldrich) in PBS] at 1:1 (V/V). Proteinase K (Roche) was added to reach a final concentration of 85 µg/ml to each sample and these were incubated at 42 °C for 1 h with moderate shaking. Digestion was stopped by adding loading buffer (NuPage 4X Loading Buffer, Invitrogen) 1:3 (V/V) and immediately boiling the samples at 100 °C for 10 min.

Prion protein immunodetection was performed by Western blotting as described previously (Harrathi *et al.*, 2018). Briefly, PK-digested samples were boiled for 10 min and loaded on 4-12 % acrylamide gels (NuPAGE Midi gel Invitrogen Life Technologies), subjected to electrophoresis for approximately 1 h and 20 min (10 min at 70 V, 10 min at 110 V and 1 h at 150 V) and transferred to a PVDF membrane (Trans-Blot Turbo Transfer Pack, Bio-Rad) using the Trans-Blot® Turbo™ transfer system (Bio-Rad). After blocking non-specific antibody binding of the membranes by incubation in 5 % non-fat milk powder for 1 h at room temperature, monoclonal antibody D18 (1:5000) (Williamson *et al.*, 1998) were added and incubated for 1 h at room temperature, prior to washing. After incubation with peroxidase-conjugated secondary goat anti-human IgG (H+L, Thermo Scientific or anti-mouse antibody (m-IgGk BP-HRP, Santa Cruz Biotechnology)), membranes were washed again and developed with an enhanced chemiluminescent horseradish peroxidase substrate (West Pico Plus, Thermo Scientific), using a FluorChem Q (Alpha Innotech) for image acquisition and the software AlphaView (Alpha Innotech) for image processing.

Histological and Immunohistochemical Analyses

To perform immunohistochemical and histopathological studies, sagittal sections from paraffin-embedded mouse brains (4 µm thick) were cut and collected on glass slides and dried at 56 °C for 24 h. Immunohistochemistry was used for the evaluation of the presence and distribution of PrP^{Sc}. Uninfected TgVole mice were included as negative controls. After dewaxing and rehydration, antigen retrieval was performed through immersion in 98% formic acid for 10 min, 4 µg/ml proteinase K

treatment for 15 min at 37°C, and hydrated autoclaving in citrate buffer at 96°C for 10 min. Endogenous peroxidase activity was blocked using a blocking reagent (Dako Agilent) for 15 min. Then, sections were incubated for 1 hour at room temperature (RT) with the anti-PrP antibody 6C2 (1:1000). The EnVision+ System (Agilent Dako) was used as the secondary antibody, prior to development with the DAB+ System (Agilent Dako). Haematoxylin was used to perform counterstaining. Neuropathological changes and spongiform lesions were studied by hematoxylin–eosin staining. Dewaxing and rehydration of the slides was achieved by sequential immersion in xylene and graded alcohols. Later, they were stained by immersion in a haematoxylin solution and in acid alcohol (1% acetic acid in a 70% ethanol solution), and counterstained with an eosin solution.

Brain sections were examined using a Zeiss Axioskop 40 optical microscope. Evaluation was blindly performed in all animals, and each mouse and brain area were evaluated twice. Nine encephalic areas were assessed: frontal cortex (Fc), septal area/striatum (Sa), Parietal cortex (Pc), hippocampus (Hc), thalamus (Th), hypothalamus (Ht), mesencephalon (Mes), medulla oblongata (Mobl) and cerebellum (Cbl) (Fraser & Dickinson, 1968). Since semiquantitative evaluation is the standard method to assess spongiosis and PrP^{Sc} deposition (Fraser & Dickinson, 1973) these features were semiquantitatively scored on a scale of 0 (lack of spongiosis/PrP^{Sc} deposit) to 5 (very intense spongiosis/PrP^{Sc} deposit).

Results

Inoculation of mouse and hamster strains 22L, RML, 263K and ME7 in TgVole does not alter their biochemical characteristics

Brains from TgVole mice from the first passage inoculated with brain-derived (mouse and hamster) 22L, RML, ME7 and 263K were subjected to western blot. Two animals per inoculum were included. No significant differences in the biochemical characteristics were observed between TgVole-adapted 22L, RML, ME7 and 263K and the mouse/hamster strains they came from (Bartz *et al.*, 2016; Supattapone *et al.*, 2018) (Figure 1). To generate the recombinant strains, brain homogenates from the first passage of 22L, RML, 263K and ME7 in TgVole were used as seeds. The selected

homogenates are shown in red lettering in Figure 1. After using these homogenates as seeds, different biochemical patterns were obtained from 22L, RML and ME7 strains, giving raise to the recombinant strains 22L-PMSA-1 and 22L-PMSA-2; RML-PMSA-1 and RML-PMSA-2; and ME7-PMSA-1 and ME7-PMSA-2, respectively (unpublished results).

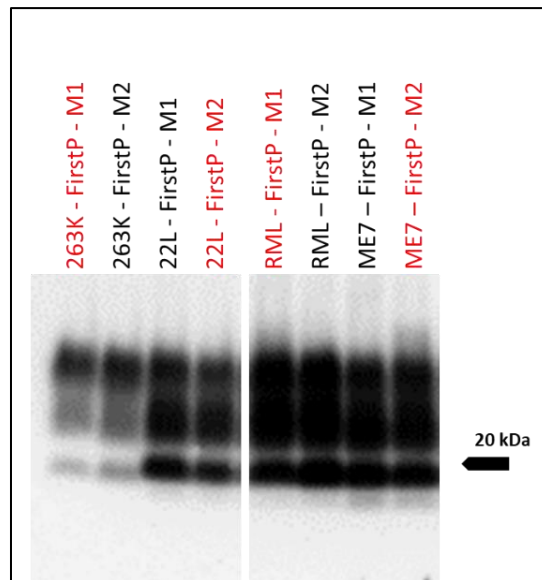


Figure 1. Western blot from TgVole brains inoculated with 22L, RML, ME7 and 263K mouse and hamster strains. After one passage with 22L, RML, ME7 and 263K strains, brains from TgVole were homogenized at 10% (w/V) and digested with 85 µg/ml of Protease K (PK). Digested samples were analysed by western blot. Biochemical characteristics of TgVole-adapted strains did not differ from those of 22L, RML, ME7 and 263K mouse and hamster strains.

Brain-derived and recombinant 22L, RML, 263K and ME7 scrapie strains are able to cause disease in transgenic mice expressing the *bank vole* 109I PrP (TgVole)

All the used strains, either from mammal or recombinant origin, were capable of infecting and causing disease in TgVole mice. All mice were sacrificed when clinical signs were detected. Signs of disease included severe ataxia, hyperexcitability and poor body condition. The mean survival time (days post inoculation ± SEM) of mice from both first and second passages are shown in Table 2. A reduction of the incubation periods in the second passage was observed for all strains but brain-derived 22L.

Table 2. Mean survival of experimentally inoculated mice. Incubation periods of mice from both first and second passages are shown as days post inoculation mean \pm SEM. Dpi: days post inoculation.

Strain		Incubation period (dpi)	
		First passage	Second passage
Brain-derived (Mouse and hamster strains)	22L	133,5 \pm 1,7	138 \pm 2,5 dpi
	RML	132,8 \pm 3,5	73 \pm 0,6
	263K	312,7 \pm 48,7	112,45 \pm 1,9
	ME7	124,8 \pm 7,6	100,4 \pm 2,4
Recombinant (PMSA adapted strains from <i>TgVole</i> passaged 22L, RML, 263K and ME7)	22L-PMSA-1	121,8 \pm 2,9	92,6 \pm 3,4
	22L-PMSA-2	123,8 \pm 3,9	87,3 \pm 1,7
	RML-PMSA-1	216,4 \pm 21,6	92,7 \pm 2,7
	RML-PMSA-2	167 \pm 17,1	98,3 \pm 3,5
	263K-PMSA	185,8 \pm 8,2	101,2 \pm 2,2
	ME7-PMSA-1	182 \pm 17	ongoing
	ME7-PMSA-2	134,2 \pm 1,8	99,5 \pm 12,7

Kaplan–Meier survival curves were performed to compare the survival times of the second passage of each mammal strain with its recombinant counterparts (Figure 2). The Mantel–Cox log-rank test revealed no significant differences between the ME7 and the ME7-PMSA-2. However, differences in the survival times were found for the 22L (** $p < 0.01$), the RML (** $p < 0.01$) and the 263K (* $p < 0.05$) mammal and recombinant strains.

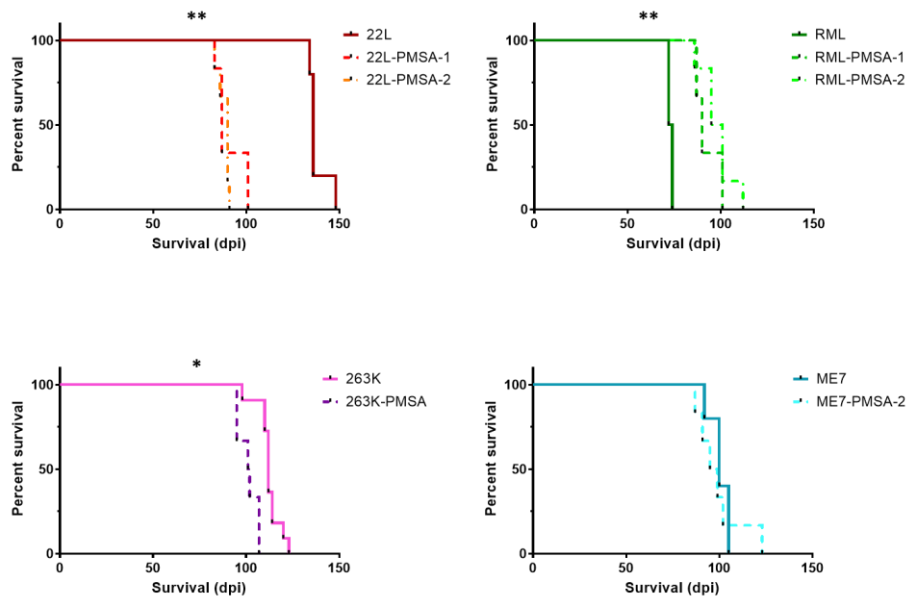


Figure 2. Survival of prion-infected TgVole mice. Figure shows Kaplan–Meier survival curves for the inoculated mice. The Mantel–Cox log-rank test revealed significant differences in the survival times for 22L compared to 22L-PMSA-1 and 22L-PMSA-2 (** $p < 0.01$), RML compared to RML-PMSA-1 and RML-PMSA-2 (** $p < 0.01$) and the 263K mammal and recombinant strains (* $p < 0.05$). No significant differences were found between the ME7 and the ME7-PMSA-2 strains. Dpi: days post inoculation.

Recombinant strains 22L-PMSA-2 y RML-PMSA-1 show no differences in prion-associated neuropathological features with their mammal equivalents

Regarding the assessment of spongiosis and PrP^{Sc} deposition, although the recombinant strains 22L-PMSA-1, RML-PMSA-2, 263K-PMSA and ME7-PMSA-2 showed significant differences with their brain-derived homologues, the strains 22L-PMSA-2 and RML-PMSA-1, displayed indistinguishable patterns from the mammal 22L and RML respectively.

Neuropathological features in 22L and 22L-PMSA-2 included synaptic, punctate PrP^{Sc} deposits. Both spongiosis and PrP^{Sc} deposits were spread throughout the brain with a mild intensity, showing peaks in pons, thalamus, septal area/striatum. Although 22L-PMSA-1 strain displayed similar PrP^{Sc} deposits, the intensity of the neuropathological features was lower and showed peaks only at the pons. When statistically assessed, no differences were found between 22L and 22L-PMSA-2 lesion profiles, while the 22L and the 22L-PMSA-1 strains showed significant differences in both spongiosis and PrP^{Sc} accumulation (Figure 3).

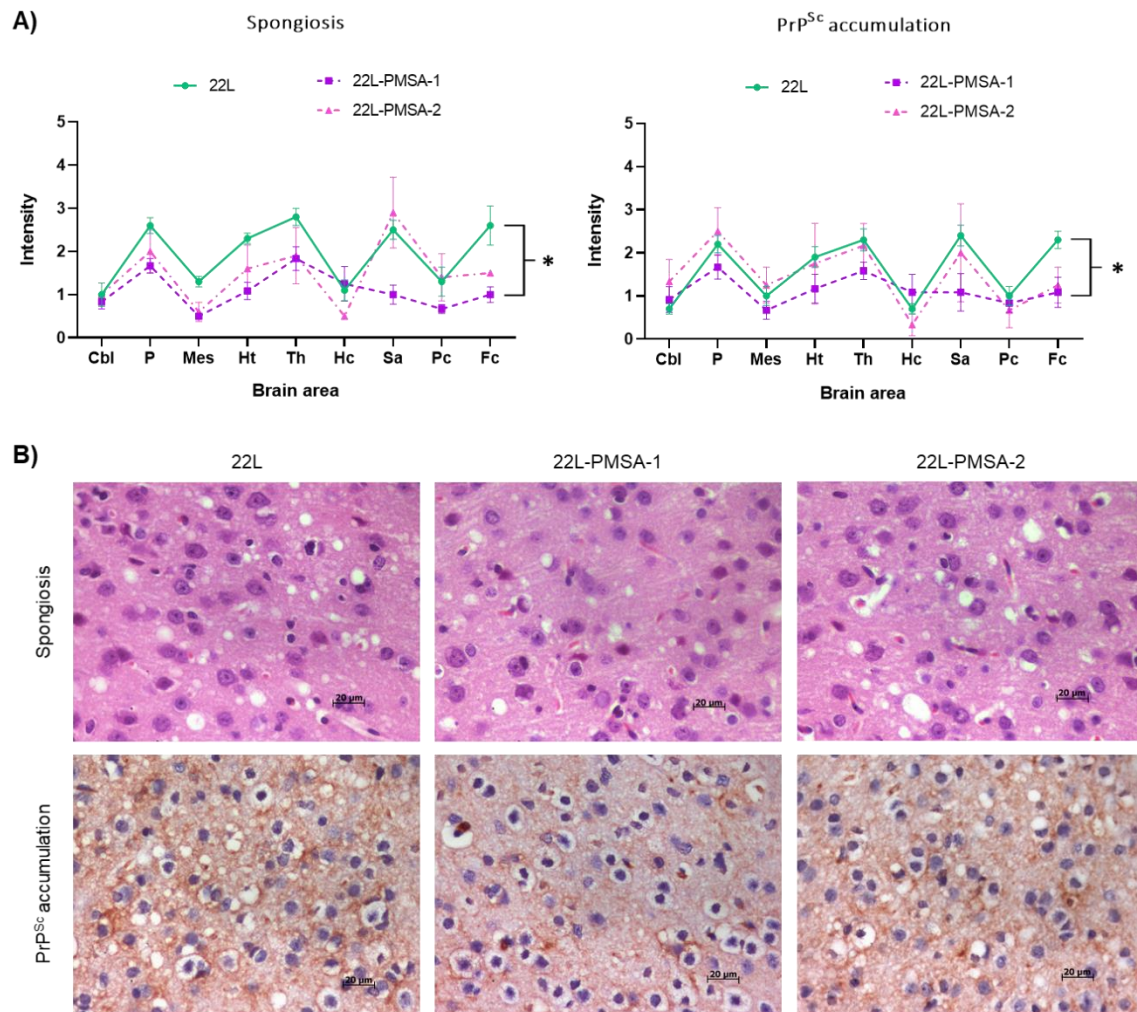


Figure 3. Neuropathological features in TgVole mice infected with the 22L mammalian strain or the recombinant 22L-PMSA-1 and 22L-PMSA-2 strains. A) Graphics show comparisons of the semiquantitative evaluation of spongiosis and PrP^{Sc} deposits (on a scale from 0, lack of staining/spongiosis, to 5, very intense staining/spongiosis) in 22L, 22L-PMSA-1 and 22L-PMSA-1 infected mice. Cbl: cerebellum, Mes: mesencephalon, Ht: hypothalamus, Th: thalamus, Hc: hippocampus, Sa: septal area/striatum, Pc: Parietal cortex and Fc: frontal cortex. Data shown represent the mean and the standard error of the mean (mean ± SEM). Evaluation of differences between groups was performed using the one-way ANOVA test followed by the Bonferroni *post hoc* test (* $p < 0.05$). Significant differences were found in both spongiosis and PrP^{Sc} accumulation between the 22L and the 22L-PMSA-1 strains. B) Representative images of spongiosis and PrP^{Sc} deposits detected in the brains of infected TgVole mice.

Concerning RML and its recombinant homologues, the spongiosis profiles were very similar between the three of them, showing mild intensities. Peaks were observed in pons, thalamus, septal area/striatum and frontal cortex. No statistical differences

were found in spongiosis between these three strains. Regarding PrP^{Sc} accumulation, RML and RML-PMSA-1 strains showed no significant differences, with intra and extraneuronal panencephalic punctate deposits of mild intensity. However, RML-PMSA-2 strain differed to brain-derived RML, mainly showing plaque-like deposits especially evident in septal area/striatum and frontal cortex. Significant differences were found in PrP^{Sc} accumulation between these two strains (Figure 4).

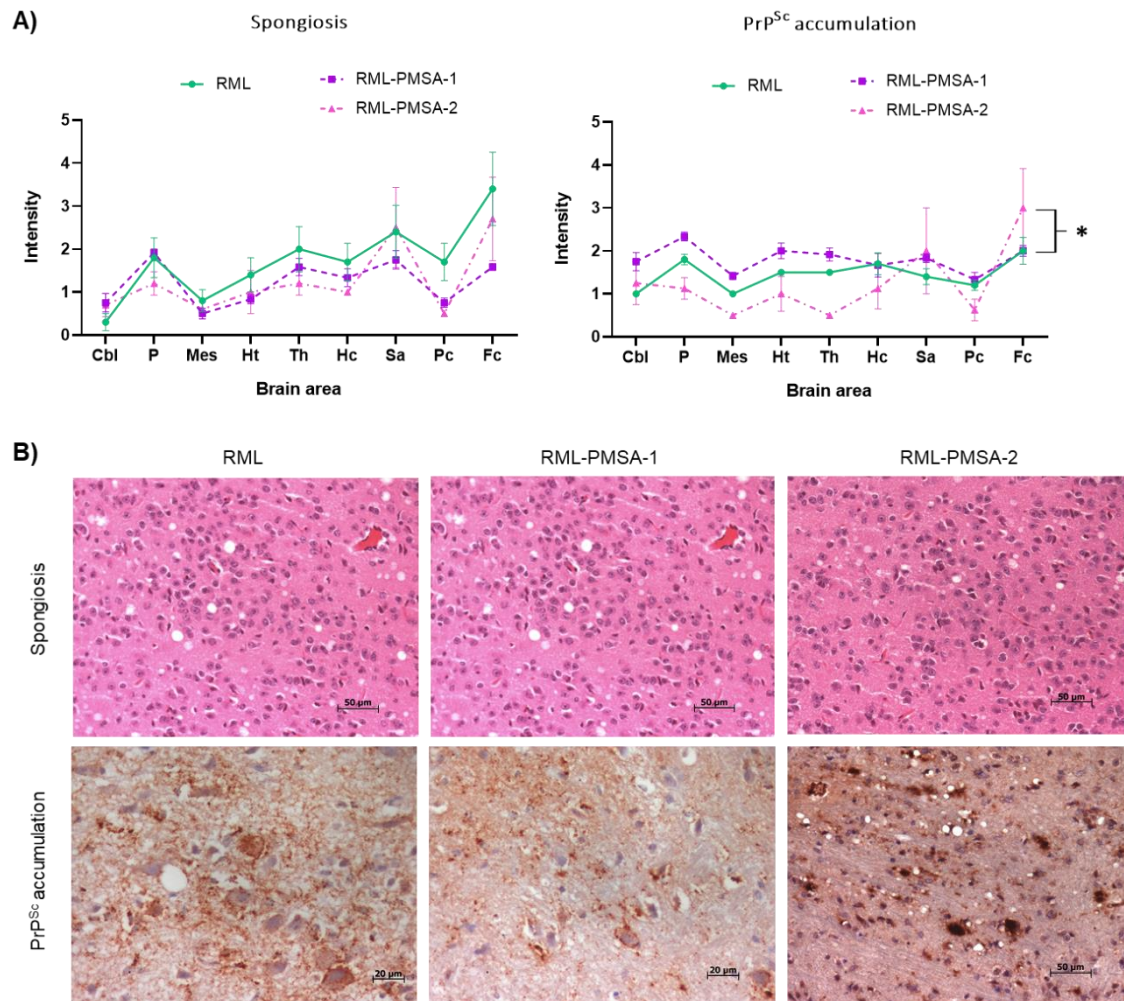


Figure 4. Neuropathology in TgVole infected with the RML mammalian strain and its recombinant counterparts. A) Lesion profile and PrP^{Sc} accumulation curve (on a scale from 0, lack of staining/spongiosis, to 5, very intense staining/spongiosis) in RML, RML-PMSA-1 and RML-PMSA-2 inoculated TgVole. Cbl: cerebellum, Mes: mesencephalon, Ht: hypothalamus, Th: thalamus, Hc: hippocampus, Sa: septal area/striatum, Pc: Parietal cortex and Fc: frontal cortex. Data represent the mean and the standard error of the mean (mean \pm SEM) of each group. Significant differences were evaluated with the one-way ANOVA test followed by the Bonferroni *post hoc* test (* $p < 0.05$). Differences were found in PrP^{Sc} accumulation between the RML and the RML-PMSA-2 strains. B) Spongiosis and PrP^{Sc} deposits in the brains of RML, RML-PMSA-1 and RML-PMSA-2 infected mice.

263K-PMSA and ME7-PMSA-2 recombinant strains do not maintain the neuropathological characteristics of their brain-derived homologues

No similarities were found when comparing neuropathology between the 263K strain with its recombinant homologue. The 263K strain showed fine, diffuse PrP^{Sc} deposits mainly in pons and thalamus, where also peaks of spongiosis were found. The 263K-PMSA strain produced very scarce spongiosis and PrP^{Sc}. PrP^{Sc} accumulation was characterized by plaque and plaque-like deposits, and vacuoles were principally found in association with these deposits. Statistical differences were found for both neuropathological features between these strains (Figure 5).

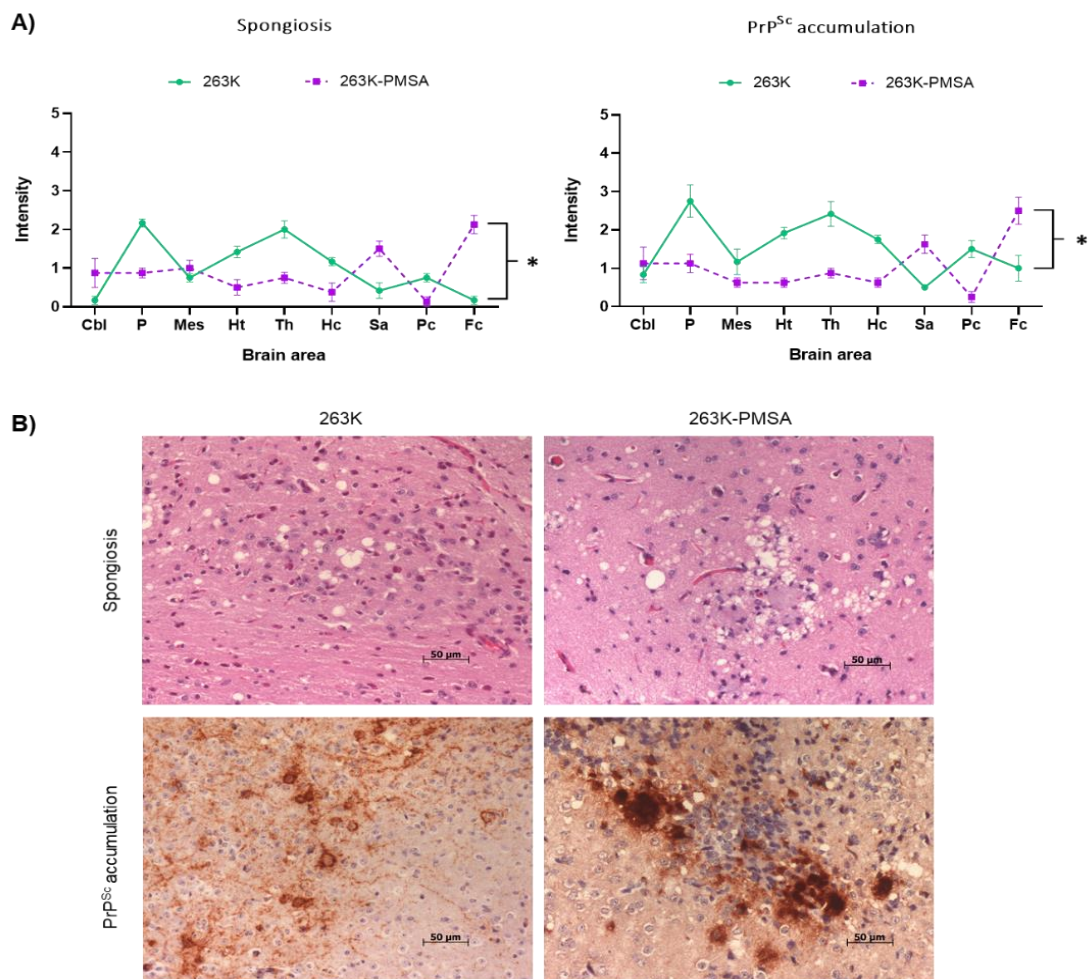


Figure 5. Comparison between 263K and 263K-PMSA lesions in mice brains. A) Semiquantitative evaluation of spongiosis and PrP^{Sc} deposits (on a scale from 0, lack of staining/spongiosis, to 5, very intense staining/spongiosis) in 263K and 263K-PMSA infected TgVole. Cbl: cerebellum, Mes: mesencephalon, Ht: hypothalamus, Th: thalamus, Hc: hippocampus, Sa: septal area/striatum, Pc: Parietal cortex and Fc: frontal cortex. Data shown represent the mean and the standard error of the mean (mean

± SEM). Evaluation of significant differences was performed using the Mann–Whitney U test ($*p < 0.05$). Significant differences were found between strains in both PrP^{Sc} accumulation and spongiform lesions. B) Representative images of histopathological prion-related features found in both strains.

Significant differences were also found when comparing the ME7 strain and the ME7-PMSA-2 recombinant strain lesion profiles. The ME7 mammal strain showed high intensities of spongiosis with vacuoles of different sizes, while spongiform lesions of ME7-PMSA-2 were of very low intensity showing small vacuoles. PrP^{Sc} accumulation was characterized in both cases fine, intra and extra-neuronal punctate deposits, although the deposit profiles also differed between both strains (Figure 6). When assessed using the Mann–Whitney U test, these strains showed significant differences in spongiosis and PrP^{Sc} accumulation. Results on recombinant ME7-PMSA-1 are still ongoing.

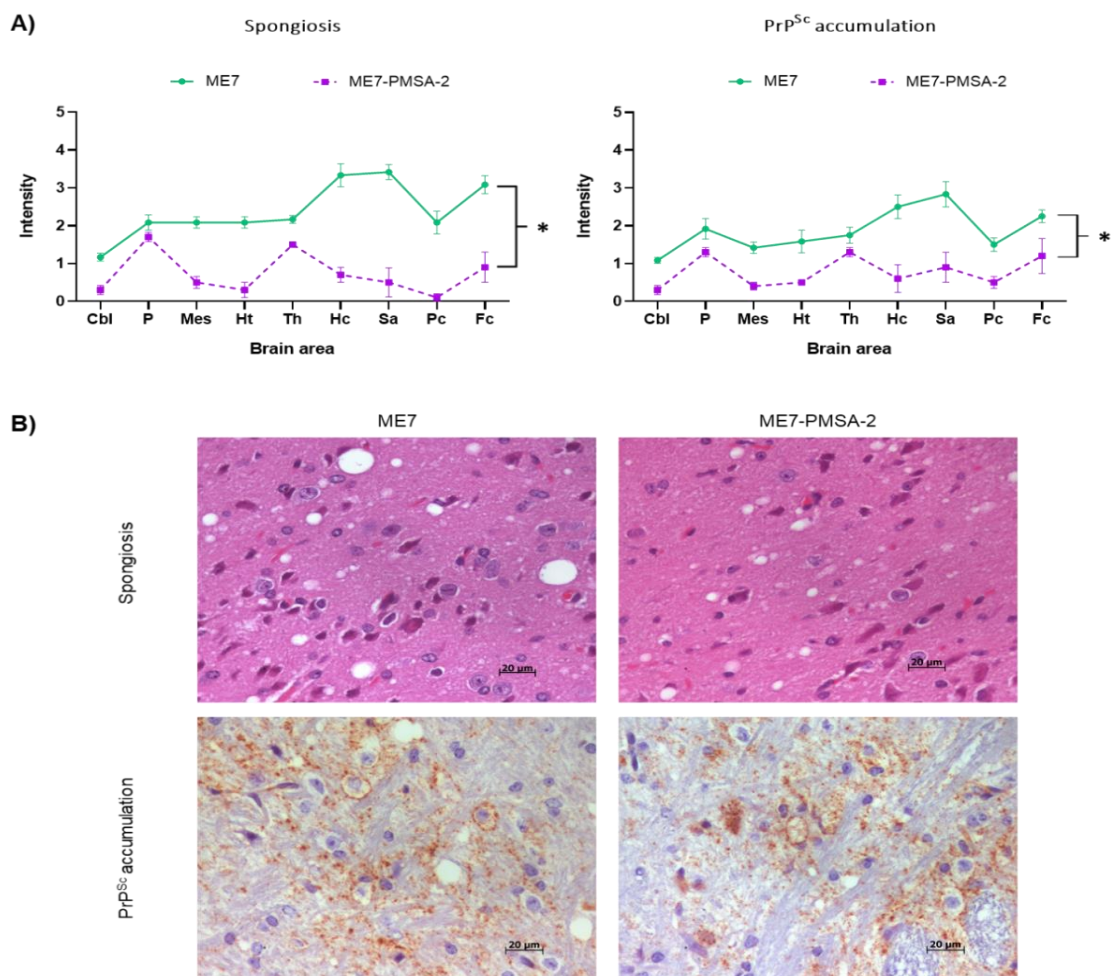


Figure 6. Spongiosis and PrP^{Sc} accumulation in TgVole infected with the ME7 mammalian strain and ME7-PMSA-2 recombinant strain. A) Graphics show the semiquantitative evaluation of spongiosis and PrP^{Sc} deposits (on a scale from 0, lack of staining/spongiosis, to 5, very intense staining/spongiosis) in both

strains. Cbl: cerebellum, Mes: mesencephalon, Ht: hypothalamus, Th: thalamus, Hc: hippocampus, Sa: septal area/striatum, Pc: Parietal cortex and Fc: frontal cortex. Data are represented by the mean and the standard error of the mean (mean \pm SEM). Significant differences were evaluated by the Mann–Whitney U test ($*p < 0.05$). Significant differences between the two strains were found in spongiosis and PrP^{Sc} accumulation. B) Representative images of the neuropathological features provoked by both strains in the brains of TgVole.

Discussion

There are still many characteristics of prion diseases, such as the strain phenomenon, interspecies transmission, neurotoxicity or the molecular mechanisms of misfolding that remain unknown. Since prions are exclusively proteinaceous pathogens, these characteristics are given by their structure, but it is precisely this proteinaceous nature what hinders their study. The *in vitro* generation of self-propagating infectious prions was one of the greatest achievements in the research of prion diseases, since it made possible the production of unlimited amounts of prions and to easily produce and test distinct PrP sequences, including mutants. Since the first description of a technique able to generate large amounts of rec-PrP (Hornemann *et al.*, 1997), a multitude of recombinant prions have been generated *in vitro* (Bocharova *et al.*, 2005; Colby *et al.*, 2010; Deleault *et al.*, 2007; Legname *et al.*, 2004; Legname *et al.*, 2005; Makarava *et al.*, 2010). However, and despite the fact that multiple infectious recombinant prions have been generated (Fernandez-Borges *et al.*, 2017; Westaway *et al.*, 2017) many misfolded rec-PrPs generated *in vitro* are poorly infectious *in vivo* and/or differ from mammal prions in the neuropathological characteristics they provoke (Legname *et al.*, 2004), limiting their use as good prion models. The generation of recombinant prions harboring the characteristics of brain-derived prions causing TSEs is of crucial importance, as knowledge gained from studies with recombinant prions could help understand the unknown aspects of the pathogenesis of TSEs. Previous (unpublished) results had shown that recombinant bank vole protein has the ability to misfold in different ways acquiring different biochemical and biological properties, and also to sustain the propagation of known mammal prion strains. However, we were unaware of the phenotypic proximity of the resulting misfolded recombinant PrPs to their brain-derived homologues.

Bank vole and transgenic mice expressing vole PrP^C are important models for TSE research. These animals are susceptible to a great diversity of prion strains from different donor species (Agrimi *et al.*, 2008; Mabbott *et al.*, 2014; Pirisinu *et al.*, 2016) and are thus considered as the "universal prion acceptors". Previous experiments had demonstrated the susceptibility of these models to some scrapie strains (Cartoni *et al.*, 2005; Watts *et al.*, 2014). Moreover, it had also been shown that M109 bank voles can be efficiently infected with the 263K and the ME7 scrapie strains (Piening *et al.*, 2006). In this study, following inoculation of TgVole mice with the mouse and hamster scrapie strains 22L, RML, 263K and ME7 (Bruce, 1993; Chandler, 1963; Kimberlin & Walker, 1986; Zlotnik & Rennie, 1963), as well as with their recombinant counterparts, we found that all of them were capable of producing disease in the animals. Therefore, we corroborate that transgenic mice expressing I109 PrP^C can be infected with these strains, both brain-derived and recombinant. Moreover, we observed that the biochemical properties of these strains were not altered by their passage in TgVole mice (Figure 1), and remained equal to those in their original species, mouse and hamster (Bartz *et al.*, 2016; Supattapone *et al.*, 2018).

As previously said, the transmission barrier phenomenon, which occurs due to the inoculation of prions in a species expressing different PrP^C from the original host, may provoke prolonged incubation periods and reduction in the attack rates (Priola, 1999; Scott *et al.*, 2005). This phenomenon does not only appear when prions are inoculated in a new species, but also when recombinant prions are inoculated in *in vivo* models. In the bioassay carried out in this study, we performed two passages of each strain. In the case of brain-derived strains, a second passage was performed to avoid the mouse-bank vole transmission barrier, and concerning the recombinant strains, in order to avoid the recombinant-mammal transmission barrier since recombinant prions have to adapt to a PrP^C with glycans and GPI anchor (Kim *et al.*, 2009). Second passages resulted in a reduction of incubation times, reflecting the overcoming of these transmission barriers. Results on the propagation efficiency and pathogenic ability of the strains used in TgVole mice corroborate the usefulness of this model for prion research, and that combining bank vole rodent models and recombinant prions, is a valuable tool to overcome the difficulties found in the study of prion diseases.

Moreover, despite the great number of studies using scrapie prions in bank voles or transgenic mice expressing bank vole PrP^C (Di Bari *et al.*, 2008; Orru *et al.*, 2015; Piening *et al.*, 2006; Pirisinu *et al.*, 2013; Schwenke *et al.*, 2022), descriptions on the neuropathology caused by scrapie in these models are scarce. Besides the fact that the mouse model I109 TgVole can be infected with the used scrapie strains, in this study we make the first description of the neuropathology that these strains cause in TgVole mice.

The main objective of this study was to determine how the neuropathological characteristics of brain-derived prion strains vary after propagation *in vitro* on a recombinant protein substrate and subsequently *in vivo*. Among the recombinant strains inoculated, strain 22L-PMSA-2 and RML-PMSA-1, obtained after *in vitro* replication of 22L and RML strains respectively, showed high similarity to their brain-derived counterparts in terms of neuropathological features associated with TSEs. Strains 22L and 22L-PMSA-2 both showed a PrP^{Sc} accumulation pattern with diffuse, intra and extra neuronal particulate deposits (Jeffrey & González, 2007). The lesion profiles found in both strains were equal and displayed no significant differences, showing peaks of both PrP^{Sc} accumulation and spongiosis in the pons, thalamus, and septal area/striatum (Figure 3). Concerning the RML and RML-PMSA-1 strains, the neuropathology consisted of a panencephalic pattern of spongiosis and fine-punctate PrP^{Sc} deposits, with peaks in the pons and frontal cortex. These two strains also showed no significant differences between them when lesion profiles were compared (Figure 4). On the other hand, the rest of the recombinant strains studied (22L-PMSA-1, RML-PMSA-2, 263K-PMSA and ME7-PMSA-2), showed no similarity with the strains from which they originated, giving rise to differences in PrP^{Sc} deposition and spongiosis patterns.

As previously said, it has been shown that there is an intrinsic variability in the production of different misfolded rec-PrPs that results in recombinant prions with strikingly different biological properties (Wang *et al.*, 2017). From our results we observe that, indeed, after the generation of recombinant prions they can easily differ from the neuropathological characteristics of the prions from which they originate. One of the explanations given for this is that, *in vitro*, different tertiary or quaternary structures are generated that give rise to these differences (Wang *et al.*, 2010). This misfolding event

in vitro cannot be controlled with complete precision, and despite using the same conditions, different conformations of stochastically misfolded rec-PrP could be generated. Regarding the differences found between the brain-derived strains and the recombinant ones generated from them, these could be due to a difficulty of the recombinant strains, which lack post-translational modifications such as glycosylations and the GPI anchor, to adapt to the environment provided by the host *in vivo*. Strain 263K, for example, shows a predominant diglycosylated pattern, which could make it more susceptible to these differences in glycosylation levels and explain certain inabilities of its recombinant counterpart to retain its neuropathological characteristics. On the other hand, it has been shown that replication of a given strain *in vitro* is highly dependent on specific cofactors (Fernández-Borges, Di Bari, *et al.*, 2017) so perhaps the conditions used in this study were not ideal for strains such as 263K (Figure 5) or ME7 (Figure 6), which showed the greatest differences between brain-derived and recombinant strains.

This study focuses on the analysis of the neuropathological features caused by the assessed strains. Besides to clinical signs and lesion profiles, prion strains also exhibit certain biochemical characteristics that can be used to distinguish them, such as the electrophoretic mobility of PrP^{Sc} after digestion with PK and the glycosylation pattern (molecular weight and relative proportion of the three glycoforms) of the strain (Bessen & Marsh, 1992; Gretzschel *et al.*, 2005). The electrophoretic pattern of a strain is one of the main characteristics used for strain differentiation, and it is dependent on the PK cleavage site and the proportion of the different glycoforms present in it (Parchi *et al.*, 1996). Therefore, the analysis of the resemblance between the brain-derived and recombinant strains should be completed with the assessment of their biochemical characteristics, such as PK resistance or stability to denaturation using guanidium chloride. Nevertheless, our results show that from scrapie 22L and RML strains it is possible to obtain prions that maintain their neuropathological properties after their propagation in recombinant protein, and this points to them as good recombinant models to be used in subsequent studies that allow us to elucidate the still unknown aspects of transmissible spongiform encephalopathies.

In conclusion, this study confirms that the combination of bank vole rodent models and recombinant prions, which are widely versatile and easy to use, can be a valuable tool to help overcome the difficulties encountered in the study of prion diseases. Moreover, it provides an accurate description of the neuropathology associated to the 22L, RML, 263K and ME7 scrapie strains in the TgVole model. Finally, and more importantly, our results also show that prions from the scrapie strains 22L and RML can maintain their neuropathological properties after their propagation in recombinant protein, thus being good models to use in further studies.

Ethics approval. The transgenic murine line TgVole was generated by Dr. Glenn Telling (Prion Research Center – CSU, Colorado, USA) and kindly provided by Dr. J. Castilla (CIC bioGUNE, Derio, Spain). Mice were maintained and bred in the CEETE (Zaragoza, Spain) facilities. All procedures involving animals were approved by the Ethics Committee for Animal Experiments of the University of Zaragoza (permit number PI57/20) and were performed in accordance with the recommendations for the care and use of experimental animals and in agreement with the Spanish law for Animal Protection RD53/2013 and the European Union Directive 2010/63.

Acknowledgements: Brain-derived 22L, RML and ME7 strains were originally provided by Dr. Tomás Mayoral (CISA-INIA, Madrid) and brain-derived 263K strain by Dr. Cristina Sigurdson (UCSD, San Diego). Experiments concerning purification of bank vole I109 recombinant PrP, PMSA for recombinant PrP misfolding and propagation, misfolded recombinant PrP detection and western blot were performed in collaboration with Dr Joaquin Castilla and his team at the CIC-bioGUNE (Bizkaia, Spain) facilities.

Supplementary Materials

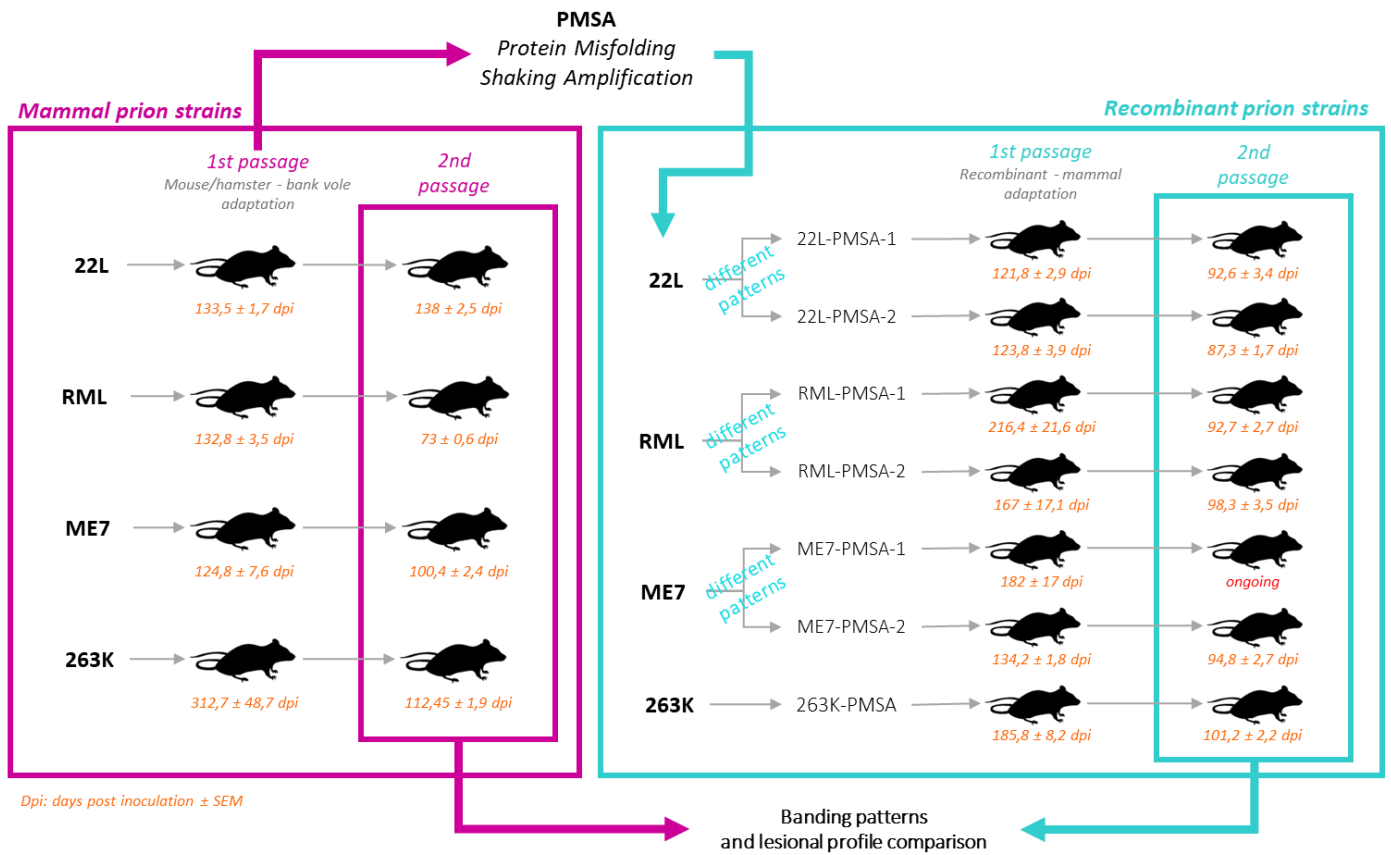


Figure S1. Diagram of the study. Figure shows the methodology followed in the study and the survival periods for each inoculated strain (shown as days post inoculation ± SEM).

References

- Agrimi, U., Nonno, R., Dell'Omo, G., Di Bari, M. A., Conte, M., Chiappini, B., Esposito, E., Di Guardo, G., Windl, O., Vaccari, G., & Lipp, H. P. (2008). Prion protein amino acid determinants of differential susceptibility and molecular feature of prion strains in mice and voles. *PLoS Pathog*, *4*(7), e1000113. doi: 10.1371/journal.ppat.1000113
- Bartz, J., Carroll, J. A., Striebel, J. F., Rangel, A., Woods, T., Phillips, K., Peterson, K. E., Race, B., & Chesebro, B. (2016). Prion Strain Differences in Accumulation of PrPSc on Neurons and Glia Are Associated with Similar Expression Profiles of Neuroinflammatory Genes: Comparison of Three Prion Strains. *PLOS Pathogens*, *12*(4). doi: 10.1371/journal.ppat.1005551
- Bessen, R. A., Kocisko, D. A., Raymond, G. J., Nandan, S., Lansbury, P. T., & Caughey, B. (1995). Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature*, *375*(6533), 698-700. doi: 10.1038/375698a0
- Bessen, R. A., & Marsh, R. F. (1992). Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol*, *66*(4), 2096-2101. doi: 10.1128/JVI.66.4.2096-2101.1992
- Bieschke, J., Weber, P., Sarafoff, N., Beekes, M., Giese, A., & Kretzschmar, H. (2004). Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(33), 12207-12211. doi: 10.1073/pnas.0404650101
- Bocharova, O. V., Breydo, L., Salnikov, V. V., Gill, A. C., & Baskakov, I. V. (2005). Synthetic prions generated in vitro are similar to a newly identified subpopulation of PrPSc from sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Protein Science*, *14*(5), 1222-1232. doi: 10.1110/ps.041186605
- Bruce, M. E. (1993). Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull*, *49*(4), 822-838. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072649
- Bruce, M. E. (2003). TSE strain variation. *Br Med Bull*, *66*, 99-108. doi: 10.1093/bmb/66.1.99
- Cartoni, C., Schinina, M. E., Maras, B., Nonno, R., Vaccari, G., Di Baria, M. A., Conte, M., Liu, Q. G., Lu, M., Cardone, F., Windl, O., Pocchiari, M., & Agrimi, U. (2005). Identification of the pathological prion protein allotypes in scrapie-infected heterozygous bank voles (*Clethrionomys glareolus*) by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, *1081*(1), 122-126. doi: 10.1016/j.chroma.2005.04.035
- Castilla, J., Saá, P., Hetz, C., & Soto, C. (2005). In Vitro Generation of Infectious Scrapie Prions. *Cell*, *121*(2), 195-206. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.011

- Chandler, R. L. (1963). Experimental Scrapie in the Mouse. *Research in Veterinary Science*, 4(2), 276-285. doi: 10.1016/s0034-5288(18)34870-7
- Colby, D. W., Wain, R., Baskakov, I. V., Legname, G., Palmer, C. G., Nguyen, H.-O. B., Lemus, A., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2010). Protease-Sensitive Synthetic Prions. *PLOS Pathogens*, 6(1). doi: 10.1371/journal.ppat.1000736
- Collins, S. J., Lawson, V. A., & Masters, C. L. (2004). Transmissible spongiform encephalopathies. *The Lancet*, 363(9402), 51-61. doi: 10.1016/s0140-6736(03)15171-9
- DeArmond, S. J., Sanchez, H., Yehiely, F., Qiu, Y., Ninchak-Casey, A., Daggett, V., Camerino, A. P., Cayetano, J., Rogers, M., Groth, D., Torchia, M., Tremblay, P., Scott, M. R., Cohen, F. E., & Prusiner, S. B. (1997). Selective neuronal targeting in prion disease. *Neuron*, 19(6), 1337-1348. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80424-9
- Deleault, N. R., Harris, B. T., Rees, J. R., & Supattapone, S. (2007). Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(23), 9741-9746. doi: 10.1073/pnas.0702662104
- Di Bari, M. A., Chianini, F., Vaccari, G., Esposito, E., Conte, M., Eaton, S. L., Hamilton, S., Finlayson, J., Steele, P. J., Dagleish, M. P., Reid, H. W., Bruce, M., Jeffrey, M., Agrimi, U., & Nonno, R. (2008). The bank vole (*Myodes glareolus*) as a sensitive bioassay for sheep scrapie. *J Gen Virol*, 89(Pt 12), 2975-2985. doi: 10.1099/vir.0.2008/005520-0
- Di Bari, M. A., 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(3), e1003219. doi: 10.1371/journal.ppat.1003219
- Endo, T., Groth, D., Prusiner, S. B., & Kobata, A. (1989). Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry*, 28(21), 8380-8388. doi: 10.1021/bi00447a017
- Eraña, H., Charco, J. M., Di Bari, M. A., Diaz-Dominguez, C. M., Lopez-Moreno, R., Vidal, E., Gonzalez-Miranda, E., Perez-Castro, M. A., Garcia-Martinez, S., Bravo, S., Fernandez-Borges, N., Geijo, M., D'Agostino, C., Garrido, J., Bian, J., Konig, A., Uluca-Yazgi, B., Sabate, R., Khaychuk, V., Vanni, I., Telling, G. C., Heise, H., Nonno, R., Requena, J. R., & Castilla, J. (2019). Development of a new largely scalable in vitro prion propagation method for the production of infectious recombinant prions for high resolution structural studies. *PLoS Pathog*, 15(10), e1008117. doi: 10.1371/journal.ppat.1008117
- Fernández-Borges, N., Di Bari, M. A., Eraña, H., Sánchez-Martín, M., Pirisinu, L., Parra, B., Elezgarai, S. R., Vanni, I., López-Moreno, R., Vaccari, G., Venegas, V., Charco, J. M., Gil,

- D., Harrathi, C., D'Agostino, C., Agrimi, U., Mayoral, T., Requena, J. R., Nonno, R., & Castilla, J. (2017). Cofactors influence the biological properties of infectious recombinant prions. *Acta Neuropathologica*, *135*(2), 179-199. doi: 10.1007/s00401-017-1782-y
- Fernández-Borges, N., Eraña, H., Elezgarai, S. R., 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. *Prions*, 205-216. doi: 10.1007/978-1-4939-7244-9_15 (Methods in Molecular Biology)
- Fraser, H., & Dickinson, A. G. (1968). The sequential development of the brain lesions of scrapie in three strains of mice. *Journal of Comparative Pathology*, *78*(3), 301-311. doi: 10.1016/0021-9975(68)90006-6
- Fraser, H., & Dickinson, A. G. (1973). Scrapie in mice. *Journal of Comparative Pathology*, *83*(1), 29-40. doi: 10.1016/0021-9975(73)90024-8
- Gretzschel, A., Buschmann, A., Eiden, M., Ziegler, U., Luhken, G., Erhardt, G., & Groschup, M. H. (2005). Strain typing of German transmissible spongiform encephalopathies field cases in small ruminants by biochemical methods. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, *52*(2), 55-63. doi: 10.1111/j.1439-0450.2005.00827.x
- Harrathi, C., Fernández-Borges, N., Eraña, H., Elezgarai, S. R., Venegas, V., Charco, J. M., & Castilla, J. (2018). Insights into the Bidirectional Properties of the Sheep–Deer Prion Transmission Barrier. *Molecular Neurobiology*, *56*(8), 5287-5303. doi: 10.1007/s12035-018-1443-8
- Hornemann, S., Korth, C., Oesch, B., Riek, R., Wider, G., Wüthrich, K., & Glockshuber, R. (1997). Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization. *FEBS Letters*, *413*(2), 277-281. doi: 10.1016/s0014-5793(97)00921-6
- Jeffrey, M., & González, L. (2007). Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *33*(4), 373-394. doi: 10.1111/j.1365-2990.2007.00868.x
- Kim, J. I., Surewicz, K., Gambetti, P., & Surewicz, W. K. (2009). The role of glycoposphatidylinositol anchor in the amplification of the scrapie isoform of prion protein in vitro. *FEBS Lett*, *583*(22), 3671-3675. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.049
- Kimberlin, R. H., & Walker, C. A. (1986). Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly. *J Gen Virol*, *67* (Pt 2), 255-263. doi: 10.1099/0022-1317-67-2-255

- Legname, G., Baskakov, I. V., Nguyen, H. O., Riesner, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2004). Synthetic mammalian prions. *Science*, *305*(5684), 673-676. doi: 10.1126/science.1100195
- Legname, G., Nguyen, H.-O. B., Baskakov, I. V., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2005). Strain-specified characteristics of mouse synthetic prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(6), 2168-2173. doi: 10.1073/pnas.0409079102
- Mabbott, N. A., Watts, J. C., Giles, K., Patel, S., Oehler, A., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2014). Evidence That Bank Vole PrP Is a Universal Acceptor for Prions. *PLOS Pathogens*, *10*(4). doi: 10.1371/journal.ppat.1003990
- Makarava, N., Kovacs, G. G., Bocharova, O., Savtchenko, R., Alexeeva, I., Budka, H., Rohwer, R. G., & Baskakov, I. V. (2010). Recombinant prion protein induces a new transmissible prion disease in wild-type animals. *Acta Neuropathologica*, *119*(2), 177-187. doi: 10.1007/s00401-009-0633-x
- Morales, R., Abid, K., & Soto, C. (2007). The prion strain phenomenon: molecular basis and unprecedented features. *Biochim Biophys Acta*, *1772*(6), 681-691. doi: 10.1016/j.bbadis.2006.12.006
- Moudjou, M., Chapuis, J., Mekrouti, M., Reine, F., Herzog, L., Sibille, P., Laude, H., Vilette, D., Andreoletti, O., Rezaei, H., Dron, M., & Beringue, V. (2016). Glycoform-independent prion conversion by highly efficient, cell-based, protein misfolding cyclic amplification. *Sci Rep*, *6*, 29116. doi: 10.1038/srep29116
- Nonno, R., Di Bari, M. A., Cardone, F., Vaccari, G., Fazzi, P., Dell'Omo, G., Cartoni, C., Ingrosso, L., Boyle, A., Galeno, R., Sbriccoli, M., Lipp, H. P., Bruce, M., Pocchiari, M., & Agrimi, U. (2006). Efficient transmission and characterization of Creutzfeldt-Jakob disease strains in bank voles. *PLoS Pathog*, *2*(2), e12. doi: 10.1371/journal.ppat.0020012
- Orru, C. D., Groveman, B. R., Raymond, L. D., Hughson, A. G., 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*(6), e1004983. doi: 10.1371/journal.ppat.1004983
- Otero, A., Barrio, T., Eraña, H., Charco, J. M., Betancor, M., Díaz-Domínguez, C. M., Marín, B., Andréoletti, O., Torres, J. M., Kong, Q., Badiola, J. J., Bolea, R., & Castilla, J. (2022). Glycans are not necessary to maintain the pathobiological features of bovine spongiform encephalopathy. *PLOS Pathogens*, *18*(10). doi: 10.1371/journal.ppat.1010900
- Parchi, P., Castellani, R., Capellari, S., Ghetti, B., Young, K., Chen, S. G., Farlow, M., Dickson, D. W., Sima, A. A., Trojanowski, J. Q., Petersen, R. B., & Gambetti, P. (1996). Molecular basis

- of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol*, 39(6), 767-778. doi: 10.1002/ana.410390613
- Piening, N., Nonno, R., Di Bari, M., Walter, S., Windl, O., Agrimi, U., Kretzschmar, H. A., & Bertsch, U. (2006). Conversion efficiency of bank vole prion protein in vitro is determined by residues 155 and 170, but does not correlate with the high susceptibility of bank voles to sheep scrapie in vivo. *J Biol Chem*, 281(14), 9373-9384. doi: 10.1074/jbc.M512239200
- Pirisinu, L., Di Bari, M. A., D'Agostino, C., Marcon, S., Riccardi, G., Poleggi, A., Cohen, M. L., Appleby, B. S., Gambetti, P., Ghetti, B., Agrimi, U., & Nonno, R. (2016). Gerstmann-Straussler-Scheinker disease subtypes efficiently transmit in bank voles as genuine prion diseases. *Sci Rep*, 6, 20443. doi: 10.1038/srep20443
- Pirisinu, L., Marcon, S., Di Bari, M. A., D'Agostino, C., Agrimi, U., & Nonno, R. (2013). Biochemical characterization of prion strains in bank voles. *Pathogens*, 2(3), 446-456. doi: 10.3390/pathogens2030446
- Piro, J. R., Harris, B. T., Nishina, K., Soto, C., Morales, R., Rees, J. R., & Supattapone, S. (2009). Prion protein glycosylation is not required for strain-specific neurotropism. *J Virol*, 83(11), 5321-5328. doi: 10.1128/JVI.02502-08
- Priola, S. A. (1999). Prion protein and species barriers in the transmissible spongiform encephalopathies. *Biomed Pharmacother*, 53(1), 27-33. doi: 10.1016/s0753-3322(99)80057-2
- Prusiner, S. B. (1998). The prion diseases. *Brain Pathol*, 8(3), 499-513.
- Schwenke, K. A., Walzlein, J. H., Bauer, A., Thomzig, A., & Beekes, M. (2022). Primary glia cells from bank vole propagate multiple rodent-adapted scrapie prions. *Sci Rep*, 12(1), 2190. doi: 10.1038/s41598-022-06198-4
- Scott, M. R., Peretz, D., Nguyen, H. O., Dearmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2005). Transmission barriers for bovine, ovine, and human prions in transgenic mice. *J Virol*, 79(9), 5259-5271. doi: 10.1128/JVI.79.9.5259-5271.2005
- Supattapone, S., Katorcha, E., Gonzalez-Montalban, N., Makarava, N., Kovacs, G. G., & Baskakov, I. V. (2018). Prion replication environment defines the fate of prion strain adaptation. *PLOS Pathogens*, 14(6). doi: 10.1371/journal.ppat.1007093
- Tuzi, N. L., Cancellotti, E., Baybutt, H., Blackford, L., Bradford, B., Plinston, C., Coghill, A., Hart, P., Piccardo, P., Barron, R. M., & Manson, J. C. (2008). Host PrP glycosylation: a major factor determining the outcome of prion infection. *PLoS Biol*, 6(4), e100. doi: 10.1371/journal.pbio.0060100
- Wang, F., Wang, X., Orru, C. D., Groveman, B. R., Surewicz, K., Abskharon, R., Imamura, M., Yokoyama, T., Kim, Y. S., Vander Stel, K. J., Sinniah, K., Priola, S. A., Surewicz, W. K.,

- Caughey, B., & Ma, J. (2017). Self-propagating, protease-resistant, recombinant prion protein conformers with or without in vivo pathogenicity. *PLoS Pathog*, *13*(7), e1006491. doi: 10.1371/journal.ppat.1006491
- Wang, F., Wang, X., Yuan, C. G., & Ma, J. (2010). Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science*, *327*(5969), 1132-1135. doi: 10.1126/science.1183748
- Watts, J. C., Giles, K., Patel, S., Oehler, A., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2014). Evidence that bank vole PrP is a universal acceptor for prions. *PLoS Pathog*, *10*(4), e1003990. doi: 10.1371/journal.ppat.1003990
- Westaway, D., Wang, F., Wang, X., Orrú, C. D., Groveman, B. R., Surewicz, K., Abskharon, R., Imamura, M., Yokoyama, T., Kim, Y.-S., Vander Stel, K. J., Sinniah, K., Priola, S. A., Surewicz, W. K., Caughey, B., & Ma, J. (2017). Self-propagating, protease-resistant, recombinant prion protein conformers with or without in vivo pathogenicity. *PLOS Pathogens*, *13*(7). doi: 10.1371/journal.ppat.1006491
- Williamson, R. A., Peretz, D., Pinilla, C., Ball, H., Bastidas, R. B., Rozenshteyn, R., Houghten, R. A., Prusiner, S. B., & Burton, D. R. (1998). Mapping the Prion Protein Using Recombinant Antibodies. *Journal of Virology*, *72*(11), 9413-9418. doi: 10.1128/jvi.72.11.9413-9418.1998
- Wiseman, F. K., Cancellotti, E., Piccardo, P., Iremonger, K., Boyle, A., Brown, D., Ironside, J. W., Manson, J. C., & Diack, A. B. (2015). The glycosylation status of PrPC is a key factor in determining transmissible spongiform encephalopathy transmission between species. *J Virol*, *89*(9), 4738-4747. doi: 10.1128/JVI.02296-14
- Zlotnik, I., & Rennie, J. C. (1963). Further observations on the experimental transmission of scrapie from sheep and goats to laboratory mice. *J Comp Pathol*, *73*, 150-162. doi: 10.1016/s0368-1742(63)80018-1

Discusión general

Las enfermedades priónicas (EET) son trastornos neurodegenerativos mortales en los que el principal hecho patogénico es la conversión de PrP^C en PrP^{Sc}, lo que lleva a la acumulación de PrP^{Sc} en el sistema nervioso central (SNC). Esta acumulación provoca la disfunción y muerte de las neuronas, dando lugar a una degeneración esponjiforme del sistema nervioso central. Las EET afectan a varias especies de mamíferos, entre las que se incluye el ser humano y el curso de estas enfermedades conduce invariablemente a la muerte del individuo (Prusiner, 1998). Pese a la amplia investigación que se ha llevado a cabo en relación a las EET, hoy en día no existen ni vacunas ni tratamientos específicos que permitan prevenir o tratar estas enfermedades, el diagnóstico se basa en estudios *post-mortem*, y aún se desconocen muchos aspectos de su patogenia.

Se han llevado a cabo numerosas investigaciones explorando distintas aproximaciones terapéuticas con el fin de encontrar un tratamiento para las EET. Debido a la compleja patogenia de éstas, una de las estrategias terapéuticas propuestas consiste en reducir la neurodegeneración a través de las vías celulares implicadas en ésta. Dos de los mecanismos más estudiados en relación a la patogenia y la neurodegeneración de las EET han sido la apoptosis y la autofagia. El papel de la apoptosis en la neurodegeneración asociada a priones aún no está claro. Se ha descrito en ratones infectados por scrapie (Giese & Kretzschmar, 2001; Kretzschmar *et al.*, 1997; Sisó *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 1997), y se ha detectado la activación de caspasas y algunas alteraciones en los genes relacionados con la apoptosis en los últimos estadios de las enfermedades priónicas humanas y animales (Hetz *et al.*, 2003; Lyahyai *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2009). Además, se ha sugerido que, en estas enfermedades, la apoptosis puede no ser especialmente relevante en el inicio y la progresión de la enfermedad, sino más bien un proceso tardío (Mays & Soto, 2016). La autofagia es uno de los sistemas de homeostasis proteica celular más importantes (Rubinsztein, 2006). Por ello, el deterioro de la autofagia se ha relacionado con diferentes patologías, incluidas las enfermedades neurodegenerativas (Larsen & Sulzer, 2002). El deterioro de la homeostasis proteica se ha señalado como una de las principales causas de la toxicidad asociada a los priones (Goold *et al.*, 2013), y se ha demostrado que la autofagia tiene un papel neuroprotector contra la toxicidad mediada por los priones (Aguzzi *et al.*, 2018; Forloni *et al.*, 2013; Goold *et al.*, 2015). A pesar de su función citoprotectora inicial, también se ha propuesto

que cuando la autofagia progresa sin control por encima de un determinado umbral, podría conducir a la regulación al alza de marcadores de muerte celular y a la activación de la apoptosis u otras modalidades de muerte celular (Kroemer & Jaattela, 2005; Mariño *et al.*, 2014).

El papel neuroprotector del fragmento C-terminal no tóxico de la toxina tetánica (TTC) se ha relacionado con la activación de vías antiapoptóticas y pro-supervivencia, y se ha demostrado *in vitro* (Chaib-Oukadour *et al.*, 2004; Gil *et al.*, 2000) e *in vivo* en modelos murinos de distintas enfermedades neurodegenerativas (Ciriza *et al.*, 2008; Moreno-Igoa *et al.*, 2009; Olivan *et al.*, 2016). Por ello, el primer estudio de esta tesis consiste en un ensayo clínico con el fragmento C-terminal no tóxico de la toxina tetánica (TTC) en modelos murinos enfermedad priónica. En este estudio, se observó que la administración de TTC reduce la apoptosis mediada por caspasa-3 en ratones infectados con scrapie. Los ratones tratados con TTC presentaron niveles significativamente menores de la forma activa de la caspasa-3 en el SNC, confirmando así que, al igual que en otras enfermedades neurodegenerativas, el TTC puede regular vías antiapoptóticas en las EET. Además, se observaron también diferencias en la regulación de los mecanismos autofágicos tras la administración de TTC. Se realizó un análisis de las proteínas LC3B, uno de los marcadores más utilizados para monitorizar la autofagia (Suzuki *et al.*, 2014), y p62, cuya acumulación revela una desregulación de los mecanismos autofágicos (Niklaus *et al.*, 2017; Tanida, 2011). Para complementar los estudios de expresión proteica, se evaluó la autofagia a nivel de expresión génica mediante el análisis de los marcadores *Becn1*, *Fbxw7*, *Gas5* y *Atg5* (López-Pérez *et al.*, 2020). Los animales tratados con TTC mostraron un aumento de LC3B, una disminución en la acumulación de p62 y una regulación al alza de los transcritos *Becn1*, *Fbxw7* y *Gas5* lo cual refleja una recuperación de la desregulación autofágica inducida por priones tras la administración de TTC. Por otro lado, la proteína NeuN, que refleja el estado funcional de las neuronas (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015) y, por tanto, se utiliza como marcador de la supervivencia neuronal, también se hallaba aumentada en los encéfalos de los animales tratados con TTC. Todos estos hallazgos indican que la administración de TTC en modelos murinos de enfermedad priónica es capaz de reducir la apoptosis y regular la autofagia, dando lugar a un aumento de la supervivencia neuronal.

Existen evidencias experimentales de que la inducción de la actividad autofágica mediante fármacos reduce los niveles de PrP^{Sc} (Heiseke *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2013), pero se ha observado que la administración de estos fármacos una vez que la neuroinvasión ya se ha producido no provoca una clara degradación de los depósitos de PrP^{Sc} en el SNC. Por lo tanto, es plausible que la regulación autofágica tras la inoculación intracerebral del prion no conduzca a una disminución del depósito de PrP^{Sc}. De acuerdo con esto, en nuestro ensayo observamos que, aunque el TTC afectó a la autofagia, no evitó la acumulación de PrP^{Sc}. Esto explica el hecho de que tanto los ratones tratados con TTC como los de control desarrollaron niveles similares de acúmulo de PrP^{Sc} y espongiosis, y como resultado sus períodos de supervivencia fueron similares. Sin embargo, dadas las características reguladoras de la autofagia que muestra el TTC en los modelos de enfermedades priónicas, sería conveniente realizar más investigaciones sobre los efectos del TTC tras la inoculación oral o intraperitoneal del prion para dilucidar los efectos de esta molécula sobre la autofagia en las EET. El hecho de que la supervivencia neuronal fuera mayor en el grupo tratado con TTC a pesar de que la espongiosis fuera similar en ambos grupos, podría estar relacionado con la reducción de la apoptosis observada en los ratones tratados. En resumen, aunque el TTC no ha afectó a la vacuolización ni a la acumulación de PrP^{Sc}, muestra propiedades neuroprotectoras en las EET a través de la regulación de los mecanismos de autofagia y la reducción de la apoptosis dependiente de caspasas, lo cual refuerza su papel molécula neuroprotectora.

Junto con la búsqueda de posibles terapias, otro de los retos a los que se enfrenta la investigación en EET es que, actualmente, estas enfermedades se diagnostican habitualmente en la fase sintomática (Hermann *et al.*, 2021). En esta etapa, el daño neuronal ya es masivo, por lo que el beneficio de los posibles tratamientos sería limitado. Por esto, es necesaria la búsqueda de biomarcadores que permitan detectar casos antes de que se inicie la clínica. El daño sináptico y axonal son hechos patogénicos tempranos en las enfermedades priónicas (Hilton *et al.*, 2013; Soto & Satani, 2011), por lo que los biomarcadores que reflejan una disfunción temprana a estos niveles, como la neurogranina (Ng) o el neurofilamento de cadena ligera (NfL) podrían ser valiosos para realizar un diagnóstico precoz. En el segundo estudio de esta tesis, se ha visto que Ng y NfL podrían actuar como biomarcadores en casos preclínicos de enfermedad priónica.

Tras evaluar el nivel de expresión proteica y génica de Ng y NfL en el encéfalo ovejas infectadas con scrapie en fase preclínica y clínica en comparación con controles sanos no infectados, observamos una reducción significativa de ambos marcadores conforme la enfermedad progresaba. Además, las diferencias en los niveles de expresión fueron detectables ya en fases preclínicas de enfermedad.

Por otro lado, los resultados de los análisis de correlación entre las características neuropatológicas relacionadas con el scrapie y las proteínas Ng y NfL mostraron que existe una relación directa entre la cantidad presente de las proteínas estudiadas en los cerebros y la neurodegeneración asociada al prión. El tálamo y el obex, que son, dos de las áreas cerebrales más temprana y gravemente afectadas por los priones (Baldauf *et al.*, 1997), mostraron una fuerte correlación negativa significativa entre los marcadores histopatológicos y la expresión de Ng y NfL, lo que indica que los fenómenos neuropatológicos que se producen en las enfermedades priónicas influyen directamente en la cantidad de estas proteínas en el tejido cerebral. Pese a que esta correlación negativa entre Ng y NfL y la patología priónica detectada por inmunohistoquímica podría deberse, en parte, a la pérdida neuronal característica de las EET (Prusiner, 1998), los resultados de la qPCR también mostraron disminuciones en la expresión de Ng y NfL en las ovejas preclínicas y clínicas. En cuanto a las pruebas de LCR, aunque no se observaron diferencias estadísticas, los valores medios de NfL en LCR fueron mayores en las ovejas preclínicas en comparación con los controles, en concordancia con resultados anteriores encontrados para las proteínas 14-3-3 y tau (Llorens *et al.*, 2018). Lamentablemente, no se pudieron realizar mediciones de Ng en el LCR. Sin embargo, los resultados del estudio de la expresión de Ng en el tejido cerebral sugieren que esta proteína podría ser una herramienta útil en la identificación de casos preclínicos de enfermedad priónica. Se ha observado que Ng está aumentada en el LCR de casos clínicos humanos de Alzheimer (EA) y de Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (sCJD), siendo este aumento mayor en sCJD en comparación con EA (Blennow *et al.*, 2019). Así, los resultados de este estudio y de estudios anteriores abren un valioso camino en la investigación para el desarrollo de pruebas capaces de medir Ng en LCR ovino para evaluar su valor como biomarcador preclínico. Aunque Ng y NfL son marcadores inespecíficos de neurodegeneración y otras enfermedades neurodegenerativas también podrían afectar

sus niveles en encéfalo y LCR, estos podrían utilizarse en combinación con otros biomarcadores, como 14-3-3 o tau, que también se encuentran elevados en el LCR en casos preclínicos de scrapie (Llorens *et al.*, 2018).

Este estudio, al igual que otros que evalúan biomarcadores preclínicos la enfermedad priónica (Llorens *et al.*, 2018), se ha realizado en el scrapie. Sin embargo, estos resultados podrían extrapolarse a las enfermedades priónicas humanas. La identificación de marcadores biopatológicos que permitan detectar los casos de enfermedad priónica en las fases asintomáticas, en las que el daño neuronal aún no es masivo, es necesaria para aumentar la eficacia de los posibles tratamientos cuando éstos estén disponibles. Por un lado, las diferencias significativas en la expresión de Ng y NfL entre el grupo preclínico y el control encontradas en este trabajo, concuerdan con la afirmación de que el daño axonal es un evento temprano en las enfermedades priónicas (Luberski, 2019) y apoyan de nuevo que los mecanismos neurodegenerativos subyacentes de las enfermedades priónicas también pueden ocurrir en las etapas asintomáticas de la enfermedad. Por otro lado, los resultados hallados en este estudio corroboran que la concentración de los marcadores de daño sináptico y axonal, Ng y NfL, en el tejido cerebral se ve afectada por la acumulación de priones, y que esta condición es apreciable incluso en estadios preclínicos de la neurodegeneración asociada a priones. Por lo tanto, aunque es necesario seguir investigando, los resultados obtenidos apoyan firmemente la utilidad de Ng y NfL como biomarcadores preclínicos de las enfermedades priónicas.

Otro de los aspectos controvertidos de las EET y en el que se centran actualmente muchas investigaciones es la existencia de cepas priónicas. Pese a estar compuestos únicamente de proteína, la estructura terciaria y cuaternaria de los priones puede variar, dando lugar a la existencia de distintas cepas. Estas cepas difieren, entre otras características, en su capacidad de transmitirse y provocar enfermedad en las distintas especies animales. Cómo aparecen y evolucionan las cepas priónicas está aún en debate. Tras la formulación del modelo de "selección conformacional" (Collinge & Clarke, 2007) y basándose en sus postulados, se ha propuesto que los aislados naturales de priones pueden estar compuestos por mezclas de diferentes cepas en las que una de ellas predomina y determina el fenotipo de la enfermedad. Sin embargo, esta hipótesis no

explica el origen de la variabilidad conformacional de los priones, ya que supone que estas conformaciones aparecerían de forma espontánea. En contraposición, otros autores (Makarava & Baskakov, 2013) defienden la hipótesis del "modelado deformado". Según esta hipótesis, si los confórmeros del aislado infeccioso no son capaces de replicarse en el huésped, se produce una distorsión de la fibra amiloide que conduce a la aparición de variantes *de novo*. A través de la generación de nuevas variantes, acabaría surgiendo un prion capaz de replicarse. Para ahondar en el conocimiento de estos aspectos, en el estudio 3 de esta tesis se evalúa la presencia y la dinámica de las cepas asociadas a un patrón de 21kDa en aislados de scrapie y su evolución durante su transmisión seriada en un bioensayo en ratones que expresan PrP^C ovina mediante *Protein Misfolding Cyclic Amplification* (PMCA).

Anteriormente, otros autores habían amplificado específicamente mediante PMCA distintas cepas priónicas (Atarashi *et al.*, 2007; Gonzalez-Romero *et al.*, 2008; Thorne *et al.*, 2012). En este estudio demostramos que la PMCA puede utilizarse en condiciones en las que el componente de 19kDa del scrapie no se amplifica, mientras que los componentes de 21kDa se amplifican hasta una dilución de 10^{-8} . Además, los resultados del análisis de los tres homogeneizados naturales de scrapie ovino utilizados como inóculos en el bioensayo muestran uno de ellos está compuesto por una mezcla de ambos confórmeros, y que éstos pueden ser detectados *in vitro* utilizando la PMCA. En los inóculos PS09 y PS48, que mostraban originalmente firmas de 19kDa, se detectaron subcomponentes de 21kDa amplificándolo hasta una dilución de 10^{-6} . En el caso del inóculo PS09, que provenía de una oveja con genotipo ARQ/ARQ y por tanto no fue sometido a una "barrera de transmisión", esto demuestra que el inóculo contenía una cantidad notable de subcomponentes de 21kDa. Los resultados del inóculo PS48 también podrían encajar en esta teoría. Sin embargo, dado que este inóculo se obtuvo de una oveja VRQ/VRQ, el componente de 21kDa detectado en el PMCA podría haber surgido por mutación de los priones de 19kDa en el inóculo al propagarse en un sustrato ARQ y, por tanto, en presencia de una barrera de transmisión.

En este estudio también se observa una amplificación diferencial de las cepas de scrapie en función del tejido. Este fenómeno ya se había descrito en bioensayos realizados en investigaciones anteriores (Beringue *et al.*, 2012) y algunos autores lo han

atribuido a diferencias en la glicosilación de la PrP^C (Katorcha *et al.*, 2014) o a al diferente nivel de expresión de ésta en los distintos tejidos (Le Dur *et al.*, 2017). A pesar de que los mecanismos a través de los cuales cada tejido propaga selectivamente distintos subcomponentes aún no están claros, los resultados obtenidos muestran que, además del bioensayo, la PMCA también es capaz de detectar esta amplificación diferencial.

En conjunto, los resultados de este estudio apoyan la utilidad de la PMCA como método alternativo al bioensayo para la evaluación de la coexistencia de diferentes subcomponentes en los aislados de scrapie ovino, y lo que es más importante, concuerdan con los resultados de otros estudios que apuntan a que en los aislados de scrapie natural coexisten y se copropagan mezclas de componentes priónicos (Barrio *et al.*, 2020; Marin-Moreno *et al.*, 2021; Thackray *et al.*, 2012). Si observamos los resultados del bioensayo incluido en este estudio, podríamos decir que, tras varios pases en Tg338 de aislados ovinos de 19kDa, se produce una aparición *de novo* de ciertos componentes de 21kDa. Sin embargo, tras los resultados obtenidos mediante PMCA, concretamente en el inóculo PS09, vemos que estos componentes ya estaban presentes en el aislado original que se inoculó, y que no ha habido una aparición *de novo*, sino una selección y/o amplificación de los mismos. Aunque parte los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los postulados de la teoría de la selección conformacional, la teoría del modelado deformado podría ofrecer una explicación a la heterogeneidad de las cepas priónicas, algo que el modelo de selección conformacional no puede aportar. Estas dos hipótesis no son mutuamente excluyentes, y la combinación de ambas permite explicar muchos de los fenómenos de divergencia de cepas que se han observado tanto en enfermedades priónicas naturales como en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* (Baskakov, 2014), por lo que sería lógico creer que ambas ocurren simultáneamente en la naturaleza.

Aunque el potencial zoonótico del scrapie sigue siendo objeto de estudio, algunos aislados se han transmitido con éxito a ratones transgénicos humanizados reproduciendo características similares a las de la sCJD en humanos y la EEB clásica en el ganado (Cassard *et al.*, 2014; Houston & Andreoletti, 2018; Huor *et al.*, 2019). Como se descrito, los resultados obtenidos en este estudio apoyan la idea de que los casos naturales de scrapie pueden ser causados por una mezcla de cepas, y sus propiedades,

entre ellas su capacidad de transmisión, estarían directamente relacionadas con las cepas que contienen. Por lo tanto, los resultados de este estudio apoyan la necesidad de una evaluación y caracterización exhaustiva de las cepas circulantes en los aislados de scrapie, no sólo para determinar su potencial zoonótico, sino también para el control y la erradicación de esta enfermedad.

Como se ha comentado previamente, todavía hay muchas características de las enfermedades priónicas, como el fenómeno de cepas, la transmisión interespecie, la neurotoxicidad o los mecanismos moleculares de mal plegamiento, que siguen siendo desconocidas. Al ser los priones patógenos exclusivamente proteicos, estas características vendrían dadas por su estructura, pero es precisamente su naturaleza proteica la que ha dificultado enormemente su estudio. Desde la primera descripción de una técnica para generar grandes cantidades de PrP recombinante (rec-PrP) (Hornemann *et al.*, 1997), se han generado multitud de priones recombinantes *in vitro* (Bocharova *et al.*, 2005; Colby *et al.*, 2010; Deleault *et al.*, 2007; Legname *et al.*, 2004; Legname *et al.*, 2005; Makarava *et al.*, 2010). Sin embargo, y a pese a que se han generado múltiples priones recombinantes infecciosos (Fernández-Borges *et al.*, 2017; Westaway *et al.*, 2017) muchas rec-PrP mal plegadas generadas *in vitro* son poco infecciosas *in vivo* y/o difieren en las características neuropatológicas de los priones “derivados de encéfalo” (Legname *et al.*, 2004), lo cual limita su uso como buenos modelos experimentales de priones.

La generación de priones recombinantes que posean las características de los priones naturales causantes de las EET es de crucial importancia, ya que los conocimientos obtenidos a partir de los estudios con priones recombinantes podrían ayudar a comprender no sólo los aspectos desconocidos de la patogenia de las EET, sino también el papel de las proteínas mal plegadas en otras enfermedades neurodegenerativas, como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson o Huntington. Resultados previos (no publicados) habían mostrado que la proteína recombinante del *bank vole* tiene la capacidad de malplegarse de distintas maneras adquiriendo propiedades bioquímicas y biológicas diferentes, y también de sostener la propagación de cepas priónicas naturales conocidas. Sin embargo, desconocíamos la proximidad fenotípica de las PrP recombinantes malplegadas resultantes con sus homólogos

naturales. Por todo esto, el estudio 4 de esta tesis tenía como objetivo evaluar comparativamente las características de distintas cepas de priones naturales y sus homólogos recombinantes tras su bioensayo en el modelo TgVole (que expresa la PrP^C 109I del *bank vole*), para determinar cómo varían sus características neuropatológicas tras propagarse *in vitro* sobre una proteína recombinante y posteriormente *in vivo*.

Tras la inoculación en TgVole de las cepas naturales de scrapie 22L, RML, 263K y ME7 (Bruce, 1993; Chandler, 1963; Kimberlin & Walker, 1986; Zlotnik & Rennie, 1963), así como de sus homólogos recombinantes, todas fueron capaces de producir enfermedad en los animales. El *bank vole* (*Myodes glareolus*) y los ratones transgénicos que expresan su PrP^C se han planteado como modelos importantes para la investigación de las EET. Se ha demostrado que estos animales son susceptibles a una gran variedad de cepas de priones de distintas especies donantes (Agrimi *et al.*, 2008; Mabbott *et al.*, 2014; Pirisinu *et al.*, 2016) y por eso están considerados como el “aceptor universal de priones”. Los resultados de este estudio muestran una gran facilidad de todas las cepas de scrapie utilizadas, naturales y recombinantes, para propagarse y provocar enfermedad en el modelo TgVole. Con esto se corrobora que la unión de modelos de roedores de *bank vole* y priones recombinantes, que son ampliamente versátiles y fáciles de usar, puede resultar una herramienta valiosa para ayudar a superar las dificultades encontradas en el estudio de las enfermedades priónicas.

De entre las cepas recombinantes inoculadas, la cepa 22L-PMSA-2 y la RML-PMSA-1, obtenidas tras la replicación *in vitro* de las cepas naturales 22L y RML respectivamente, mostraron una gran similitud con sus homólogos naturales en cuanto a las características neuropatológicas asociadas a las EET. Las cepas 22L y 22L-PMSA-2 mostraron ambas un patrón de acúmulo de PrP^{Sc} con depósitos difusos de punteado fino. Los perfiles lesionales de ambas fueron iguales, mostrando picos tanto de acúmulo de PrP^{Sc} como de espongirosis en puente, tálamo, área septal y cuerpo estriado. En cuanto a las cepas RML y RML-PMSA-1, la neuropatología consistió en un patrón panencefálico de espongirosis y depósitos de PrP^{Sc} de punteado fino, con picos en puente y corteza frontal. Por otro lado, el resto de las cepas recombinantes estudiadas (22L-PMSA-1, RML-PMSA-2, 263K-PMSA y ME7-PMSA-2), no mostraron similitud con las cepas naturales de las que provenían. A partir de estos resultados observamos que,

efectivamente, tras la generación de priones recombinantes éstos pueden fácilmente diferir de en las características neuropatológicas de aquellos “naturales” de los que provienen. Estas diferencias en los resultados de la similitud entre cepas tras su replicación *in vitro* se pueden asociar con eventos estocásticos que produzcan la generación de distintas estructuras terciarias o cuaternarias (Wang *et al.*, 2010) o a la dificultad de las cepas recombinantes, que carecen de modificaciones postraduccionales como las glucosilaciones y el anclaje GPI, para adaptarse al entorno proporcionado por el huésped *in vivo*. Otra posible explicación sería que las condiciones utilizadas en este estudio no fueran las idóneas para cepas como la 263K o la ME7, ya que se ha demostrado que (Fernández-Borges *et al.*, 2017). Aunque los resultados obtenidos aún deben ser ampliados con el análisis bioquímico de las cepas recombinantes, en este estudio se demuestra a partir de las cepas de scrapie 22L y RML se pueden obtener priones que mantengan sus propiedades tras su propagación en proteína recombinante, lo cual haría de ellos un buen modelo recombinante a utilizar en estudios posteriores que permitan dilucidar los aspectos todavía desconocidos de las encefalopatías espongiiformes transmisibles.

Desde el inicio del estudio de las EET se han hecho numerosos y valiosos avances que han permitido conocer mejor muchos aspectos de estas enfermedades. Sin embargo, la investigación en las enfermedades priónicas se enfrenta todavía a grandes retos. Existen numerosos factores no conocidos de estas enfermedades en relación a los mecanismos implicados en su patogenia; a la aparición, evolución y transmisión de las cepas priónicas o a posibles diagnósticos y tratamientos eficaces. En su conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis aumentan el conocimiento y abren nuevas vías de investigación en estos aspectos, profundizando en el estudio de distintos factores tanto de la patogenia de las enfermedades priónicas como de los priones como agentes patógenos. Comprender estos factores es vital, ya que ofrecerá herramientas que permitan elaborar estrategias destinadas a proteger la sanidad animal y humana en lo que se refiere a las enfermedades priónicas.

Conclusiones/Conclusions

1. Pese a no afectar a la neuropatología asociada a las enfermedades priónicas, la inyección de del fragmento C-terminal no tóxico de la toxina tetánica muestra efectos neuroprotectores que se reflejan en un incremento de la supervivencia neuronal.
2. La administración del fragmento C-terminal no tóxico de la toxina tetánica reduce la apoptosis mediada por caspasas y regula los mecanismos autofágicos en modelos murinos infectados con scrapie.
3. La modulación de los mecanismos autofágicos derivada de la administración del fragmento C-terminal no tóxico de la toxina tetánica no evita la acumulación de PrP^{Sc}, por lo que la regulación autofágica después de la inoculación intracerebral de priones no conduce a una disminución en el depósito de PrP^{Sc}.
4. La concentración de neurogranina y neurofilamento de cadena ligera en el sistema nervioso central se ve afectada por la acumulación de priones incluso en etapas preclínicas de la enfermedad, y en el caso del neurofilamento de cadena ligera esto se correlaciona con una mayor concentración en LCR, lo cual respalda su utilidad como biomarcadores preclínicos de enfermedad priónica.
5. Las diferencias en la expresión de neurogranina y neurofilamento de cadena ligera entre el grupo preclínico y el control confirman que el daño dendrítico y axonal son eventos tempranos en las enfermedades priónicas y que los mecanismos neurodegenerativos subyacentes pueden ocurrir en etapas asintomáticas de la enfermedad.
6. La técnica de *Protein Misfolding Cyclic Amplification* puede utilizarse en condiciones en las que no se amplifiquen componentes de 19kDa del scrapie, mientras que los componentes de 21kDa se amplifican hasta diluciones de 10^{-7} - 10^{-8} .
7. El aislado ovino estudiado PS09 mostró una mezcla de cepas de scrapie de 19kDa y 21kDa, confirmando que los casos naturales de scrapie pueden estar causados por una mezcla de cepas que se propagan conjuntamente.
8. Bajo estas mismas condiciones, la *Protein Misfolding Cyclic Amplification* se puede utilizar para detectar la selección diferencial dependiente del tejido que ocurre en los bioensayos.
9. Las cepas recombinantes 22L-PMSA-2 y RML-PMSA-1 caracterizadas en esta tesis muestran patrones de espongirosis y depósito de PrP^{Sc} iguales a sus homólogas mamíferas, lo cual las convierte en un buen modelo a utilizar en estudios posteriores sobre enfermedades priónicas.
10. Las cepas derivadas de mamífero de scrapie 22L, RML, 263K y ME7, así como sus homólogas recombinantes son capaces de producir enfermedad en modelo TgVole, corroborando su utilidad como modelo de estudio para las enfermedades priónicas.

1. Despite not affecting prion associated, the administration of the non-toxic C-terminal fragment of the tetanus toxin shows neuroprotective effects that reflect in an increase in neuronal survival.
2. Administration of the non-toxic C-terminal fragment of the tetanus toxin reduces caspase-mediated apoptosis and regulates autophagic mechanisms in scrapie mouse models.
3. Modulation of autophagic mechanisms derived from the non-toxic C-terminal fragment of the tetanus toxin administration does not prevent PrP^{Sc} accumulation, and therefore autophagic regulation after intracerebral prion inoculation might not prevent PrP^{Sc} deposition.
4. The concentration of neurogranin and neurofilament light chain in the central nervous system is affected by the accumulation of prions even in preclinical stages of the disease, and in the case of neurofilament light chain this correlates with a higher concentration in CSF, which supports their usefulness as preclinical biomarkers of prion disease.
5. Differences in neurogranin and neurofilament light chain expression between preclinical and control groups confirm that dendritic and axonal damage are early events in prion diseases and that the underlying neurodegenerative mechanisms of prion diseases can occur in asymptomatic stages of the disease.
6. Protein Misfolding Cyclic Amplification can be used under conditions where the 19kDa components of scrapie are not amplified, while the 21kDa components are amplified up to 10⁻⁷-10⁻⁸ dilutions.
7. The PS09 ovine isolate studied showed a mixture of 19kDa and 21kDa scrapie strains, confirming that natural cases of scrapie may be caused by a mixture of co-propagating strains.
8. Under these same conditions, Protein Misfolding Cyclic Amplification can be used to detect the tissue-dependent differential selection that occurs in bioassays.
9. The recombinant strains 22L-PMSA-2 and RML-PMSA-1 characterized in this study show the same patterns of spongiosis and PrP^{Sc} deposition that their natural counterparts, which makes them a good model to use in further studies on prion diseases.
10. The natural strains of scrapie 22L, RML, 263K and ME7, as well as their recombinant counterparts, are capable of producing disease in the TgVole model, corroborating its usefulness as a study model for TSEs.

Resumen/Abstract

Las enfermedades priónicas son trastornos neurodegenerativos mortales que no se pueden prevenir o tratar, por lo que actualmente muchas de las investigaciones en torno a estas enfermedades se centran en el desarrollo de tratamientos específicos. Se considera que parte de la muerte neuronal que ocurre en las enfermedades priónicas se debe a la activación de la apoptosis y la alteración de la homeostasis de mecanismos autofágicos. El fragmento C-terminal no tóxico de la toxina tetánica (TTC) se ha descrito como una molécula neuroprotectora que se une a los receptores Trk desencadenando vías de supervivencia neuronal, inhibiendo la apoptosis y regulando la autofagia. Debido a esto, en el **estudio número 1** de esta tesis, se presenta un estudio piloto para probar el potencial terapéutico del TTC en las enfermedades priónicas. Ratones *wild type* de la línea C57BL6 y ratones transgénicos Tg338, que sobreexpresan la PrP^C ovina, se inocularon intracerebralmente con el agente priónico del scrapie y luego fueron tratados mediante la inyección intramuscular de TTC. Los resultados de este estudio muestran, en el grupo tratado de ambos modelos murinos, una disminución de las proteínas caspasa-3 y p62 y un aumento de LC3B y NeuN a nivel encefálico. Además, los ratones *wild type* tratados mostraron diferencias en la regulación de la expresión génica de *Atg5*, *Becn1* y *Fbxw7*. Así, se observa que la inyección de TTC generó efectos neuroprotectores en ambos modelos murinos de enfermedad priónica a través de la reducción de la apoptosis y de la regulación de la autofagia, lo que resultó en un aumento de la supervivencia neuronal, pese a no aumentar el tiempo de supervivencia. Estos hallazgos refuerzan el papel del TTC como regulador de la apoptosis y la autofagia en enfermedades neurodegenerativas y, lo que es más importante, como molécula neuroprotectora.

Otro de los principales focos de las investigaciones actuales en enfermedades priónicas está en la búsqueda de biomarcadores que permitan detectar la enfermedad en fases preclínicas. La neurogranina (Ng) y la cadena ligera del neurofilamento (NfL) son proteínas que reflejan el daño sináptico y axonal y se postulan como buenos biomarcadores para trastornos neurodegenerativos. En el **estudio número 2**, se evalúan Ng y NfL, como posibles biomarcadores preclínicos en la enfermedad de scrapie. Para esto, se estudia tanto su concentración proteica como su nivel de expresión génica en el SNC de ovejas afectadas por scrapie en estadios preclínico y clínico, en comparación

con controles sanos. Además, se evalúan también sus niveles en LCR y su correlación con los principales eventos neuropatológicos en las enfermedades priónicas, el depósito de PrP^{Sc} y la espongiosis. Los resultados muestran una disminución en los niveles de expresión proteica y génica de Ng y NfL a medida que avanza la enfermedad, y cambios significativos entre los animales del grupo control y preclínico. Por el contrario, los niveles de LCR de NfL aumentaron a lo largo de la progresión de la enfermedad. Además, se encontró una correlación negativa entre los marcadores neuropatológicos de enfermedad priónica y la concentración de las proteínas estudiadas. Así, en este estudio se corrobora que la concentración en el tejido nervioso de Ng y NfL, marcadores de daño sináptico y axonal, se ve afectada por la acumulación de priones, y que esta condición es detectable incluso en etapas preclínicas enfermedad priónica. Por lo tanto, los resultados obtenidos respaldan la utilidad de ambas proteínas como biomarcadores preclínicos para enfermedades priónicas.

Los priones son patógenos exclusivamente proteicos cuya estructura terciaria y cuaternaria puede diferir, dando lugar a la aparición de diferentes cepas, que se manifiestan a través de variabilidad fenotípica. Además, la capacidad de transmisión de los priones a las diferentes especies está íntimamente ligada con sus características de cepa. Ampliar el conocimiento y la caracterización de las cepas priónicas es crucial para evaluar el potencial de los priones para infectar distintas especies, y para el control y la erradicación de las enfermedades priónicas. En el scrapie, se ha visto que varias cepas pueden propagarse a partir de un mismo aislado, por lo que se considera que, en ciertos casos, distintas cepas coexisten en el aislado original. Por esto, en el **estudio número 3**, se evalúa, mediante la técnica de *Protein Misfolding Cyclic Amplification* (PMCA), la presencia de cepas de scrapie asociadas a un perfil de 21kDa en aislados de origen ovino y su evolución durante su transmisión seriada en un bioensayo en ratones que expresan la PrP^C ovina. Para esto, se utilizó la PMCA en diferentes condiciones para evaluar la cantidad y proporción de subcomponentes contenidos en distintas muestras del bioensayo. Los resultados muestran que la PMCA se puede utilizar en determinadas condiciones en las que el fenotipo de 19kDa, asociado a una cepa de scrapie, no es amplificable. Bajo estas mismas condiciones, la PMCA es capaz de amplificar el subcomponente de 21kDa del scrapie, asociado a varias cepas distintas de esta

enfermedad. A partir del método de PMCA establecido en este estudio, además, se detecta el componente de 21kDa en aislados de scrapie ovino que mostraban en un inicio un perfil de glicosilación de 19kDa. Por tanto, los resultados demuestran, por un lado, que la PMCA se puede utilizar para detectar cepas de 21kDa en homogeneizados que muestran una firma de 19kDa, y también que es capaz de detectar la selección diferencial dependiente del tejido que ocurre en los bioensayos. Por otro lado, y de forma más importante, los resultados sugieren que algunos aislados naturales de scrapie ovino utilizados en el estudio contenían mezclas de cepas y que la coinfección con varias cepas podría ocurrir de forma frecuente en la naturaleza.

La generación *in vitro* de priones recombinantes infecciosos fue un gran logro en la investigación de las enfermedades priónicas ya que permite la producción de PrP recombinante de alta pureza para su uso en futuras investigaciones. Sin embargo, estos priones recombinantes pueden existir y propagarse en muchas conformaciones que pueden diferir en su patogenicidad y ser desde absolutamente inocuas hasta letales, lo que limita su uso como buenos modelos de priones. La generación de priones recombinantes que retengan las características de los priones de mamífero es de crucial importancia, ya que el conocimiento obtenido de los estudios con priones recombinantes podría ayudar a comprender los aspectos desconocidos de la patogénesis de las enfermedades priónicas. En el **estudio número 4** de esta tesis, se analizan comparativamente las características de distintas cepas priónicas naturales y de sus homólogas recombinantes tras su bioensayo en el modelo TgVole, con el fin de determinar cómo varían sus propiedades biológicas tras propagarse *in vitro* sobre una proteína recombinante y posteriormente *in vivo*. Tras la inoculación de las cepas de mamífero de scrapie 22L, RML, 263K y ME7, así como de cepas recombinantes homólogas de éstas en el modelo transgénico TgVole, que expresa la PrP^C 109I del *bank vole*, todas fueron capaces de producir enfermedad en los animales. Además, las cepas recombinantes 22L-PMSA-2 y RML-PMSA-1, obtenidas tras la replicación *in vitro* de las cepas naturales 22L y RML respectivamente, mostraron una gran similitud con sus homólogas naturales en las características neuropatológicas asociadas a la infección por priones (espongiosis y depósito de PrP^{Sc}). Aunque este estudio se completará en el futuro con el análisis de las propiedades bioquímicas de estas cepas, los resultados

obtenidos implican que estas dos cepas de scrapie mantienen sus propiedades neuropatológicas tras su propagación en proteína recombinante, y que por lo tanto podrían ser buenos modelos para posteriores estudios.

Los cuatro estudios desarrollados en esta tesis han cumplido los objetivos de la misma, ampliando el conocimiento actual tanto sobre la patogenia, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades priónicas como de los priones como agentes patógenos.

Prion diseases are fatal neurodegenerative disorders that cannot be prevented or treated, and therefore research on these diseases is currently focused on the development of specific treatments. It is considered that part of the neuronal death that occurs in prion diseases is due to the activation of apoptosis and the alteration of the homeostasis of autophagic mechanisms. The non-toxic C-terminal fragment of tetanus toxin (TTC) has been described as a neuroprotective molecule that binds to Trk receptors, triggering neuronal survival pathways, inhibiting apoptosis, and regulating autophagy. Due to this, in **study number 1** of this thesis, a clinical trial is presented to test the therapeutic potential of TTC in prion diseases. Wild type mice of the C57BL6 line and Tg338 transgenic mice, which overexpress ovine PrP^C, were intracerebrally inoculated with scrapie and then treated by intramuscular injection of TTC. After injection, the treated group of both murine lines showed a decrease in caspase-3 and p62 proteins and an increase in LC3B and NeuN in their brains. In addition, the treated wild type mice showed differences in the regulation of *Atg5*, *Becn1* and *Fbxw7* at the gene level. Thus, results show that injection of TTC generated neuroprotective effects in both murine models of prion disease through the reduction of apoptosis and the regulation of autophagy, which resulted in an increase in neuronal survival, despite not increasing the animal's survival time. These findings reinforce the role of TTC as an apoptosis and autophagy regulator in neurodegenerative diseases and, more importantly, as a neuroprotective molecule.

Another of the main focuses of current research on prion diseases is the finding of biomarkers that allow the detection of the disease in preclinical stages. Neurogranin (Ng) and neurofilament light chain (NfL) are proteins that reflect synaptic and axonal damage and have been postulated as good biomarkers for neurodegenerative disorders. In **study number 2**, Ng and NfL are evaluated as preclinical biomarkers in scrapie disease. For this purpose, Ng and NfL are evaluated both at the protein and transcript levels in the CNS of preclinical and clinical scrapie-affected sheep compared with healthy controls. In addition, its levels in CSF and its correlation with the main neuropathological events in prion diseases, PrP^{Sc} deposition and spongiosis, are also evaluated. Results show a decrease in the protein and gene expression levels of Ng and NfL as the disease progresses, and significant changes between the animals of the control and preclinical

groups. In contrast, CSF levels of NfL increased throughout the disease progression. In addition, a negative correlation was found between the neuropathological markers of prion disease and the concentration of the proteins studied. Thus, this study confirms that the concentration of Ng and NfL, markers of synaptic and axonal damage, in nervous tissue, is affected by the accumulation of prions, and that this condition is noticeable even in preclinical stages of prion disease. Therefore, the results obtained support the utility of both proteins as preclinical biomarkers for prion diseases.

Prions are proteinaceous pathogens whose tertiary and quaternary structures can differ, giving rise to different strains, which are manifested through phenotypic variability. The transmission capacity of prions to different species is closely related to their strain characteristics. Increasing the knowledge and characterization of prion strains is crucial for the evaluation of the potential of prions to infect different species, and for the control and eradication of prion diseases. In scrapie, it has been seen that a single isolate might contain several, so it is considered that in certain cases different strains coexist and copropagate from a single isolate. For this reason, **study number 3** evaluates, using the Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) technique, the presence of scrapie strains associated with a 21kDa profile in isolates of ovine origin and their evolution during their serial transmission in a bioassay in mice expressing ovine PrP^C. For this, the PMCA was used under different conditions to evaluate the amount and proportion of subcomponents contained in different samples from the bioassay. Results show that PMCA can be used under certain conditions in which the 19kDa phenotype, associated with a scrapie strain, is not amplifiable. Under these same conditions, PMCA was capable of amplifying the 21kDa subcomponent of scrapie, associated with several different strains of this disease. Using the PMCA method established in this study, the 21kDa component was also detected in ovine scrapie isolates that initially showed a 19kDa glycosylation profile. Therefore, these results demonstrate, on the one hand, that PMCA can be used to detect 21kDa strains in homogenates that show a 19kDa signature and also that it is capable of detecting the tissue-dependent differential selection that occurs in bioassays. On the other hand, and more importantly, the results suggest that the natural ovine scrapie isolates used in the

study contained mixtures of strains and that co-infection with various strains may occur frequently in nature.

The *in vitro* generation of infectious recombinant prions was a major achievement in prion disease research as it allows and facilitates the production of high quantities of recombinant PrP for its use in future research. However, these recombinant prions can exist and propagate in many conformations that can differ in their pathogenicity being from absolutely harmless to lethal, limiting their use as good prion models. The generation of recombinant prions that retain the characteristics of natural prions is of crucial importance, since the knowledge obtained from studies with recombinant prions could help understand the unknown aspects of the pathogenesis of prion diseases. In **study number 4** of this thesis, the characteristics of different natural prion strains and their recombinant homologues are comparatively analyzed after their bioassay in the TgVole model, in order to determine which ones can be propagated efficiently *in vitro* on a recombinant protein and subsequently *in vivo* maintaining its biological properties. After the inoculation of the natural strains of scrapie 22L, RML, 263K and ME7, and of their recombinant counterparts in the TgVole transgenic model, which expresses the 109I PrP^C of the bank vole, all of them were capable of producing disease. In addition, the recombinant strains 22L-PMSA-2 and RML-PMSA-1, obtained after the *in vitro* replication of the natural strains 22L and RML, respectively, showed great similarity with their natural homologues in the prion-associated neuropathological features (spongiosis and PrP^{Sc} deposition). Although this study will be completed in the future with the analysis of the biochemical properties of these strains, the results obtained imply that these two scrapie strains maintain their neuropathological properties after propagation in recombinant protein, and could therefore be good models for further studies.

The four studies developed in this thesis have fulfilled its objectives, expanding the current knowledge on both the pathogenesis of prion diseases and on prions as pathogens.

Anexos

Anexo 1. Protocolo de tinción con Hematoxilina-Eosina

- Desparafinado. Inmersión de los tejidos en los siguientes reactivos:
 1. Xilol: 4´
 2. Xilol: 4´
 3. Alcohol 100°: 4´
 4. Alcohol 100°: 4´
 5. Alcohol 96°: 1´
 6. Alcohol 70°: 1´
 7. Agua corriente: 1´
- Tinción. Inmersión de los tejidos en los siguientes reactivos:
 1. Hematoxilina: 5´
 2. Agua corriente: 1´
 3. Alcohol ácido: 2´
 4. Eosina: 2´
 5. Agua: 3 inmersiones de 1-2´´
- Deshidratación y montaje:
 1. Alcohol 100°: 1´
 2. Alcohol 100°: 1´
 3. Xilol: 1´
 4. Xilol: 5´ (mínimo)
 5. Montaje de la muestra en Dibutyl phthalate Poliestireno Xileno (DPX)

Anexo 2. Técnica de inmunohistoquímica para la detección de PrP^{Sc}

Cortar las secciones (4 µm) y recogerlas sobre portaobjetos tratados (Starfrost). Secar las secciones toda la noche a 56°C.

- Desparafinado:
 1. Xilol: 5´
 2. Xilol: 5´
 3. Alcohol 100°: 5´
 4. Alcohol 100°: 5´
 5. Alcohol 96°: 3´
 6. Alcohol 70°: 3´
- Pasar las preparaciones a agua destilada (H₂O_d) durante 10´.
- Desenmascarado de epítomos:
 1. Inmersión de las secciones en ácido fórmico (98%) 10´
 2. Lavar 10´ en agua corriente

3. Digestión con proteinasa K (PK): 4g/ml, 15' a 37°C ml de tampón precalentado
4. Autoclavado hidratado con tampón citrato Tris EDTA: 10' a 96°C

- Inmunodetección:

1. Cubrir las muestras con solución de peroxidasa (kit Envision-DAB, Dako) durante 5' para bloquear la peroxidasa endógena
2. Incubar las muestras con el anticuerpo primario anti-PrP durante 30' a RT (L42, 1:500 para PrP^{Sc} ovina; 6C2, 1:1000 para PrP^{Sc} en TgVole)
3. Lavar con Wash buffer (Tween 20 al 0.1 % en H₂O) 5' x 3 veces
4. Incubar con el polímero marcado Envision goat anti-mouse (kit Envision DAB, Dako) durante 30'
5. Lavar con Wash buffer 5' x 3 veces
6. Incubar con el cromógeno DAB plus (kit Envision DAB, Dako) 5'
7. Lavar con H₂O 5' x 3 veces
8. Contrateñir las muestras con hematoxilina durante 1'
9. Lavar con H₂O

- Deshidratación y montaje:

1. Alcohol 70°: inmersión (x 3), Alcohol 96°: inmersión (x 3), Alcohol 100°: inmersión (x3), Alcohol 100°: inmersión (x 3), Xilol: inmersión (x 3), Xilol: inmersión 5'
2. Montar en DPX

Anexo 3. Detección de PrP^{Sc} mediante la técnica de *Paraffin-embedded tissue Blot* (PET Blot)

Cortar las muestras de encéfalo (4 µm) y colocarlas en una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm de Bio-Rad, dejar secar mínimo toda la noche en una estufa a 56°C

- Desparafinado: Exponer las membranas a los siguientes reactivos:

1. Tolueno: 2 x 5'
2. Isopropanol: 2 x 5'
3. Alcohol 95°: 2 x 5'
4. Alcohol 80°: 2 x 5'
5. Tween 20 al 0.1 % en agua destilada: 1x10'
6. Tween 20 al 0.05% en TBS (Tris buffered saline): 5'

- Digestión con PK:

1. Sumergir las membranas en una solución de PK a una concentración de 250 µg/ml en solución de TBS más 0.1% Brij 35P durante 2 h en baño maría de 55 a 56°C
2. Lavar 10´ en TBS + 0.05% Tween 20 en el agitador (rápido)

- Bloqueo:

1. Realizar 3 lavados de 10´ con TBS + 0.05% Tween 20 con leche al 1%
2. Saturar la membrana con TBS + 0.05% Tween 20 + 0.2% de BSA (Tampón de saturación) en agitación durante 30´

- Inmunodetección:

1. Incubar 1 h con el anticuerpo monoclonal primario Sha31 diluido en tampón de saturación (1:8000)
2. Lavar 3 x 10´ con TBS + 0.05% Tween 20 con leche al 1%
3. Incubar 30´ con el anticuerpo secundario Dako Polyclonal Goat Anti-Mouse Inmunoglobulins/AP, diluido en tampón de saturación (1: 500). Incubar en parafilm boca abajo
4. Lavar 5 x 10´ con TBS + 0.05% Tween 20 con leche al 1%

- Revelado:

1. Ajustar las membranas a pH alcalino con TBS pH 9.5 + 50 mmol/L de MgCl₂, 2 x 5´ en agitación rápida
2. Revelar con NBT/BCIP (Cloruro de nitroblue tetrazolium) en agitación lenta durante 45´

Anexo 4. Técnica de inmunohistoquímica para la detección de Caspasa 3

- Desparafinado:

1. Xilol: 5´
 2. Xilol: 5´
 3. Alcohol 100°: 5´
 4. Alcohol 100°: 5´
 5. Alcohol 96°: 3´
 6. Alcohol 70°: 3´
- Lavar 2 x 5´ con H₂O_d

- Inmunodetección:

1. Bloquear la peroxidasa endógena utilizando una solución de peróxido de hidrógeno (33%) al 3% en H₂O_d durante 35´

2. Lavar 10' con agua corriente
3. Incubar 1 h con solución de bloqueo (10 ml PBS + 150 µl suero de cerdo)
4. Lavar 3 veces con PBS
5. Incubar con el anticuerpo mouse monoclonal anti-Caspase-3 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, sc-56052) en solución de bloqueo durante 24 h a 4°C
6. Lavar 3 veces con PBS
7. Incubar el anticuerpo secundario (polímero marcado Envision) Goat anti-mouse (kit Envision DAB, Dako) durante 30'
8. Lavar 3 veces con PBS
9. Teñir las muestras con DAB durante 5'
10. Parar la reacción con agua destilada
11. Contrateñir con hematoxilina 1'
12. Lavar con agua corriente 5'

- Deshidratación y montaje

Anexo 5. Técnica de inmunohistoquímica para la detección de NeuN, LC3-B y p62

- Desparafinado:

1. Xilol: 5'
 2. Xilol: 5'
 3. Alcohol 100°: 5'
 4. Alcohol 100°: 5'
 5. Alcohol 96°: 3'
 6. Alcohol 70°: 3'
- Lavar 2 x 5' con H₂O

- Desenmascarado de epítomos:

1. Autoclavado hidratado con tampón citrato Tris EDTA: 10' a 96°C
2. Mantener un mínimo de 5' en Wash buffer

- Inmunodetección:

1. Bloquear la peroxidasa endógena utilizando la solución de bloqueo (kit Envision-DAB, Dako, Dinamarca) durante 5'
2. Lavar 3 veces con Wash buffer
3. Incubar con uno de los siguientes anticuerpos primarios:
 - a. Mouse monoclonal anti NeuN, 1:100, 1 h a RT (ab104224, Abcam)
 - b. Mouse monoclonal anti LC3B, 1:200, 1 h a RT (sc-271625; Santa Cruz Biotechnology)

- c. Rabbit polyclonal anti p62, 1:200, 1 h a RT (PW9860; Enzo Life Sciences)
4. Lavar 3 veces con Wash buffer
5. Incubar con uno de los siguientes anticuerpos secundarios (polímero marcado Envision):
 - a. Goat anti-mouse (kit Envision DAB, Dako) para NeuN y LC3B durante 30´
 - b. Goat anti-rabbit (kit Envision DAB, Dako) para p62, durante 30´
6. Lavar 3 veces con Wash buffer
7. Teñir las muestras con DAB durante 5-10´
8. Parar la reacción con agua destilada
9. Contrateñir con hematoxilina 1´
10. Lavar con agua destilada

- Deshidratación y montaje

Anexo 6. Técnica de inmunohistoquímica para la detección de Ng y NfL

- Desparafinado:

1. Xilol: 5´
 2. Xilol: 5´
 3. Alcohol 100°: 5´
 4. Alcohol 100°: 5´
 5. Alcohol 96°: 3´
 6. Alcohol 70°: 3´
- Lavar 2 x 5´ con H2O

- Desenmascarado de epítomos:

1. Autoclavado hidratado con tampón citrato Tris EDTA: 20´ a 96°C
2. Mantener un mínimo de 5´ en Wash buffer

- Inmunodetección:

1. Bloquear la peroxidasa endógena utilizando la solución de bloqueo (kit Envision-DAB, Dako, Dinamarca) durante 5´
2. Lavar 3 veces con Wash buffer
3. Incubar con uno de los siguientes anticuerpos primarios:
 - a. Mouse anti Ng36 (1:400; *in-house generated*, Department of Psychiatry and Neurochemistry, Mölndal, Sweden) durante 24h a 4°C

- b. Mouse monoclonal anti NfL (1:500, Dako Agilent, Glostrup, Denmark, M076229-2) durante 24h a 4°C
4. Lavar 3 veces con Wash buffer
5. Incubar con el anticuerpo secundario Goat anti-mouse (kit Envision DAB, Dako) durante 30 minutos (polímero marcado Envision)
6. Lavar 3 veces con Wash buffer
7. Teñir las muestras con DAB durante 5-10´
8. Parar la reacción con agua destilada
9. Contrateñir con hematoxilina 1´
10. Lavar con agua destilada

- Deshidratación y montaje

Anexo 7. Protocolo de Western blot para la detección de PrP^{Sc}

- Homogeneizado:

Preparar un homogeneizado de encéfalo al 10% (peso/volumen) en PBS, utilizando tubos de trituración y un homogeneizador automático, y realizando dos fases de homogeneizado a 6500 rpm.

- Digestión:

1. Diluir 10,7 µl de PK (18,6 mg/ml) en 1 ml de Tampón A (Bio-rad), y añadir 200 µl de esta mezcla a 200 µl del homogeneizado
2. Incubar a 37°C durante 10´
3. Añadir 200 µl de butanol y centrifugar a 15000g a 4°C durante 7´
4. Eliminar el sobrenadante, añadir 100 µl de Laemmli Sample Buffer 2x (Bio-rad) y
5. desnaturalizar a 100°C durante 5´
6. Centrifugar a 15000g a 4°C durante 15´ y recoger el sobrenadante

- Electroforesis:

1. Preparar buffer de electroforesis (Tris + glicina + SDS + H₂O_d)
2. Diluir 10 µl de la muestra en 10 µl del tampón de carga
3. Incubar las muestras a 95°C durante 5´
4. Cargar 25 µg de proteína en los pocillos del gel
5. Realizar la electroforesis a 90 V durante 30´ y a 150 durante 90´

- Transferencia:

1. Abrir el gel y montarlo sobre el sándwich (*pre-cast membranes*, Biorad) que viene ya preparado para la transferencia.

2. Usar el protocolo de transferencia en seco HIGH MW (10')

- Inmunodetección:

1. Lavar la membrana con TTBS 3 x 5'
2. Bloquear la membrana en una solución de TTBS con leche desnatada al 2% durante 20'-30'
3. Incubar con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo durante 1 h a RT: Mouse monoclonal Sha31, 1:8000 (SPI-Bio)
4. Lavar con TTBS 3 x 15'
5. Incubar con el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo durante 1 h a RT: Goat anti-mouse IgG-HRP 1:4000 (Santa Cruz Biotechnology)
6. Lavar con TTBS 3 x 15'

- Revelar la membrana durante 5' utilizando Luminol (ThermoFisher) y visualizarla con Versa Doc System (Bio-rad)

Anexo 8. Protocolo de Western blot para LC3-B, p62, NeuN, Ng, NfL

- Homogeneizado:

Preparar un homogeneizado de encéfalo al 10% (peso/volumen) en PBS, utilizando tubos de trituración y un homogeneizador automático, y realizando dos fases de homogeneizado a 6500 rpm.

- Electroforesis:

1. Preparar buffer de electroforesis (Tris + glicina + SDS + H₂O_d)
2. Diluir 10 µl de la muestra en 10 µl del tampón de carga
3. Incubar las muestras a 95°C durante 5'
4. Cargar 25 µg de proteína en los pocillos del gel
5. Realizar la electroforesis a 120 V durante 80-85'

- Transferencia:

1. Abrir el gel y montarlo sobre el sándwich (*pre-cast membranes*, Biorad) que viene ya preparado para la transferencia.
2. Usar el protocolo de transferencia en seco HIGH MW (10')

- Inmunodetección:

1. Lavar la membrana con TTBS 3 x 5'
2. Bloquear la membrana en una solución de TTBS con leche desnatada al 2% durante 20'-30'

3. Incubar con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo durante 1 h a RT:
 - a. Mouse monoclonal anti NeuN, 1:1000, 1 h a RT (ab104224, Abcam)
 - b. Mouse monoclonal anti LC3B, 1:5000, 1 h a RT (sc-271625; Santa Cruz Biotechnology)
 - c. Rabbit polyclonal anti p62, 1:1000, 1 h a RT (PW9860; Enzo Life Sciences)
 - d. Mouse anti Ng36, 1:2000, 1 h a RT (*in-house generated*, Department of Psychiatry and Neurochemistry, Mölndal, Sweden)
 - e. Mouse monoclonal anti NfL, 1:1000, 1 h a RT (M076229-2, Dako Agilent)
4. Lavar con TTBS 3 x 15´
5. Incubar con el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo durante 1 h a RT:
 - a. Goat anti-mouse IgG-HRP 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology) para NeuN, LC3B, Ng y NfL
 - b. Goat anti-rabbit IgG-HRP 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology) para p62
6. Lavar con TTBS 3 x 15´

- Revelar la membrana durante 5´ utilizando Luminol (ThermoFisher) y visualizarla con Versa Doc System (Bio-rad)

Anexo 9. Protocolo de Dot blot para la detección de PrP^{Sc}

- Digestión:

1. Añadir 2 µl de SDS al 3% a 18 µl del homogeneizado
2. Diluir la PK (18,6 mg/ml) en DPBS 1x y añadir 5 µl a la muestra
3. Incubar a 37°C durante 1 h
4. Añadir 25 µl de Laemmli Sample Buffer 2x (Bio-rad) para detener la digestión
5. Desnaturalizar a 95°C durante 5´

- Transferencia:

1. Añadir 25 µl de SDS al 1% a 5 µl de la muestra desnaturalizada
2. Inmersión del papel Whatman y de la membrana de nitrocelulosa (0,2 µm) en buffer de
3. transferencia
4. Depositar suavemente 30 µl de la muestra sobre la membrana
5. Esperar 20-30´´
6. Limpiar los pocillos añadiendo 100 µl de SDS al 1% (2 veces) y esperar 1´
7. Limpiar la membrana con PBST (10´´ x 2)

- Inmunodetección:

6. Bloqueo de la membrana en 50 ml de PBST 0,1% + BSA 2% durante 30' en agitación lenta
7. Incubación con 30 ml del anticuerpo primario Sha31, diluido 1:8000 en PBST + BSA,
8. durante 30' en agitación lenta
9. Lavado con PBST 1 x 5' y 1 x 10' en agitación rápida
10. Incubación con 40 ml del anticuerpo secundario HRP anti-mouse (Bio-rad), diluido
11. 1:5000 en PBST + BSA durante 20' en agitación lenta
12. 5. Lavado con PBST 1 x 5' y 2 x 10' en agitación rápida
13. 6. Sumergir la membrana en H₂O para eliminar los restos de PBST

- Revelar la membrana con 250 µl de luminol y 250 µl de peróxido (Pierce) y visualizarla con Versa Doc System (Bio-rad)

Anexo 10. Protocolo de RT-qPCR a partir de tejido nervioso

- Extracción de RNA (RNeasy Lipid Tissue Mini kit, Qiagen):

1. Homogeneizar 100 mg de tejido nervioso en 1ml de *Qiazol Lysis Reagent* (Qiagen)
2. Transferir el homogeneizado a un eppendorf
3. Añadir 200 µl de cloroformo y agitar fuertemente 15 seg
4. Dejar reposar 2-3 min
5. Centrifugar a 12.000g, 15 min, 4°C
6. Dejar que el centrifugado se atempere a RT
7. Transferir la fase acuosa, a un tubo nuevo
8. Añadir 1 volumen de etanol al 70% y vortear
9. Transferir hasta 700µl a una columna. Centrifugar 15 seg a 8.000g, a 15-25°C
10. Descartar sobrenadante, añadir 700 µl de Buffer RW1 y centrifugar 15 seg a 8.000g
11. Descartar sobrenadante, añadir 500 µl de Buffer RPE y centrifugar 15 seg a 8.000g
12. Descartar sobrenadante, añadir 500 µl de Buffer RPE y centrifugar 2 min a 8.000g
13. Colocar la columna en un tubo colector de 1.5 ml, añadir 50µl de *RNase free water* y centrifugar 1 min a 8.000 g
14. Eliminar la columna y medir la cantidad de ácido nucleico total con el Nanodrop UV Spectrophotometer Q3000 (Quawell). Conservar las muestras a -80°C

- Retrotranscripción a cDNA: Utilizar el kit de retrotranscripción qScript™ cDNA SuperMix (Quanta Biosciences) según las instrucciones del fabricante. Una vez realizada la retrotranscripción, diluir el cDNA resultante 1:10 en *DNase free water* y conservar a -20°C.

- PCR cuantitativa a tiempo real:

1. Utilizar una placa de 96 pocillos y añadir a cada uno:
 - a. 5 µl de Fast SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems)
 - b. 0,15 µl del primer *forward* a la concentración deseada
 - c. 0,15 µl del primer *reverse* a la concentración deseada
 - d. 2,9 µl de agua purificada
 - e. 2 µl de cDNA
2. Analizar en el termociclador utilizando un paso inicial de 10 min a 95°C, seguido por 40-45 ciclos de 15 seg a 95°C y 30 seg a la temperatura de hibridación de los primers
3. Realizar la curva de disociación (15 seg a 95°C, 1 min a 60°C, 15 seg a 95°C y 15 seg a 60°C)

Anexo 11. Preparación de inóculos para bioensayo

1. Homogenizar el tejido en suero salino fisiológico al 10% (0,1 g por cada ml de suero), empleando tubos de 1,5 ml con microcuentas de cerámicas y el homogenizador de tejidos TeSeE PRECESS 48 (Bio-Rad).
2. Filtrar el homogenizado a través de una gasa estéril empleando una jeringuilla.
3. Añadir 1 µl del antibiótico ESPES Inyect (CASIER) por cada 2 ml de inóculo. Agitar para mezclar bien.
4. Realizar un cultivo de los inóculos en placas de agar sangre para asegurar su esterilidad. Incubar las placas a 37°C durante una noche.
5. Alicuotar inóculos y conservar congelados a -80°C.

Anexo 12. Protocolo para la técnica de *Protein Mysfolding Cyclic Amplification* (PMCA)

- Preparación los sustratos (homogenizados de material sano):
 1. Pesar 1.5-1.9 g de cerebros sanos perfundidos y añadirlos junto con 10 volúmenes de tampón PMCA en un “potter” (homogenizador), para conseguir un homogenizado al 10%. Homogenizar cuidadosamente
 2. Verter el homogenizado en un Falcon de 50 ml
 3. Dejar los homogenizados reposando 1h en hielo para permitir que las membranas sean digeridas por el tritón del tampón PMCA
 4. Conservar a -80°C.
- Preparar las semillas (homogenizados de material infeccioso):
 1. Pesar 1.5-1.9 g de cerebros y añadirlos junto con la cantidad correspondiente de PBS en un tubo de homogenización con microcuentas de 1.5 ml de PBS para conseguir un homogenizado al 10%
 2. Someter a los tubos a 2-3 ciclos de homogenización en modo 2
 3. Alicuotar 100 µl del sobrenadante en eppendorfs de 1.5 ml
 4. Conservar a -20°C en posición vertical
- Dilución seriada 1:10 de las semillas:
 1. Preparar un strip con 8 microtubos para cada serie de diluciones, y colocar 90 µl de tampón PMCA en cada uno
 2. Coger 10 µl de la semilla y añadirlo al primer microtubo (dilución 10^{-1})
 3. Coger 10 µl de la nueva dilución y añadirla al siguiente microtubo (dilución 10^2). Continuar diluyendo seriadamente hasta dilución 10^{-8}
- Preparación de la placa de PMCA:
 1. Colocar un trozo de papel de aluminio sobre la poyata y una placa de 96 pocillos estéril para PMCA.
 2. Descongelar el sustrato al baño María 37°C
 3. Colocar una cuenta de teflón de 0.22 µm de diámetro en el fondo de cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Manejarlas con pinzas estériles.
 4. Homogenizar el sustrato descongelado con una pipeta de 1000 µl
 5. Verter el sustrato en una bañera y con una pipeta multicanal de 200 µl, colocar 45 µl de sustrato en cada pocillo. Usar pipeteo inverso
 - a. Si se usa sustrato con dextrano al 0.5%, mezclar 40 µl de sustrato con 5 µl de una solución de dextrano al 5%.
 6. Con una pipeta multicanal de 10 µl, coger 5 µl de cada microtubo de los strips preparados con la dilución de las semillas depositarlos en el pocillo correspondiente de la placa de PMCA. Mezclar bien mediante pipeteo
 7. Cerrar los pocillos con las tiras de tapas estériles
 8. Aislar la placa con parafilm

- PMCA:

1. Asegurar que el circuito de agua está activado: baño maría y bomba peristáltica encendidos, T^a de la cámara de sonicador de mínimo 37°C y flujo constante
2. Colocar la placa en la gradilla del sonicador y colocar encima otra gradilla
3. Verificar que el nivel del agua de la corona del sonicador llega al nivel de la muestra en los pocillos de la placa
4. Colocar la tapa del sonicador y cerrar la cámara anecoica
5. Establecer los parámetros de sonicación. Para 24 horas: amplitud 75; tiempo total de sonicación: 16 min; tiempo de cada sonicación: 10 seg; tiempo entre cada sonicación: 14 min 50 seg

- Siguiendo ciclo de PMCA:

1. Preparar la nueva placa de PMCA con sustrato de la misma manera
2. Sacar la placa de PMCA del sonicador y centrifugarla para recuperar todo el volumen en el fondo de los pocillos
3. Retirar el parafilm y las filas de tapas evitando la propulsión de gotas y la contaminación de los pocillos
4. Coger 5 µl de cada pocillo y añadirlos a la nueva placa de PMCA y colocar en el sonicador
5. Cerrar la placa vieja con un papel film adhesivo con la referencia de la placa y guardar a -20°C

Referencias

- Abu Rumeileh, S., Lattanzio, F., Stanzani Maserati, M., Rizzi, R., Capellari, S., Parchi, P., & Stoeck, K. (2016). Diagnostic Accuracy of a Combined Analysis of Cerebrospinal Fluid t-PrP, t-tau, p-tau, and A β 42 in the Differential Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob Disease from Alzheimer's Disease with Emphasis on Atypical Disease Variants. *Journal of Alzheimer's Disease*, *55*(4), doi: 10.3233/jad-160740
- Ade-Biassette, H., Verney, C., Peoc'h, K., Dauge, M. C., Razavi, F., Choudat, L., Gressens, P., Budka, H., & Henin, D. (2006). Immunohistochemical expression of prion protein (PrPC) in the human forebrain during development. *J Neuropathol Exp Neurol*, *65*(7), 698-706. doi: 10.1097/01.jnen.0000228137.10531.72
- Agrimi, U., Nonno, R., Dell'Omo, G., Di Bari, M. A., Conte, M., Chiappini, B., Esposito, E., Di Guardo, G., Windl, O., Vaccari, G., & Lipp, H. P. (2008). Prion protein amino acid determinants of differential susceptibility and molecular feature of prion strains in mice and voles. *PLoS Pathog*, *4*(7), e1000113. doi: 10.1371/journal.ppat.1000113
- Aguzzi, A., Baumann, F., & Bremer, J. (2008). The Prion's Elusive Reason for Being. *Annual Review of Neuroscience*, *31*(1), 439-477. doi: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125620
- Aguzzi, A., & Calella, A. M. (2009). Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev*, *89*(4), 1105-1152. doi: 10.1152/physrev.00006.2009
- Aguzzi, A., & Heikenwalder, M. (2006). Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook. *Nat Rev Microbiol*, *4*(10), 765-775. doi: 10.1038/nrmicro1492
- Aguzzi, A., Lakkaraju, A. K. K., & Frontzek, K. (2018). Toward Therapy of Human Prion Diseases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *58*(1), 331-351. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010617-052745
- Aguzzi, A., & Polymenidou, M. (2004). Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell*, *116*(2), 313-327. doi: 10.1016/s0092-8674(03)01031-6
- Aiken, J. M., Williamson, J. L., & Marsh, R. F. (1989). Evidence of mitochondrial involvement in scrapie infection. *J Virol*, *63*(4), 1686-1694. doi: 10.1128/JVI.63.4.1686-1694.1989

- Allen, L. B., & Cochran, K. W. (1977). Acceleration of scrapie in mice by target-organ treatment with interferon inducers. *Ann N Y Acad Sci*, *284*, 676-680. doi: 10.1111/j.1749-6632.1977.tb22003.x
- Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A., & Clarke, M. C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, *214*(5090), 764-766. doi: 10.1038/214764a0
- Alper, T., Haig, D. A., & Clarke, M. C. (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun*, *22*(3), 278-284. doi: 10.1016/0006-291x(66)90478-5
- Anantharam, V., Kanthasamy, A., Choi, C. J., Martin, D. P., Latchoumycandane, C., Richt, J. A., & Kanthasamy, A. G. (2008). Opposing roles of prion protein in oxidative stress- and ER stress-induced apoptotic signaling. *Free Radic Biol Med*, *45*(11), 1530-1541. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.028
- Andreoletti, O., Berthon, P., Marc, D., Sarradin, P., Grosclaude, J., van Keulen, L., Schelcher, F., Elsen, J. M., & Lantier, F. (2000). Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol*, *81*(Pt 12), 3115-3126. doi: 10.1099/0022-1317-81-12-3115
- Andreoletti, O., Lacroux, C., Chabert, A., Monnereau, L., Tabouret, G., Lantier, F., Berthon, P., Eychenne, F., Lafond-Benestad, S., Elsen, J. M., & Schelcher, F. (2002). PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J Gen Virol*, *83*(Pt 10), 2607-2616. doi: 10.1099/0022-1317-83-10-2607
- Atarashi, R., Moore, R. A., Sim, V. L., Hughson, A. G., Dorward, D. W., Onwubiko, H. A., Priola, S. A., & Caughey, B. (2007). Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein. *Nat Methods*, *4*(8), 645-650. doi: 10.1038/nmeth1066
- Atarashi, R., Satoh, K., Sano, K., Fuse, T., Yamaguchi, N., Ishibashi, D., Matsubara, T., Nakagaki, T., Yamanaka, H., Shirabe, S., Yamada, M., Mizusawa, H., Kitamoto, T., Klug, G., McGlade, A., Collins, S. J., & Nishida, N. (2011). Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med*, *17*(2), 175-178. doi: 10.1038/nm.2294

- Atarashi, R., Wilham, J. M., Christensen, L., Hughson, A. G., Moore, R. A., Johnson, L. M., Onwubiko, H. A., Priola, S. A., & Caughey, B. (2008). Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nat Methods*, *5*(3), 211-212. doi: 10.1038/nmeth0308-211
- Babelhadj, B., Di Bari, M. A., Pirisinu, L., Chiappini, B., Gaouar, S. B. S., Riccardi, G., Marcon, S., Agrimi, U., Nonno, R., & Vaccari, G. (2018). Prion Disease in Dromedary Camels, Algeria. *Emerg Infect Dis*, *24*(6), 1029-1036 doi: 10.3201/eid2406.172007
- Baldauf, E., Beekes, M., & Diring, H. (1997). Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J Gen Virol*, *78* (Pt 5), 1187-1197. doi: 10.1099/0022-1317-78-5-1187
- Baral, P. K., Wieland, B., Swayampakula, M., Polymenidou, M., Rahman, M. H., Kav, N. N., Aguzzi, A., & James, M. N. (2012). Structural studies on the folded domain of the human prion protein bound to the Fab fragment of the antibody POM1. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, *68*(Pt 11), 1501-1512. doi: 10.1107/S0907444912037328
- Barlow, R. M. (1972). Transmissible mink encephalopathy: pathogenesis and nature of the aetiological agent. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*, *6*, 102-109.
- Barlow, R. M., & Rennie, J. C. (1976). The fate of ME7 scrapie infection in rats, guinea-pigs and rabbits. *Res Vet Sci*, *21*(1), 110-111.
- Barrio, T., Filali, H., Otero, A., Sheleby-Elías, J., Marín, B., Vidal, E., Béringue, V., Torres, J. M., Groschup, M., Andréoletti, O., Badiola, J. J., & Bolea, R. (2020). Mixtures of prion substrains in natural scrapie cases revealed by ovinised murine models. *Scientific Reports*, *10*(1). doi: 10.1038/s41598-020-61977-1
- Bartz, J. C., Bessen, R. A., McKenzie, D., Marsh, R. F., & Aiken, J. M. (2000). Adaptation and selection of prion protein strain conformations following interspecies transmission of transmissible mink encephalopathy. *J Virol*, *74*(12), 5542-5547. doi: 10.1128/jvi.74.12.5542-5547.2000
- Baskakov, I. V. (2014). The many shades of prion strain adaptation. *Prion*, *8*(2). doi: 10.4161/pri.27836

- Beekes, M., & McBride, P. A. (2000). Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett*, *278*, 181-184. doi: 10.1016/s0304-3940(99)00934-9
- Beekes, M., & McBride, P. A. (2007). The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies. *FEBS J*, *274*(3), 588-605. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05631.x
- Beekes, M., McBride, P. A., & Baldauf, E. (1998). Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol*, *79* (Pt 3), 601-607. doi: 10.1099/0022-1317-79-3-601
- Bell, J. E., & Ironside, J. W. (1993). Neuropathology of spongiform encephalopathies in humans. *Br Med Bull*, *49*(4), 738-777. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072645
- Benestad, S. L., Sarradin, P., Thu, B., Schonheit, J., Tranulis, M. A., & Bratberg, B. (2003). Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec*, *153*(7), 202-208. doi: 10.1136/vr.153.7.202
- Benvegnù, S., Franciotta, D., Sussman, J., Bachi, A., Zardini, E., Torreri, P., Govaerts, C., Pizzo, S., & Legname, G. (2009). Prion Protein Paralog Doppel Protein Interacts with Alpha-2-Macroglobulin: A Plausible Mechanism for Doppel-Mediated Neurodegeneration. *PLoS One*, *4*(6). doi: 10.1371/journal.pone.0005968
- Beringue, V., Herzog, L., Jaumain, E., Reine, F., Sibille, P., Le Dur, A., Vilotte, J. L., & Laude, H. (2012). Facilitated cross-species transmission of prions in extraneural tissue. *Science*, *335*(6067), 472-475. doi: 10.1126/science.1215659
- Beringue, V., Mallinson, G., Kaiser, M., Tayebi, M., Sattar, Z., Jackson, G., Anstee, D., Collinge, J., & Hawke, S. (2003). Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain. *Brain*, *126*(Pt 9), 2065-2073. doi: 10.1093/brain/awg205
- Beringue, V., Vilotte, J. L., & Laude, H. (2008). Prion agent diversity and species barrier. *Vet Res*, *39*(4), 47. doi: 10.1051/vetres:2008024
- Bessen, R. A., & Marsh, R. F. (1992a). Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol*, *66*(4), 2096-2101. doi: 10.1128/JVI.66.4.2096-2101.1992

- Bessen, R. A., & Marsh, R. F. (1992b). Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *J Gen Virol*, *73* (Pt 2), 329-334. doi: 10.1099/0022-1317-73-2-329
- Bessen, R. A., & Marsh, R. F. (1994). Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol*, *68*(12), 7859-7868. doi: 10.1128/JVI.68.12.7859-7868.1994
- Biacabe, A. G., Laplanche, J. L., Ryder, S., & Baron, T. (2004). Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep*, *5*(1), 110-115. doi: 10.1038/sj.embor.7400054
- Blennow, K., Diaz-Lucena, D., Zetterberg, H., Villar-Pique, A., Karch, A., Vidal, E., Hermann, P., Schmitz, M., Ferrer Abizanda, I., Zerr, I., & Llorens, F. (2019). CSF neurogranin as a neuronal damage marker in CJD: a comparative study with AD. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *90*(8), 846-853. doi: 10.1136/jnnp-2018-320155
- Bocharova, O. V., Breydo, L., Salnikov, V. V., Gill, A. C., & Baskakov, I. V. (2005). Synthetic prions generated in vitro are similar to a newly identified subpopulation of PrPSc from sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Protein Science*, *14*(5), 1222-1232. doi: 10.1110/ps.041186605
- Boellaard, J. W., Kao, M., Schlote, W., & Diring, H. (1991). Neuronal autophagy in experimental scrapie. *Acta Neuropathol*, *82*(3), 225-228. doi: 10.1007/BF00294449
- Boellaard, J. W., Schlote, W., & Tateishi, J. (1989). Neuronal autophagy in experimental Creutzfeldt-Jakob's disease. *Acta Neuropathologica*, *78*(4), 410-418. doi: 10.1007/bf00688178
- Boese, A. S., Saba, R., Campbell, K., Majer, A., Medina, S., Burton, L., Booth, T. F., Chong, P., Westmacott, G., Dutta, S. M., Saba, J. A., & Booth, S. A. (2016). MicroRNA abundance is altered in synaptoneuroosomes during prion disease. *Mol Cell Neurosci*, *71*, 13-24. doi: 10.1016/j.mcn.2015.12.001
- Bolea, R., Monleon, E., Schiller, I., Raeber, A. J., Acin, C., Monzon, M., Martin-Burriel, I., Struckmeyer, T., Oesch, B., & Badiola, J. J. (2005). Comparison of immunohistochemistry and two rapid tests for detection of abnormal prion protein in different brain regions of sheep with typical scrapie. *J Vet Diagn Invest*, *17*(5), 467-469. doi: 10.1177/104063870501700511

- Bolton, D. C., McKinley, M. P., & Prusiner, S. B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, *218*(4579), 1309-1311. doi: 10.1126/science.6815801
- Bons, N., Mestre-Frances, N., Belli, P., Cathala, F., Gajdusek, D. C., & Brown, P. (1999). Natural and experimental oral infection of nonhuman primates by bovine spongiform encephalopathy agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(7), 4046-4051. doi: 10.1073/pnas.96.7.4046
- 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*(6563), 339-343. doi: 10.1038/379339a0
- Brandner, S., & Jaunmuktane, Z. (2017). Prion disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*, *133*(2), 197-222. doi: 10.1007/s00401-017-1670-5
- Brody, D. L., & Holtzman, D. M. (2008). Active and passive immunotherapy for neurodegenerative disorders. *Annu Rev Neurosci*, *31*, 175-193. doi: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125529
- Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., & Kretschmar, H. (1997). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, *390*(6661), 684-687. doi: 10.1038/37783
- Bruce, M. E. (1993). Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull*, *49*(4), 822-838. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072649
- Bruce, M. E., Boyle, A., Cousens, S., McConnell, I., Foster, J., Goldmann, W., & Fraser, H. (2002). Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *J Gen Virol*, *83*(Pt 3), 695-704. doi: 10.1099/0022-1317-83-3-695
- Bruce, M. E., & Fraser, H. (1991). Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol*, *172*, 125-138. doi: 10.1007/978-3-642-76540-7_8
- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., & Bostock, C. J. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, *389*(6650), 498-501. doi: 10.1038/39057

- Budka, H. (2003). Neuropathology of prion diseases. *Br Med Bull*, *66*, 121-130. doi: 10.1093/bmb/66.1.121
- Budka, H., Aguzzi, A., Brown, P., Brucher, J. M., Bugiani, O., Gullotta, F., Haltia, M., Hauw, J. J., Ironside, J. W., Jellinger, K., & *et al.* (1995). Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathol*, *5*(4), 459-466. doi: 10.1111/j.1750-3639.1995.tb00625.x
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., & Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, *73*(7), 1339-1347. doi: 10.1016/0092-8674(93)90360-3
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M., & Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, *356*(6370), 577-582. doi: 10.1038/356577a0
- Bueler, H., Raeber, A., Sailer, A., Fischer, M., Aguzzi, A., & Weissmann, C. (1994). High prion and PrPSc levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol Med*, *1*(1), 19-30.
- Carrell, R. W., & Lomas, D. A. (1997). Conformational disease. *Lancet*, *350*(9071), 134-138. doi: 10.1016/S0140-6736(97)02073-4
- Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., Monaco, S., & Caramelli, M. (2004). Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(9), 3065-3070. doi: 10.1073/pnas.0305777101
- Cassard, H., Torres, J. M., Lacroux, C., Douet, J. Y., Benestad, S. L., Lantier, F., Lugan, S., Lantier, I., Costes, P., Aron, N., Reine, F., Herzog, L., Espinosa, J. C., Beringue, V., & Andreoletti, O. (2014). Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. *Nat Commun*, *5*, 5821. doi: 10.1038/ncomms6821
- Castilla, J., Hetz, C., & Soto, C. (2004). Molecular mechanisms of neurotoxicity of pathological prion protein. *Curr Mol Med*, *4*(4), 397-403. doi: 10.2174/1566524043360654
- Castilla, J., Saá, P., Hetz, C., & Soto, C. (2005). In Vitro Generation of Infectious Scrapie Prions. *Cell*, *121*(2), 195-206. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.011

- Castilla, J., Saa, P., & Soto, C. (2005). Detection of prions in blood. *Nat Med*, *11*(9), 982-985. doi: 10.1038/nm1286
- Castle, A. R., & Gill, A. C. (2017). Physiological Functions of the Cellular Prion Protein. *Front Mol Biosci*, *4*, 19. doi: 10.3389/fmolb.2017.00019
- Caughey, B., & Chesebro, B. (2001). Transmissible spongiform encephalopathies and prion protein interconversions. *Adv Virus Res*, *56*, 277-311. doi: 10.1016/s0065-3527(01)56031-5
- Caughey, B., Race, R., & Chesebro, B. (1989). Comparative sequence analysis, in vitro expression and biosynthesis of mouse PrP. *Prog Clin Biol Res*, *317*, 619-636.
- Chabry, J., Caughey, B., & Chesebro, B. (1998). Specific inhibition of in vitro formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides. *J Biol Chem*, *273*(21), 13203-13207. doi: 10.1074/jbc.273.21.13203
- Chabry, J., Priola, S. A., Wehrly, K., Nishio, J., Hope, J., & Chesebro, B. (1999). Species-independent inhibition of abnormal prion protein (PrP) formation by a peptide containing a conserved PrP sequence. *J Virol*, *73*(8), 6245-6250. doi: 10.1128/JVI.73.8.6245-6250.1999
- Chaib-Oukadour, I., Gil, C., & Aguilera, J. (2004). The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin rescues cerebellar granule neurones from apoptotic death: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of Neurochemistry*, *90*(5), 1227-1236. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02586.x
- Chandler, R. L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet*, (7191), 1378-1379. doi: 10.1016/s0140-6736(61)92008-6
- Chandler, R. L. (1963). Experimental Scrapie in the Mouse. *Research in Veterinary Science*, *4*(2), 276-285. doi: 10.1016/s0034-5288(18)34870-7
- Chandler, R. L., & Fisher, J. (1963). Experimental Transmission of Scrapie to Rats. *Lancet*, *2*(7318), 1165.
- Chesebro, B. (1998). BSE and prions: uncertainties about the agent. *Science*, *279*(5347), 42-43. doi: 10.1126/science.279.5347.42
- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J. M., & *et al.* (1985). Identification of scrapie prion

- protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*, 315(6017), 331-333. doi: 10.1038/315331a0
- 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(5727), 1435-1439. doi: 10.1126/science.1110837
- Chianini, F., Fernandez-Borges, N., Erana, H., Pang, Y., Vidal, E., Eaton, S. L., Finlayson, J., Dagleish, M. P., & Castilla, J. (2013). Prion-resistant or prion-susceptible species, this is the question. *Virulence*, 4(4), 333-334. doi: 10.4161/viru.24456
- Ciriza, J., García-Ojeda, M., Martín-Burriel, I., Agulhon, C., Miana-Mena, F., Muñoz, M., Zaragoza, P., Brûlet, P., & Osta, R. (2008). Antiapoptotic activity maintenance of Brain Derived Neurotrophic Factor and the C fragment of the tetanus toxin genetic fusion protein. *Open Life Sciences*, 3,2. doi: 10.2478/s11535-008-0011-z
- Clark, A. M., & Moar, J. A. (1992). Scrapie: a clinical assessment. *Vet Rec*, 130(17), 377-378. doi: 10.1136/vr.130.17.377
- Cohen, F. E. (1999). Protein misfolding and prion diseases. *J Mol Biol*, 293(2), 313-320. doi: 10.1006/jmbi.1999.2990
- Cohen, F. E., & Prusiner, S. B. (1998). Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biochem*, 67, 793-819. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.793
- Colby, D. W., Giles, K., Legname, G., Wille, H., Baskakov, I. V., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2009). Design and construction of diverse mammalian prion strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(48), 20417-20422. doi: 10.1073/pnas.0910350106
- Colby, D. W., Wain, R., Baskakov, I. V., Legname, G., Palmer, C. G., Nguyen, H.-O. B., Lemus, A., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2010). Protease-Sensitive Synthetic Prions. *PLOS Pathogens*, 6(1). doi: 10.1371/journal.ppat.1000736
- Colby, D. W., Zhang, Q., Wang, S., Groth, D., Legname, G., Riesner, D., & Prusiner, S. B. (2007). Prion detection by an amyloid seeding assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(52), 20914-20919. doi: 10.1073/pnas.0710152105
- Collinge, J. (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci*, 24, 519-550. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.519

- Collinge, J., & Clarke, A. R. (2007). A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science*, *318*(5852), 930-936. doi: 10.1126/science.1138718
- Collinge, J., Whittington, M. A., Sidle, K. C., Smith, C. J., Palmer, M. S., Clarke, A. R., & Jefferys, J. G. (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*, *370*(6487), 295-297. doi: 10.1038/370295a0
- Cortes, C. J., Qin, K., Cook, J., Solanki, A., & Mastrianni, J. A. (2012). Rapamycin delays disease onset and prevents PrP plaque deposition in a mouse model of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *J Neurosci*, *32*(36), 12396-12405. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6189-11.2012
- Cox, B., Ness, F., & Tuite, M. (2003). Analysis of the generation and segregation of propagons: entities that propagate the [PSI⁺] prion in yeast. *Genetics*, *165*(1), 23-33. doi: 10.1093/genetics/165.1.23
- Cramm, M., Schmitz, M., Karch, A., Mitrova, E., Kuhn, F., Schroeder, B., Raeber, A., Vargas, D., Kim, Y. S., Satoh, K., Collins, S., & Zerr, I. (2016). Stability and Reproducibility Underscore Utility of RT-QuIC for Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob Disease. *Mol Neurobiol*, *53*(3), 1896-1904. doi: 10.1007/s12035-015-9133-2
- Cuille, J., & Chelle, P. L. (1936). Pathologie animale - La maladie dite trembalante du mouton est-elle inoculable? . *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des Sciences*, (203), 1552-1554.
- Das, I., Krzyzosiak, A., Schneider, K., Wrabetz, L., D'Antonio, M., Barry, N., Sigurdardottir, A., & Bertolotti, A. (2015). Preventing proteostasis diseases by selective inhibition of a phosphatase regulatory subunit. *Science*, *348*(6231), 239-242. doi: 10.1126/science.aaa4484
- Daude, N., Marella, M., & Chabry, J. (2003). Specific inhibition of pathological prion protein accumulation by small interfering RNAs. *J Cell Sci*, *116*(Pt 13), 2775-2779. doi: 10.1242/jcs.00494
- DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1993). The neurochemistry of prion diseases. *J Neurochem*, *61*(5), 1589-1601. doi: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb09792.x
- DeArmond, S. J., Sanchez, H., Yehiely, F., Qiu, Y., Ninchak-Casey, A., Daggett, V., Camerino, A. P., Cayetano, J., Rogers, M., Groth, D., Torchia, M., Tremblay, P., Scott, M. R., Cohen, F. E., & Prusiner, S. B. (1997). Selective neuronal targeting in prion disease. *Neuron*, *19*(6), 1337-1348. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80424-9

- Deleault, N. R., Harris, B. T., Rees, J. R., & Supattapone, S. (2007). Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(23), 9741-9746. doi: 10.1073/pnas.0702662104
- Detwiler, L. A., & Baylis, M. (2003). The epidemiology of scrapie. *Rev Sci Tech*, *22*(1), 121-143. doi: 10.20506/rst.22.1.1386
- Di Bari, M. A., Chianini, F., Vaccari, G., Esposito, E., Conte, M., Eaton, S. L., Hamilton, S., Finlayson, J., Steele, P. J., Dagleish, M. P., Reid, H. W., Bruce, M., Jeffrey, M., Agrimi, U., & Nonno, R. (2008). The bank vole (*Myodes glareolus*) as a sensitive bioassay for sheep scrapie. *J Gen Virol*, *89*(Pt 12), 2975-2985. doi: 10.1099/vir.0.2008/005520-0
- Diaz-Espinoza, R., & Soto, C. (2012). High-resolution structure of infectious prion protein: the final frontier. *Nat Struct Mol Biol*, *19*(4), 370-377. doi: 10.1038/nsmb.2266
- Dickinson, A. G., & Meikle, V. M. (1971). Host-genotype and agent effects in scrapie incubation: change in allelic interaction with different strains of agent. *Mol Gen Genet*, *112*(1), 73-79. doi: 10.1007/BF00266934
- Dickinson, A. G., Meikle, V. M., & Fraser, H. (1968). Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *J Comp Pathol*, *78*(3), 293-299. doi: 10.1016/0021-9975(68)90005-4
- Diringer, H. (1992). Hidden amyloidoses. *Exp Clin Immunogenet*, *9*(4), 212-229.
- Dorey, A., Tholance, Y., Vighetto, A., Perret-Liaudet, A., Lachman, I., Krolak-Salmon, P., Wagner, U., Struyfs, H., De Deyn, P. P., El-Moualij, B., Zorzi, W., Meyronet, D., Streichenberger, N., Engelborghs, S., Kovacs, G. G., & Quadrio, I. (2015). Association of cerebrospinal fluid prion protein levels and the distinction between Alzheimer disease and Creutzfeldt-Jakob disease. *JAMA Neurol*, *72*(3), 267-275. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.4068
- Ducrot, C., Arnold, M., de Koeijer, A., Heim, D., & Calavas, D. (2008). Review on the epidemiology and dynamics of BSE epidemics. *Vet Res*, *39*(4), 15. doi: 10.1051/vetres:2007053
- Dupiereux, I., Falisse-Poirrier, N., Zorzi, W., Watt, N. T., Thellin, O., Zorzi, D., Pierard, O., Hooper, N. M., Heinen, E., & Elmoualij, B. (2008). Protective effect of prion

- protein via the N-terminal region in mediating a protective effect on paraquat-induced oxidative injury in neuronal cells. *J Neurosci Res*, *86*(3), 653-659. doi: 10.1002/jnr.21506
- Eloit, M., Adjou, K., Couplier, M., Fontaine, J. J., Hamel, R., Lilin, T., Messiaen, S., Andreoletti, O., Baron, T., Bencsik, A., Biacabe, A. G., Beringue, V., Laude, H., Le Dur, A., Vilotte, J. L., Comoy, E., Deslys, J. P., Grassi, J., Simon, S., Lantier, F., & Sarradin, P. (2005). BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec*, *156*(16), 523-524. doi: 10.1136/vr.156.16.523-b
- Ertmer, A., Gilch, S., Yun, S. W., Flechsig, E., Klebl, B., Stein-Gerlach, M., Klein, M. A., & Schatzl, H. M. (2004). The tyrosine kinase inhibitor ST1571 induces cellular clearance of PrP^{Sc} in prion-infected cells. *J Biol Chem*, *279*(40), 41918-41927. doi: 10.1074/jbc.M405652200
- Fernández-Borges, N., Di Bari, M. A., Eraña, H., Sánchez-Martín, M., Pirisinu, L., Parra, B., Elezgarai, S. R., Vanni, I., López-Moreno, R., Vaccari, G., Venegas, V., Charco, J. M., Gil, D., Harrathi, C., D'Agostino, C., Agrimi, U., Mayoral, T., Requena, J. R., Nonno, R., & Castilla, J. (2017). Cofactors influence the biological properties of infectious recombinant prions. *Acta Neuropathologica*, *135*(2), 179-199. doi: 10.1007/s00401-017-1782-y
- Follet, J., Lemaire-Vieille, C., Blanquet-Grossard, F., Podevin-Dimster, V., Lehmann, S., Chauvin, J. P., Decavel, J. P., Varea, R., Grassi, J., Fontes, M., & Cesbron, J. Y. (2002). PrP expression and replication by Schwann cells: implications in prion spreading. *J Virol*, *76*(5), 2434-2439. doi: 10.1128/jvi.76.5.2434-2439.2002
- Forloni, G., Artuso, V., Roiter, I., Morbin, M., & Tagliavini, F. (2013). Therapy in prion diseases. *Curr Top Med Chem*, *13*(19), 2465-2476. doi: 10.2174/15680266113136660173
- Foster, J. D., Goldmann, W., & Hunter, N. (2013). Evidence in sheep for pre-natal transmission of scrapie to lambs from infected mothers. *PLoS One*, *8*(11), e79433. doi: 10.1371/journal.pone.0079433
- Foster, J. D., Wilson, M., & Hunter, N. (1996). Immunolocalisation of the prion protein (PrP) in the brains of sheep with scrapie. *Vet Rec*, *139*(21), 512-515. doi: 10.1136/vr.139.21.512

- Fraser, H. (1993). Diversity in the neuropathology of scrapie-like diseases in animals. *British Medical Bulletin*, *49*(4), 792-809 doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072647
- Fraser, H., & Dickinson, A. G. (1968). The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol*, *78*(3), 301-311. doi: 10.1016/0021-9975(68)90006-6
- Fraser, H., & Dickinson, A. G. (1973). Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Pathol*, *83*(1), 29-40. doi: 10.1016/0021-9975(73)90024-8
- Frost, B., & Diamond, M. I. (2010). Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, *11*(3), 155-159. doi: 10.1038/nrn2786
- Gabizon, R., Meiner, Z., Halimi, M., & Ben-Sasson, S. A. (1993). Heparin-like molecules bind differentially to prion-proteins and change their intracellular metabolic fate. *J Cell Physiol*, *157*(2), 319-325. doi: 10.1002/jcp.1041570215
- Gaetani, L., Blennow, K., Calabresi, P., Di Filippo, M., Parnetti, L., & Zetterberg, H. (2019). Neurofilament light chain as a biomarker in neurological disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *90*(8), 870-881. doi: 10.1136/jnnp-2018-320106
- Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J., Jr., Asher, D. M., & David, E. (1968). Transmission of experimental kuru to the spider monkey (*Ateles geoffreyi*). *Science*, *162*(3854), 693-694. doi: 10.1126/science.162.3854.693
- Gambetti, P., Kong, Q., Zou, W., Parchi, P., & Chen, S. G. (2003). Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br Med Bull*, *66*, 213-239. doi: 10.1093/bmb/66.1.213
- Ganley, R. P., Iwagaki, N., del Rio, P., Baseer, N., Dickie, A. C., Boyle, K. A., Polgar, E., Watanabe, M., Abaira, V. E., Zimmerman, A., Riddell, J. S., & Todd, A. J. (2015). Inhibitory Interneurons That Express GFP in the PrP-GFP Mouse Spinal Cord Are Morphologically Heterogeneous, Innervated by Several Classes of Primary Afferent and Include Lamina I Projection Neurons among Their Postsynaptic Targets. *J Neurosci*, *35*(19), 7626-7642. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0406-15.2015
- Gibbs, C. J., Jr., Gajdusek, D. C., Asher, D. M., Alpers, M. P., Beck, E., Daniel, P. M., & Matthews, W. B. (1968). Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform

- encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science*, 161(3839), 388-389. doi: 10.1126/science.161.3839.388
- Gielbert, A., Davis, L. A., Sayers, A. R., Hope, J., Gill, A. C., & Sauer, M. J. (2009). High-resolution differentiation of transmissible spongiform encephalopathy strains by quantitative N-terminal amino acid profiling (N-TAAP) of PK-digested abnormal prion protein. *J Mass Spectrom*, 44(3), 384-396. doi: 10.1002/jms.1516
- Giese, A., & Kretzschmar, H. A. (2001). Prion-induced neuronal damage--the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies. *Curr Top Microbiol Immunol*, 253, 203-217. doi: 10.1007/978-3-662-10356-2_10
- Gil, C., Chaib-Oukadour, I., Pelliccioni, P., & Aguilera, J. (2000). Activation of signal transduction pathways involving trkA, PLCgamma-1, PKC isoforms and ERK-1/2 by tetanus toxin. *FEBS Lett*, 481(2), 177. doi: 10.1016/s0014-5793(00)02002-0
- Glatzel, M., & Aguzzi, A. (2001). The shifting biology of prions. *Brain Res Brain Res Rev*, 36(2-3), 241-248. doi: 10.1016/s0165-0173(01)00100-x
- Gonzalez-Romero, D., Barria, M. A., Leon, P., Morales, R., & Soto, C. (2008). Detection of infectious prions in urine. *FEBS Lett*, 582(21-22), 3161-3166. doi: 10.1016/j.febslet.2008.08.003
- Gonzalez, L., Horton, R., Ramsay, D., Toomik, R., Leathers, V., Tonelli, Q., Dagleish, M. P., Jeffrey, M., & Terry, L. (2008). Adaptation and evaluation of a rapid test for the diagnosis of sheep scrapie in samples of rectal mucosa. *J Vet Diagn Invest*, 20(2), 203-208. doi: 10.1177/104063870802000209
- Gonzalez, L., Jeffrey, M., Dagleish, M. P., Goldmann, W., Siso, S., Eaton, S. L., Martin, S., Finlayson, J., Stewart, P., Steele, P., Pang, Y., Hamilton, S., Reid, H. W., & Chianini, F. (2012). Susceptibility to scrapie and disease phenotype in sheep: cross-PRNP genotype experimental transmissions with natural sources. *Vet Res*, 43, 55. doi: 10.1186/1297-9716-43-55
- Gonzalez, L., Martin, S., Begara-McGorum, I., Hunter, N., Houston, F., Simmons, M., & Jeffrey, M. (2002). Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *J Comp Pathol*, 126(1), 17-29. doi: 10.1053/jcpa.2001.0516

- Gonzalez, L., Martin, S., & Jeffrey, M. (2003). Distinct profiles of PrP(d) immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE-infected sheep: implications for differential cell targeting and PrP processing. *J Gen Virol*, *84*(Pt 5), 1339-1350. doi: 10.1099/vir.0.18800-0
- Gonzalez, L., Pitarch, J. L., Martin, S., Thurston, L., Moore, J., Acin, C., & Jeffrey, M. (2014). Identical pathogenesis and neuropathological phenotype of scrapie in valine, arginine, glutamine/valine, arginine, glutamine sheep infected experimentally by the oral and conjunctival routes. *J Comp Pathol*, *150*(1), 47-56. doi: 10.1016/j.jcpa.2013.06.006
- Gonzalez, L., Siso, S., Monleon, E., Casalone, C., van Keulen, L. J., Balkema-Buschmann, A., Ortiz-Pelaez, A., Iulini, B., Langeveld, J. P., Hoffmann, C., Badiola, J. J., Jeffrey, M., & Acin, C. (2010). Variability in disease phenotypes within a single PRNP genotype suggests the existence of multiple natural sheep scrapie strains within Europe. *J Gen Virol*, *91*(Pt 10), 2630-2641. doi: 10.1099/vir.0.022574-0
- Goold, R., McKinnon, C., Rabbanian, S., Collinge, J., Schiavo, G., & Tabrizi, S. J. (2013). Alternative fates of newly formed PrPSc upon prion conversion on the plasma membrane. *J Cell Sci*, *126*(Pt 16), 3552-3562. doi: 10.1242/jcs.120477
- Goold, R., McKinnon, C., & Tabrizi, S. J. (2015). Prion degradation pathways: Potential for therapeutic intervention. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *66*, 12-20. doi: 10.1016/j.mcn.2014.12.009
- Gough, K. C., & Maddison, B. C. (2010). Prion transmission: prion excretion and occurrence in the environment. *Prion*, *4*(4), 275-282. doi: 10.4161/pri.4.4.13678
- Gray, F., Chrétien, F., Adle-Biassette, H., Dorandeu, A., Ereau, T., Delisle, M.-B., Kopp, N., Ironside, J. W., & Vital, C. (1999). Neuronal Apoptosis in Creutzfeldt-Jakob Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *58*(4), 321-328. doi: 10.1097/00005072-199904000-00002
- Gresser, I., Maury, C., & Chandler, R. L. (1983). Failure to modify scrapie in mice by administration of interferon or anti-interferon globulin. *J Gen Virol*, *64* (Pt 6), 1387-1389. doi: 10.1099/0022-1317-64-6-1387
- Gretzschel, A., Buschmann, A., Eiden, M., Ziegler, U., Luhken, G., Erhardt, G., & Groschup, M. H. (2005). Strain typing of German transmissible spongiform encephalopathies field cases in small ruminants by biochemical methods. *J Vet*

- Med B Infect Dis Vet Public Health*, 52(2), 55-63. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2005.00827.x>
- Griffith, J. S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature*, 215(5105), 1043-1044. doi: 10.1038/2151043a0
- Groveman, B. R., Dolan, M. A., Taubner, L. M., Kraus, A., Wickner, R. B., & Caughey, B. (2014). Parallel in-register intermolecular beta-sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids. *J Biol Chem*, 289(35), 24129-24142. doi: 10.1074/jbc.M114.578344
- Gusel'nikova, V. V., & Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*, 7(2), 42-47.
- Halliday, M., Radford, H., Sekine, Y., Moreno, J., Verity, N., le Quesne, J., Ortori, C. A., Barrett, D. A., Fromont, C., Fischer, P. M., Harding, H. P., Ron, D., & Mallucci, G. R. (2015). Partial restoration of protein synthesis rates by the small molecule ISRIB prevents neurodegeneration without pancreatic toxicity. *Cell Death Dis*, 6, e1672. doi: 10.1038/cddis.2015.49
- Han, J., Back, S. H., Hur, J., Lin, Y. H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C. L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., Kilberg, M. S., Sartor, M. A., & Kaufman, R. J. (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol*, 15(5), 481-490. doi: 10.1038/ncb2738
- Haraguchi, T., Fisher, S., Olofsson, S., Endo, T., Groth, D., Tarentino, A., Borchelt, D. R., Teplow, D., Hood, L., Burlingame, A., & *et al.* (1989). Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys*, 274(1), 1-13. doi: 10.1016/0003-9861(89)90409-8
- Healy, A. M., Weavers, E., McElroy, M., Gomez-Parada, M., Collins, J. D., O'Doherty, E., Sweeney, T., & Doherty, M. L. (2003). The clinical neurology of scrapie in Irish sheep. *J Vet Intern Med*, 17(6), 908-916. doi: 10.1111/j.1939-1676.2003.tb02532.x
- Heiseke, A., Aguib, Y., Riemer, C., Baier, M., & Schatzl, H. M. (2009). Lithium induces clearance of protease resistant prion protein in prion-infected cells by induction of autophagy. *J Neurochem*, 109(1), 25-34. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.05906.x

- Heiseke, A., Aguib, Y., & Schatzl, H. M. (2010). Autophagy, prion infection and their mutual interactions. *Curr Issues Mol Biol*, *12*(2), 87-97.
- Heppner, F. L., Musahl, C., Arrighi, I., Klein, M. A., Rulicke, T., Oesch, B., Zinkernagel, R. M., Kalinke, U., & Aguzzi, A. (2001). Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science*, *294*(5540), 178-182. doi: 10.1126/science.1063093
- Herrmann, P., Appleby, B., Brandel, J.-P., Caughey, B., Collins, S., Geschwind, M. D., Green, A., Haïk, S., Kovacs, G. G., Ladogana, A., Llorens, F., Mead, S., Nishida, N., Pal, S., Parchi, P., Pocchiari, M., Satoh, K., Zanusso, G., & Zerr, I. (2021). Biomarkers and diagnostic guidelines for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *The Lancet Neurology*, *20*(3), 235-246. doi: 10.1016/s1474-4422(20)30477-4
- Herrmann, U. S., Schutz, A. K., Shirani, H., Huang, D., Saban, D., Nuvolone, M., Li, B., Ballmer, B., Aslund, A. K., Mason, J. J., Rushing, E., Budka, H., Nystrom, S., Hammarstrom, P., Bockmann, A., Cafilisch, A., Meier, B. H., Nilsson, K. P., Hornemann, S., & Aguzzi, A. (2015). Structure-based drug design identifies polythiophenes as antiprion compounds. *Sci Transl Med*, *7*(299), 299ra123. doi: 10.1126/scitranslmed.aab1923
- Herrmann, U. S., Sonati, T., Falsig, J., Reimann, R. R., Dametto, P., O'Connor, T., Li, B., Lau, A., Hornemann, S., Sorce, S., Wagner, U., Sanoudou, D., & Aguzzi, A. (2015). Prion infections and anti-PrP antibodies trigger converging neurotoxic pathways. *PLoS Pathog*, *11*(2), e1004662. doi: 10.1371/journal.ppat.1004662
- 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*(20), 5435-5445. doi: 10.1093/emboj/cdg537
- Hilton, K. J., Cunningham, C., Reynolds, R. A., & Perry, V. H. (2013). Early Hippocampal Synaptic Loss Precedes Neuronal Loss and Associates with Early Behavioural Deficits in Three Distinct Strains of Prion Disease. *PLoS One*, *8*(6), e68062. doi: 10.1371/journal.pone.0068062
- Hipp, M. S., Park, S. H., & Hartl, F. U. (2014). Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends Cell Biol*, *24*(9), 506-514. doi: 10.1016/j.tcb.2014.05.003

- Hoinville, L. J. (1996). A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev Sci Tech*, 15(3), 827-852. doi: 10.20506/rst.15.3.959
- Homma, T., Ishibashi, D., Nakagaki, T., Satoh, K., Sano, K., Atarashi, R., & Nishida, N. (2014). Increased expression of p62/SQSTM1 in prion diseases and its association with pathogenic prion protein. *Sci Rep*, 4, 4504. doi: 10.1038/srep04504
- Horiuchi, M., & Caughey, B. (1999). Prion protein interconversions and the transmissible spongiform encephalopathies. *Structure*, 7(10), R231-240. doi: 10.1016/s0969-2126(00)80049-0
- Horiuchi, M., Priola, S. A., Chabry, J., & Caughey, B. (2000). Interactions between heterologous forms of prion protein: binding, inhibition of conversion, and species barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(11), 5836-5841. doi: 10.1073/pnas.110523897
- Hornemann, S., Korth, C., Oesch, B., Riek, R., Wider, G., Wüthrich, K., & Glockshuber, R. (1997). Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization. *FEBS Letters*, 413(2), 277-281. doi: 10.1016/s0014-5793(97)00921-6
- Houston, F., & Andreoletti, O. (2018). The zoonotic potential of animal prion diseases. *Handb Clin Neurol*, 153, 447-462. doi: 10.1016/B978-0-444-63945-5.00025-8
- Houston, F., McCutcheon, S., Goldmann, W., Chong, A., Foster, J., Siso, S., Gonzalez, L., Jeffrey, M., & Hunter, N. (2008). Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood*, 112(12), 4739-4745 doi: 10.1182/blood-2008-04-152520
- Hoyt, F., Standke, H. G., Artikis, E., Schwartz, C. L., Hansen, B., Li, K., Hughson, A. G., Manca, M., Thomas, O. R., Raymond, G. J., Race, B., Baron, G. S., Caughey, B., & Kraus, A. (2022). Cryo-EM structure of anchorless RML prion reveals variations in shared motifs between distinct strains. *Nat Commun*, 13(1), 4005. doi: 10.1038/s41467-022-30458-6
- Hruska-Plochan, M., Li, B., Kyburz, D., Krutzfeld, J., Landmesser, U., Aguzzi, A., & Polymenidou, M. (2015). New and emerging roles of small RNAs in neurodegeneration, muscle, cardiovascular and inflammatory diseases. *Swiss Med Wkly*, 145, w14192. doi: 10.4414/smw.2015.14192

- Hsiao, K., & Prusiner, S. B. (1990). Inherited human prion diseases. *Neurology*, *40*(12), 1820-1827. doi: 10.1212/wnl.40.12.1820
- Hunter, N., Foster, J., Chong, A., McCutcheon, S., Parnham, D., Eaton, S., MacKenzie, C., & Houston, F. (2002). Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol*, *83*(Pt 11), 2897-2905. doi: 10.1099/0022-1317-83-11-2897
- Huor, A., Espinosa, J. C., Vidal, E., Cassard, H., Douet, J.-Y., Lugan, S., Aron, N., Marín-Moreno, A., Lorenzo, P., Aguilar-Calvo, P., Badiola, J., Bolea, R., Pumarola, M., Benestad, S. L., Orge, L., Thackray, A. M., Bujdoso, R., Torres, J.-M., & Andreoletti, O. (2019). The emergence of classical BSE from atypical/Nor98 scrapie. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(52), 26853-26862. doi: 10.1073/pnas.1915737116
- Huzarewich, R. L., Siemens, C. G., & Booth, S. A. (2010). Application of "omics" to prion biomarker discovery. *J Biomed Biotechnol*, *2010*, 613504. doi: 10.1155/2010/613504
- Imran, M., & Mahmood, S. (2011a). An overview of animal prion diseases. *Virol J*, *8*, 493. doi: 10.1186/1743-422X-8-493
- Imran, M., & Mahmood, S. (2011b). An overview of human prion diseases. *Virol J*, *8*, 559. doi: 10.1186/1743-422X-8-559
- Jeffrey, M., Goodsir, C. M., Holliman, A., Higgins, R. J., Bruce, M. E., McBride, P. A., & Fraser, J. R. (1998). Determination of the frequency and distribution of vascular and parenchymal amyloid with polyclonal and N-terminal-specific PrP antibodies in scrapie-affected sheep and mice. *Vet Rec*, *142*(20), 534-537. doi: 10.1136/vr.142.20.534
- Jeffrey, M., Martin, S., & Gonzalez, L. (2003). Cell-associated variants of disease-specific prion protein immunolabelling are found in different sources of sheep transmissible spongiform encephalopathy. *J Gen Virol*, *84*, 1033-1046. doi: 10.1099/vir.0.18825-0
- Jeffrey, M., Martin, S., Thomson, J. R., Dingwall, W. S., Begara-McGorum, I., & Gonzalez, L. (2001). Onset and distribution of tissue prp accumulation in scrapie-affected suffolk sheep as demonstrated by sequential necropsies and tonsillar biopsies. *J Comp Pathol*, *125*(1), 48-57. doi: 10.1053/jcpa.2001.0476

- Jeffrey, M., Scott, J. R., Williams, A., & Fraser, H. (1992). Ultrastructural features of spongiform encephalopathy transmitted to mice from three species of bovidae. *Acta Neuropathol*, *84*(5), 559-569. <https://doi.org/10.1007/BF00304476>
- Jones, E. M., & Surewicz, W. K. (2005). Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids. *Cell*, *121*(1), 63-72. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.034
- Kanata, E., Golanska, E., Villar-Pique, A., Karsanidou, A., Dafou, D., Xanthopoulos, K., Schmitz, M., Ferrer, I., Karch, A., Sikorska, B., Liberski, P. P., Sklaviadis, T., Zerr, I., & Llorens, F. (2019). Cerebrospinal fluid neurofilament light in suspected sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Clin Neurosci*, *60*, 124-127. doi: 10.1016/j.jocn.2018.09.031
- Karapetyan, Y. E., Sferrazza, G. F., Zhou, M., Ottenberg, G., Spicer, T., Chase, P., Fallahi, M., Hodder, P., Weissmann, C., & Lasmezas, C. I. (2013). Unique drug screening approach for prion diseases identifies tacrolimus and astemizole as anti-prion agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(17), 7044-7049. doi: 10.1073/pnas.1303510110
- Katorcha, E., Makarava, N., Savtchenko, R., D'Azzo, A., & Baskakov, I. V. (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*(9), e1004366. doi: 10.1371/journal.ppat.1004366
- Kercher, L., Favara, C., Striebel, J. F., LaCasse, R., & Chesebro, B. (2007). Prion protein expression differences in microglia and astroglia influence scrapie-induced neurodegeneration in the retina and brain of transgenic mice. *J Virol*, *81*(19), 10340-10351. doi: 10.1128/JVI.00865-07
- Khan, M. Q., Sweeting, B., Mulligan, V. K., Arslan, P. E., Cashman, N. R., Pai, E. F., & Chakrabarty, A. (2010). Prion disease susceptibility is affected by beta-structure folding propensity and local side-chain interactions in PrP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(46), 19808-19813. doi: 10.1073/pnas.1005267107
- Kim, B. H., Lee, H. G., Choi, J. K., Kim, J. I., Choi, E. K., Carp, R. I., & Kim, Y. S. (2004). The cellular prion protein (PrP^C) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondrial dysfunction induced by serum deprivation. *Brain Res Mol Brain Res*, *124*(1), 40-50. doi: 10.1016/j.molbrainres.2004.02.005

- Kimberlin, R. H. (1982). Scrapie agent: prions or virinos? *Nature*, *297*(5862), 107-108. doi: 10.1038/297107a0
- Kimberlin, R. H., Cole, S., & Walker, C. A. (1986). Transmissible mink encephalopathy (TME) in Chinese hamsters: identification of two strains of TME and comparisons with scrapie. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *12*(2), 197-206. doi: 10.1111/j.1365-2990.1986.tb00050.x
- Kimberlin, R. H., & Walker, C. A. (1986). Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly. *J Gen Virol*, *67* (Pt 2), 255-263. doi: 10.1099/0022-1317-67-2-255
- Kirkwood, J. K., & Cunningham, A. A. (1994). Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. *Vet Rec*, *135*(13), 296-303. doi: 10.1136/vr.135.13.296
- Klajnert, B., Cortijo-Arellano, M., Cladera, J., Majoral, J. P., Caminade, A. M., & Bryszewska, M. (2007). Influence of phosphorus dendrimers on the aggregation of the prion peptide PrP 185-208. *Biochem Biophys Res Commun*, *364*(1), 20-25. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.09.083
- Konold, T., Moore, S. J., Bellworthy, S. J., Terry, L. A., Thorne, L., Ramsay, A., Salguero, F. J., Simmons, M. M., & Simmons, H. A. (2013). Evidence of effective scrapie transmission via colostrum and milk in sheep. *BMC Vet Res*, *9*, 99. doi: 10.1186/1746-6148-9-99
- Krasnianski, A., Meissner, B., Heinemann, U., & Zerr, I. (2004). Clinical findings and diagnostic tests in Creutzfeldt-Jakob disease and variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Folia Neuropathol*, *42* Suppl B, 24-38.
- Kraus, A., Hoyt, F., Schwartz, C. L., Hansen, B., Hughson, A. G., Artikis, E., Race, B., & Caughey, B. (2021). High-resolution structure and strain comparison of infectious mammalian prions. *Mol Cell*. *4*;81(21):4540-4551.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2021.08.011.
- Kretschmar, H. A., Giese, A., Brown, D. R., Herms, J., Keller, B., Schmidt, B., & Groschup, M. (1997). Cell death in prion disease. *J Neural Transm Suppl*, *50*, 191-210. doi: 10.1007/978-3-7091-6842-4_19
- Kretschmar, H. A., Neumann, M., & Stavrou, D. (1995). Codon 178 mutation of the human prion protein gene in a German family (Backer family): sequencing data

- from 72-year-old celloidin-embedded brain tissue. *Acta Neuropathol*, *89*(1), 96-98. doi: 10.1007/BF00294264
- Kristiansen, M., Messenger, M. J., Klöhn, P.-C., Brandner, S., Wadsworth, J. D. F., Collinge, J., & Tabrizi, S. J. (2005). Disease-related Prion Protein Forms Aggregates in Neuronal Cells Leading to Caspase Activation and Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(46), 38851-38861. doi: 10.1074/jbc.M506600200
- Kroemer, G., & Jaattela, M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer*, *5*(11), 886-897. doi: 10.1038/nrc1738
- Kuwahara, C., Takeuchi, A. M., Nishimura, T., Haraguchi, K., Kubosaki, A., Matsumoto, Y., Saeki, K., Matsumoto, Y., Yokoyama, T., Itohara, S., & Onodera, T. (1999). Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature*, *400*(6741), 225-226. doi: 10.1038/22241
- Lacroux, C., Bougard, D., Litaïe, C., Simmons, H., Corbiere, F., Dernis, D., Tardivel, R., Morel, N., Simon, S., Lugan, S., Costes, P., Weisbecker, J. L., Schelcher, F., Grassi, J., Coste, J., & Andreatti, O. (2012). Impact of leucocyte depletion and prion reduction filters on TSE blood borne transmission. *PLoS One*, *7*(7), e42019. doi: 10.1371/journal.pone.0042019
- Ladogana, A., Puopolo, M., Croes, E. A., Budka, H., Jarius, C., Collins, S., Klug, G. M., Sutcliffe, T., Giulivi, A., Alperovitch, A., Delasnerie-Laupretre, N., Brandel, J. P., Poser, S., Kretzschmar, H., Rietveld, I., Mitrova, E., Cuesta Jde, P., Martinez-Martin, P., Glatzel, M., Aguzzi, A., Knight, R., Ward, H., Pocchiari, M., van Duijn, C. M., Will, R. G., & Zerr, I. (2005). Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology*, *64*(9), 1586-1591. doi: 10.1212/01.WNL.0000160117.56690.B2
- Larsen, K. E., & Sulzer, D. (2002). Autophagy in neurons: a review. *Histol Histopathol*, *17*(3), 897-908. doi: 10.14670/HH-17.897
- Le Dur, A., Lai, T. L., Stinnakre, M.-G., Laisné, A., Chenais, N., Rakotobe, S., Passet, B., Reine, F., Soulier, S., Herzog, L., Tilly, G., Rézaei, H., Béringue, V., Vilotte, J.-L., & Laude, H. (2017). Divergent prion strain evolution driven by PrPC expression level in transgenic mice. *Nature Communications*, *8*(1). doi: 10.1038/ncomms14170

- Leggett, M. M., Dukes, J., & Pirie, H. M. (1990). A spongiform encephalopathy in a cat. *Vet Rec*, *127*(24), 586-588.
- Legname, G., Baskakov, I. V., Nguyen, H. O., Riesner, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2004). Synthetic mammalian prions. *Science*, *305*(5684), 673-676. doi: 10.1126/science.1100195
- Legname, G., Nguyen, H.-O. B., Baskakov, I. V., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2005). Strain-specified characteristics of mouse synthetic prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(6), 2168-2173. doi: 10.1073/pnas.0409079102
- Liberski, P. P. (2012). Historical overview of prion diseases: a view from afar. *Folia Neuropathol*, *50*(1), 1-12.
- Liberski, P. P. (2019). Axonal changes in experimental prion diseases recapitulate those following constriction of postganglionic branches of the superior cervical ganglion: a comparison 40 years later. *Prion*, *13*(1), 83-93. doi: 10.1080/19336896.2019.1595315
- Liberski, P. P., Brown, D. R., Sikorska, B., Caughey, B., & Brown, P. (2008). Cell death and autophagy in prion diseases (transmissible spongiform encephalopathies). *Folia Neuropathol*, *46*(1), 1-25.
- Liberski, P. P., Sikorska, B., Bratosiewicz-Wasik, J., Gajdusek, D. C., & Brown, P. (2004). Neuronal cell death in transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases) revisited: from apoptosis to autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, *36*(12), 2473-2490. doi: 10.1016/j.biocel.2004.04.016
- Liberski, P. P., Sikorska, B., Hauw, J. J., Kopp, N., Streichenberger, N., Giraud, P., Boellaard, J., Budka, H., Kovacs, G. G., Ironside, J., & Brown, P. (2010). Ultrastructural characteristics (or evaluation) of Creutzfeldt-Jakob disease and other human transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases. *Ultrastruct Pathol*, *34*(6), 351-361. doi: 10.3109/01913123.2010.491175
- Liberski, P. P., Streichenberger, N., Giraud, P., Soutrenon, M., Meyronnet, D., Sikorska, B., & Kopp, N. (2005). Ultrastructural pathology of prion diseases revisited: brain biopsy studies. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *31*(1), 88-96. doi: 10.1111/j.1365-2990.2004.00595.x

- Liberski, P. P., Yanagihara, R., Gibbs, C. J., Jr., & Gajdusek, D. C. (1992). Neuronal autophagic vacuoles in experimental scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol*, *83*(2), 134-139. doi: 10.1007/BF00308472
- Ligos, C., Jeffrey, M., Ryder, S. J., Bellworthy, S. J., & Simmons, M. M. (2002). Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *J Comp Pathol*, *127*(1), 45-57. doi: 10.1053/jcpa.2002.0589
- Linsell, L., Cousens, S. N., Smith, P. G., Knight, R. S., Zeidler, M., Stewart, G., de Silva, R., Esmonde, T. F., Ward, H. J., & Will, R. G. (2004). A case-control study of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: analysis of clustering. *Neurology*, *63*(11), 2077-2083. doi: 10.1212/01.wnl.0000145844.53251.bc
- Llorens, F., Barrio, T., Correia, A., Villar-Pique, A., Thüne, K., Lange, P., Badiola, J. J., Schmitz, M., Lachmann, I., Bolea, R., & Zerr, I. (2018). Cerebrospinal Fluid Prion Disease Biomarkers in Pre-clinical and Clinical Naturally Occurring Scrapie. *Mol Neurobiol*, *55*(11), 8586-8591. doi: 10.1007/s12035-018-1014-z
- Llorens, F., Thüne, K., Sikorska, B., Schmitz, M., Tahir, W., Fernández-Borges, N., Cramm, M., Gotzmann, N., Carmona, M., Streichenberger, N., Michel, U., Zafar, S., Schuetz, A.-L., Rajput, A., Andréoletti, O., Bonn, S., Fischer, A., Liberski, P. P., Torres, J. M., Ferrer, I., & Zerr, I. (2017). Altered Ca²⁺ homeostasis induces Calpain-Cathepsin axis activation in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathologica Communications*, *5*(1). doi: 10.1186/s40478-017-0431-y
- Llorens, F., Thüne, K., Tahir, W., Kanata, E., Diaz-Lucena, D., Xanthopoulos, K., Kovatsi, E., Pleschka, C., Garcia-Esparcia, P., Schmitz, M., Ozbay, D., Correia, S., Correia, Â., Milosevic, I., Andréoletti, O., Fernández-Borges, N., Vorberg, I. M., Glatzel, M., Sklaviadis, T., Torres, J. M., Krasemann, S., Sánchez-Valle, R., Ferrer, I., & Zerr, I. (2017). YKL-40 in the brain and cerebrospinal fluid of neurodegenerative dementias. *Molecular Neurodegeneration*, *12*(1). doi: 10.1186/s13024-017-0226-4
- Locht, C., Chesebro, B., Race, R., & Keith, J. M. (1986). Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *83*(17), 6372-6376. doi: 10.1073/pnas.83.17.6372

- López-Pérez, Ó., Badiola, J. J., Bolea, R., Ferrer, I., Llorens, F., & Martín-Burriel, I. (2020). An Update on Autophagy in Prion Diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*. doi: 10.3389/fbioe.2020.00975
- Lyahyai, J., Bolea, R., Serrano, C., Monleón, E., Moreno, C., Osta, R., Zaragoza, P., Badiola, J. J., & Martín-Burriel, I. (2006). Correlation between Bax overexpression and prion deposition in medulla oblongata from natural scrapie without evidence of apoptosis. *Acta Neuropathologica*, *112*(4), 451-460. doi: 10.1007/s00401-006-0094-4
- Lyahyai, J., Bolea, R., Serrano, C., Vidal, E., Pumarola, M., Badiola, J. J., Zaragoza, P., & Martín-Burriel, I. (2007). Differential expression and protein distribution of Bax in natural scrapie. *Brain Research*, *1180*, 111-120. doi: 10.1016/j.brainres.2007.08.085
- Mabbott, N. A., & Bruce, M. E. (2001). The immunobiology of TSE diseases. *J Gen Virol*, *82*(Pt 10), 2307-2318. doi: 10.1099/0022-1317-82-10-2307
- Mabbott, N. A., & MacPherson, G. G. (2006). Prions and their lethal journey to the brain. *Nat Rev Microbiol*, *4*(3), 201-211. doi: 10.1038/nrmicro1346
- Mabbott, N. A., Watts, J. C., Giles, K., Patel, S., Oehler, A., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2014). Evidence That Bank Vole PrP Is a Universal Acceptor for Prions. *PLOS Pathogens*, *10*(4). doi: 10.1371/journal.ppat.1003990
- Majer, A., Medina, S. J., Niu, Y., Abrenica, B., Manguiat, K. J., Frost, K. L., Philipson, C. S., Sorensen, D. L., & Booth, S. A. (2012). Early mechanisms of pathobiology are revealed by transcriptional temporal dynamics in hippocampal CA1 neurons of prion infected mice. *PLoS Pathog*, *8*(11), e1003002. doi: 10.1371/journal.ppat.1003002
- Makarava, N., & Baskakov, I. V. (2013). The evolution of transmissible prions: the role of deformed templating. *PLoS Pathog*, *9*(12), e1003759. doi: 10.1371/journal.ppat.1003759
- Makarava, N., Kovacs, G. G., Bocharova, O., Savtchenko, R., Alexeeva, I., Budka, H., Rohwer, R. G., & Baskakov, I. V. (2010). Recombinant prion protein induces a new transmissible prion disease in wild-type animals. *Acta Neuropathologica*, *119*(2), 177-187. doi: 10.1007/s00401-009-0633-x

- Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klohn, P. C., Brandner, S., & Collinge, J. (2003). Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science*, *302*(5646), 871-874. doi: 10.1126/science.1090187
- Mallucci, G. R., White, M. D., Farmer, M., Dickinson, A., Khatun, H., Powell, A. D., Brandner, S., Jefferys, J. G., & Collinge, J. (2007). Targeting cellular prion protein reverses early cognitive deficits and neurophysiological dysfunction in prion-infected mice. *Neuron*, *53*(3), 325-335. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.005
- Manka, S. W., Zhang, W., Wenborn, A., Betts, J., Joiner, S., Saibil, H. R., Collinge, J., & Wadsworth, J. D. F. (2022). 2.7 A cryo-EM structure of ex vivo RML prion fibrils. *Nat Commun*, *13*(1), 4004. doi: 10.1038/s41467-022-30457-7
- Manson, J., West, J. D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M. H., & Hope, J. (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development*, *115*(1), 117-122. doi: 10.1242/dev.115.1.117
- Manson, J. C., Clarke, A. R., Hooper, M. L., Aitchison, L., McConnell, I., & Hope, J. (1994). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol*, *8*(2-3), 121-127. doi: 10.1007/BF02780662
- Margalith, I., Suter, C., Ballmer, B., Schwarz, P., Tiberi, C., Sonati, T., Falsig, J., Nystrom, S., Hammarstrom, P., Aslund, A., Nilsson, K. P., Yam, A., Whitters, E., Hornemann, S., & Aguzzi, A. (2012). Polythiophenes inhibit prion propagation by stabilizing prion protein (PrP) aggregates. *J Biol Chem*, *287*(23), 18872-18887. doi: 10.1074/jbc.M112.355958
- Marin-Moreno, A., Aguilar-Calvo, P., Espinosa, J. C., Zamora-Ceballos, M., Pitarch, J. L., Gonzalez, L., Fernandez-Borges, N., Orge, L., Andreoletti, O., Nonno, R., & Torres, J. M. (2021). Classical scrapie in small ruminants is caused by at least four different prion strains. *Vet Res*, *52*(1), 57. doi: 10.1186/s13567-021-00929-7
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., & Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(2), 81-94. doi: 10.1038/nrm3735
- Masters, C. L., Gajdusek, D. C., & Gibbs, C. J., Jr. (1981). Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Straussler syndrome with an analysis of the

- various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain*, *104*(3), 559-588. doi: 10.1093/brain/104.3.559
- Mays, C. E., & Soto, C. (2016). The stress of prion disease. *Brain Research*, *1648*, 553-560. doi: 10.1016/j.brainres.2016.04.009
- McBride, P. A., Bruce, M. E., & Fraser, H. (1988). Immunostaining of scrapie cerebral amyloid plaques with antisera raised to scrapie-associated fibrils (SAF). *Neuropathol Appl Neurobiol*, *14*(4), 325-336. doi: 10.1111/j.1365-2990.1988.tb00892.x
- Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M., & Iqbal, K. (1981). Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol*, *54*(1), 63-74. doi: 10.1007/BF00691333
- Miller, J. M., Jenny, A. L., Taylor, W. D., Marsh, R. F., Rubenstein, R., & Race, R. E. (1993). Immunohistochemical detection of prion protein in sheep with scrapie. *J Vet Diagn Invest*, *5*(3), 309-316. <https://doi.org/10.1177/104063879300500301>
- Mok, S. W., Riemer, C., Madela, K., Hsu, D. K., Liu, F. T., Gultner, S., Heise, I., & Baier, M. (2007). Role of galectin-3 in prion infections of the CNS. *Biochem Biophys Res Commun*, *359*(3), 672-678. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.05.163
- Monleon, E., Monzon, M., Hortells, P., Bolea, R., Acin, C., Vargas, F., & Badiola, J. J. (2005). Approaches to Scrapie diagnosis by applying immunohistochemistry and rapid tests on central nervous and lymphoreticular systems. *J Virol Methods*, *125*(2), 165-171. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.01.013
- Monleon, E., Monzon, M., Hortells, P., Vargas, A., & Badiola, J. J. (2003). Detection of PrP(sc) in samples presenting a very advanced degree of autolysis (BSE liquid state) by immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem*, *51*(1), 15-18. doi: 10.1177/002215540305100103
- Montag, J., Hitt, R., Opitz, L., Schulz-Schaeffer, W. J., Hunsmann, G., & Motzkus, D. (2009). Upregulation of miRNA hsa-miR-342-3p in experimental and idiopathic prion disease. *Mol Neurodegener*, *4*, 36. doi: 10.1186/1750-1326-4-36
- Moon, J. H., Lee, J. H., Nazim, U. M., Lee, Y. J., Seol, J. W., Eo, S. K., Lee, J. H., & Park, S. Y. (2016). Human prion protein-induced autophagy flux governs neuron cell damage in primary neuron cells. *Oncotarget*, *7*(21), 29989-30002. doi: 10.18632/oncotarget.8802

- Morales, R., Abid, K., & Soto, C. (2007). The prion strain phenomenon: molecular basis and unprecedented features. *Biochim Biophys Acta*, *1772*(6), 681-691. doi: 10.1016/j.bbadis.2006.12.006
- Moreno-Igoa, M., Calvo, A. C., Penas, C., Manzano, R., Oliván, S., Muñoz, M. J., Mancuso, R., Zaragoza, P., Aguilera, J., Navarro, X., & Osta Pinzolas, R. (2009). Fragment C of tetanus toxin, more than a carrier. Novel perspectives in non-viral ALS gene therapy. *Journal of Molecular Medicine*, *88*(3), 297-308. doi: 10.1007/s00109-009-0556-y
- Moreno, J. A., Halliday, M., Molloy, C., Radford, H., Verity, N., Axten, J. M., Ortori, C. A., Willis, A. E., Fischer, P. M., Barrett, D. A., & Mallucci, G. R. (2013). Oral treatment targeting the unfolded protein response prevents neurodegeneration and clinical disease in prion-infected mice. *Sci Transl Med*, *5*(206), 206ra138. doi: 10.1126/scitranslmed.3006767
- Moser, M., Colello, R. J., Pott, U., & Oesch, B. (1995). Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron*, *14*(3), 509-517. doi: 10.1016/0896-6273(95)90307-0
- Moudjou, M., Chapuis, J., Mekrouti, M., Reine, F., Herzog, L., Sibille, P., Laude, H., Vilette, D., Andreoletti, O., Rezaei, H., Dron, M., & Beringue, V. (2016). Glycoform-independent prion conversion by highly efficient, cell-based, protein misfolding cyclic amplification. *Sci Rep*, *6*, 29116. doi: 10.1038/srep29116
- Nassif, M., & Hetz, C. (2014). Targeting autophagy in ALS: A complex mission. *Autophagy*, *7*(4), 450-453. doi: 10.4161/auto.7.4.14700
- Niklaus, M., Adams, O., Berezowska, S., Zlobec, I., Graber, F., Slotta-Huspenina, J., Nitsche, U., Rosenberg, R., Tschan, M. P., & Langer, R. (2017). Expression analysis of LC3B and p62 indicates intact activated autophagy is associated with an unfavorable prognosis in colon cancer. *Oncotarget*, *8*(33), 54604-54615. doi: 10.18632/oncotarget.17554
- Nishida, N., Tremblay, P., Sugimoto, T., Shigematsu, K., Shirabe, S., Petromilli, C., Erpel, S. P., Nakaoke, R., Atarashi, R., Houtani, T., Torchia, M., Sakaguchi, S., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., & Katamine, S. (1999). A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest*, *79*(6), 689-697.

- Oesch, B., Teplow, D. B., Stahl, N., Serban, D., Hood, L. E., & Prusiner, S. B. (1990). Identification of cellular proteins binding to the scrapie prion protein. *Biochemistry*, *29*(24), 5848-5855. doi: 10.1021/bi00476a029
- OIE. (2008). *Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines* (4 ed.). París.
- Oishi, T., Hagiwara, K., Kinumi, T., Yamakawa, Y., Nishijima, M., Nakamura, K., & Arimoto, H. (2003). Effects of beta-sheet breaker peptide polymers on scrapie-infected mouse neuroblastoma cells and their affinities to prion protein fragment PrP(81-145). *Org Biomol Chem*, *1*(15), 2626-2629. doi: 10.1039/b306682g
- Olivan, S., Calvo, A. C., Rando, A., Herrando-Grabulosa, M., Manzano, R., Zaragoza, P., Tizzano, E. F., Aquilera, J., & Osta, R. (2016). Neuroprotective Effect of Non-viral Gene Therapy Treatment Based on Tetanus Toxin C-fragment in a Severe Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *9*. doi: 10.3389/fnmol.2016.00076
- Otero, A., Betancor, M., Erana, H., Fernandez Borges, N., Lucas, J. J., Badiola, J. J., Castilla, J., & Bolea, R. (2021). Prion-Associated Neurodegeneration Causes Both Endoplasmic Reticulum Stress and Proteasome Impairment in a Murine Model of Spontaneous Disease. *Int J Mol Sci*, *22*(1). doi: 10.3390/ijms22010465
- Otto, M., Wiltfang, J., Cepek, L., Neumann, M., Mollenhauer, B., Steinacker, P., Ciesielczyk, B., Schulz-Schaeffer, W., Kretzschmar, H. A., & Poser, S. (2002). Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*, *58*(2), 192-197. doi: 10.1212/wnl.58.2.192
- Outram, G. W., Dickinson, A. G., & Fraser, H. (1974). Reduced susceptibility to scrapie in mice after steroid administration. *Nature*, *249*(460), 855-856. doi: 10.1038/249855a0
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., & 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*(23), 10962-10966. doi: 10.1073/pnas.90.23.10962
- Parchi, P., Castellani, R., Capellari, S., Ghetti, B., Young, K., Chen, S. G., Farlow, M., Dickson, D. W., Sima, A. A., Trojanowski, J. Q., Petersen, R. B., & Gambetti, P. (1996). Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol*, *39*(6), 767-778. doi: 10.1002/ana.410390613

- Pattison, I. H., & Millson, G. C. (1961). Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J Comp Pathol*, *71*, 101-109. doi: 10.1016/s0368-1742(61)80013-1
- Peretz, D., Scott, M. R., Groth, D., Williamson, R. A., Burton, D. R., Cohen, F. E., & Prusiner, S. B. (2001). Strain-specified relative conformational stability of the scrapie prion protein. *Protein Sci*, *10*(4), 854-863. doi: 10.1110/ps.39201
- Peters, P. J., Mironov, A., Jr., Peretz, D., van Donselaar, E., Leclerc, E., Erpel, S., DeArmond, S. J., Burton, D. R., Williamson, R. A., Vey, M., & Prusiner, S. B. (2003). Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol*, *162*(4), 703-717. doi: 10.1083/jcb.200304140
- Pirisinu, L., Di Bari, M. A., D'Agostino, C., Marcon, S., Riccardi, G., Poleggi, A., Cohen, M. L., Appleby, B. S., Gambetti, P., Ghetti, B., Agrimi, U., & Nonno, R. (2016). Gerstmann-Straussler-Scheinker disease subtypes efficiently transmit in bank voles as genuine prion diseases. *Sci Rep*, *6*, 20443. doi: 10.1038/srep20443
- Piro, J. R., Harris, B. T., Nishina, K., Soto, C., Morales, R., Rees, J. R., & Supattapone, S. (2009). Prion protein glycosylation is not required for strain-specific neurotropism. *J Virol*, *83*(11), 5321-5328. doi: 10.1128/JVI.02502-08
- Polymenidou, M., Trusheim, H., Stallmach, L., Moos, R., Julius, C., Miele, G., Lenz-Bauer, C., & Aguzzi, A. (2008). Canine MDCK cell lines are refractory to infection with human and mouse prions. *Vaccine*, *26*(21), 2601-2614. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.03.035
- Porter, D. D., Porter, H. G., & Cox, N. A. (1973). Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice. *J Immunol*, *111*(5), 1407-1410.
- Poser, C. M. (2002). Notes on the history of the prion diseases. Part II. *Clin Neurol Neurosurg*, *104*(2), 77-86. doi: 10.1016/s0303-8467(01)00200-1
- Priola, S. A. (1999). Prion protein and species barriers in the transmissible spongiform encephalopathies. *Biomed Pharmacother*, *53*(1), 27-33. doi: 10.1016/s0753-3322(99)80057-2
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, *216*(4542), 136-144. doi: 10.1126/science.6801762
- Prusiner, S. B. (1989). Scrapie prions. *Annu Rev Microbiol*, *43*, 345-374. doi: 10.1146/annurev.mi.43.100189.002021

- Prusiner, S. B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science*, 252(5012), 1515-1522. doi: 10.1126/science.1675487
- Prusiner, S. B. (1998a). The prion diseases. *Brain Pathol*, 8(3), 499-513.
- Prusiner, S. B. (1998b). Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(23), 13363-13383. doi: 10.1073/pnas.95.23.13363
- Prusiner, S. B. (2001). Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med*, 344(20), 1516-1526. doi: 10.1056/NEJM200105173442006
- Prusiner, S. B., Bolton, D. C., Groth, D. F., Bowman, K. A., Cochran, S. P., & McKinley, M. P. (1982). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry*, 21(26), 6942-6950. doi: 10.1021/bi00269a050
- Prusiner, S. B., Groth, D. F., Cochran, S. P., McKinley, M. P., & Masiarz, F. R. (1980). Gel electrophoresis and glass permeation chromatography of the hamster scrapie agent after enzymatic digestion and detergent extraction. *Biochemistry*, 19(21), 4892-4898. doi: 10.1021/bi00562a029
- Prusiner, S. B., Groth, D. F., McKinley, M. P., Cochran, S. P., Bowman, K. A., & Kasper, K. C. (1981). Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(7), 4606-4610. doi: 10.1073/pnas.78.7.4606
- Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D., Carlson, G. A., & *et al.* (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, 63(4), 673-686. doi: 10.1016/0092-8674(90)90134-z
- Prusiner, S. B., & Scott, M. R. (1997). Genetics of prions. *Annu Rev Genet*, 31, 139-175. doi: 10.1146/annurev.genet.31.1.139
- Race, R., & Chesebro, B. (1998). Scrapie infectivity found in resistant species. *Nature*, 392(6678), 770. doi: 10.1038/33834
- Ravikumar, B., Berger, Z., Vacher, C., O'Kane, C. J., & Rubinsztein, D. C. (2006). Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis. *Hum Mol Genet*, 15(7), 1209-1216. doi: 10.1093/hmg/ddl036
- Represa, A., Deloulme, J. C., Sensenbrenner, M., Ben-Ari, Y., & Baudier, J. (1990). Neurogranin: immunocytochemical localization of a brain-specific protein kinase C substrate. *J Neurosci*, 10(12), 3782-3792.

- Requena, J. R., & Wille, H. (2014). The structure of the infectious prion protein: experimental data and molecular models. *Prion*, *8*(1), 60-66. doi: 10.4161/pri.28368
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R., & Wuthrich, K. (1997). NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett*, *413*(2), 282-288. doi: 10.1016/s0014-5793(97)00920-4
- Roettger, Y., Zerr, I., Dodel, R., & Bach, J. P. (2013). Prion peptide uptake in microglial cells--the effect of naturally occurring autoantibodies against prion protein. *PLoS One*, *8*(6), e67743. doi: 10.1371/journal.pone.0067743
- Roucou, X., Gains, M., & LeBlanc, A. C. (2004). Neuroprotective functions of prion protein. *J Neurosci Res*, *75*(2), 153-161. doi: 10.1002/jnr.10864
- Rubinsztein, D. C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, *443*(7113), 780-786. doi: 10.1038/nature05291
- Ryder, S. J., Spencer, Y. I., Bellerby, P. J., & March, S. A. (2001). Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. *Vet Rec*, *148*(1), 7-13. doi: 10.1136/vr.148.1.7
- Saá, P., Castilla, J., & Soto, C. (2006). Ultra-efficient Replication of Infectious Prions by Automated Protein Misfolding Cyclic Amplification. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(46), 35245-35252. doi: 10.1074/jbc.M603964200
- Saba, R., Goodman, C. D., Huzarewich, R. L., Robertson, C., & Booth, S. A. (2008). A miRNA signature of prion induced neurodegeneration. *PLoS One*, *3*(11), e3652. doi: 10.1371/journal.pone.0003652
- Saba, R., Gushue, S., Huzarewich, R. L., Manguiat, K., Medina, S., Robertson, C., & Booth, S. A. (2012). MicroRNA 146a (miR-146a) is over-expressed during prion disease and modulates the innate immune response and the microglial activation state. *PLoS One*, *7*(2), e30832. doi: 10.1371/journal.pone.0030832
- Safar, J. G. (2012). Molecular pathogenesis of sporadic prion diseases in man. *Prion*, *6*(2), 108-115. doi: 10.4161/pri.18666
- Safar, J. G., DeArmond, S. J., Kociuba, K., Deering, C., Didorenko, S., Bouzamondo-Bernstein, E., Prusiner, S. B., & Tremblay, P. (2005). Prion clearance in bigenic mice. *J Gen Virol*, *86*(Pt 10), 2913-2923. doi: 10.1099/vir.0.80947-0

- Sailer, A. (1994). No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell*, *77*(7), 967-968. doi: 10.1016/0092-8674(94)90436-7
- Sakaguchi, S., Ishibashi, D., & Matsuda, H. (2009). Antibody-based immunotherapeutic attempts in experimental animal models of prion diseases. *Expert Opin Ther Pat*, *19*(7), 907-917. doi: 10.1517/13543770902988530
- Sarkar, S., Davies, J. E., Huang, Z., Tunnacliffe, A., & Rubinsztein, D. C. (2007). Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem*, *282*(8), 5641-5652. doi: 10.1074/jbc.M609532200
- Schroder, M., & Kaufman, R. J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*, *74*, 739-789. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134
- Schwarz, A., Kratke, O., Burwinkel, M., Riemer, C., Schultz, J., Henklein, P., Bamme, T., & Baier, M. (2003). Immunisation with a synthetic prion protein-derived peptide prolongs survival times of mice orally exposed to the scrapie agent. *Neurosci Lett*, *350*(3), 187-189. doi: 10.1016/s0304-3940(03)00907-8
- Scott, M., Foster, D., Miranda, C., Serban, D., Coufal, F., Walchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S. J., Westaway, D., & Prusiner, S. B. (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell*, *59*(5), 847-857. doi: 10.1016/0092-8674(89)90608-9
- Scott, M., Groth, D., Foster, D., Torchia, M., Yang, S. L., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1993). Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell*, *73*(5), 979-988. doi: 10.1016/0092-8674(93)90275-u
- Seo, H., Sonntag, K. C., Kim, W., Cattaneo, E., & Isacson, O. (2007). Proteasome activator enhances survival of Huntington's disease neuronal model cells. *PLoS One*, *2*(2), e238. doi: 10.1371/journal.pone.0000238
- Serrano, C., Lyahyai, J., Bolea, R., Varona, L., Monleón, E., Badiola, J. J., Zaragoza, P., & Martín-Burriel, I. (2009). Distinct spatial activation of intrinsic and extrinsic apoptosis pathways in natural scrapie: association with prion-related lesions. *Veterinary Research*, *40*(5). doi: 10.1051/vetres/2009024

- Shin, H.-Y., Oh, J.-M., & Kim, Y.-S. (2013). The Functional Role of Prion Protein (PrPC) on Autophagy. *Pathogens*, *2*(3), 436-445. doi: 10.3390/pathogens2030436
- Sigurdson, C. J., & Miller, M. W. (2003). Other animal prion diseases. *Br Med Bull*, *66*, 199-212. doi: 10.1093/bmb/66.1.199
- Sigurdson, C. J., Nilsson, K. P., Hornemann, S., Heikenwalder, M., Manco, G., Schwarz, P., Ott, D., Rulicke, T., Liberski, P. P., Julius, C., Falsig, J., Stitz, L., Wuthrich, K., & Aguzzi, A. (2009). De novo generation of a transmissible spongiform encephalopathy by mouse transgenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(1), 304-309. doi: 10.1073/pnas.0810680105
- Sigurdsson, E. M., Brown, D. R., Daniels, M., Kascsak, R. J., Kascsak, R., Carp, R., Meeker, H. C., Frangione, B., & Wisniewski, T. (2002). Immunization delays the onset of prion disease in mice. *Am J Pathol*, *161*(1), 13-17. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64151-X
- Silveira, J. R., Raymond, G. J., Hughson, A. G., Race, R. E., Sim, V. L., Hayes, S. F., & Caughey, B. (2005). The most infectious prion protein particles. *Nature*, *437*(7056), 257-261. doi: 10.1038/nature03989
- Siso, S., Gonzalez, L., & Jeffrey, M. (2010). Neuroinvasion in prion diseases: the roles of ascending neural infection and blood dissemination. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, *2010*, 747892. doi: 10.1155/2010/747892
- Siso, S., Jeffrey, M., & Gonzalez, L. (2009). Neuroinvasion in sheep transmissible spongiform encephalopathies: the role of the haematogenous route. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *35*(3), 232-246. doi: 10.1111/j.1365-2990.2008.00978.x
- Sisó, S., Puig, B., Varea, R., Vidal, E., Acín, C., Prinz, M., Montrasio, F., Badiola, J., Aguzzi, A., Pumarola, M., & Ferrer, I. (2002). Abnormal synaptic protein expression and cell death in murine scrapie. *Acta Neuropathologica*, *103*(6), 615-626. doi: 10.1007/s00401-001-0512-6
- Smirnovas, V., Baron, G. S., Offerdahl, D. K., Raymond, G. J., Caughey, B., & Surewicz, W. K. (2011). Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deuterium exchange. *Nat Struct Mol Biol*, *18*(4), 504-506. doi: 10.1038/nsmb.2035

- Snow, A. D., Kisilevsky, R., Willmer, J., Prusiner, S. B., & DeArmond, S. J. (1989). Sulfated glycosaminoglycans in amyloid plaques of prion diseases. *Acta Neuropathol*, 77(4), 337-342. doi: 10.1007/BF00687367
- Somerville, R. A., Birkett, C. R., Farquhar, C. F., Hunter, N., Goldmann, W., Dornan, J., Grover, D., Hennion, R. M., Percy, C., Foster, J., & Jeffrey, M. (1997). Immunodetection of PrPSc in spleens of some scrapie-infected sheep but not BSE-infected cows. *J Gen Virol*, 78 (Pt 9), 2389-2396. doi: 10.1099/0022-1317-78-9-2389
- Sonati, T., Reimann, R. R., Falsig, J., Baral, P. K., O'Connor, T., Hornemann, S., Yaganoglu, S., Li, B., Herrmann, U. S., Wieland, B., Swayampakula, M., Rahman, M. H., Das, D., Kav, N., Riek, R., Liberski, P. P., James, M. N., & Aguzzi, A. (2013). The toxicity of antiprion antibodies is mediated by the flexible tail of the prion protein. *Nature*, 501(7465), 102-106. doi: 10.1038/nature12402
- Soto, C. (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 4(1), 49-60. doi: 10.1038/nrn1007
- Soto, C., & Castilla, J. (2004). The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. *Nat Med*, 10 Suppl, S63-67. doi: 10.1038/nm1069
- Soto, C., Kacscsak, R. J., Saborio, G. P., Aucouturier, P., Wisniewski, T., Prelli, F., Kacscsak, R., Mendez, E., Harris, D. A., Ironside, J., Tagliavini, F., Carp, R. I., & Frangione, B. (2000). Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides. *Lancet*, 355(9199), 192-197. doi: 10.1016/s0140-6736(99)11419-3
- Soto, C., Saborio, G. P., & Anderes, L. (2002). Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends Neurosci*, 25(8), 390-394. doi: 10.1016/s0166-2236(02)02195-1
- Soto, C., & Satani, N. (2011). The intricate mechanisms of neurodegeneration in prion diseases. *Trends Mol Med*, 17(1), 14-24 doi: 10.1016/j.molmed.2010.09.001
- Spagnolli, G., Rigoli, M., Orioli, S., Sevillano, A. M., Faccioli, P., Wille, H., Biasini, E., & Requena, J. R. (2019). Full atomistic model of prion structure and conversion. *PLoS Pathog*, 15(7), e1007864. doi: 10.1371/journal.ppat.1007864
- Sparkes, R. S., Simon, M., Cohn, V. H., Fournier, R. E., Lem, J., Klisak, I., Heinzmann, C., Blatt, C., Lucero, M., Mohandas, T., & *et al.* (1986). Assignment of the human and

- mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *83*(19), 7358-7362. doi: 10.1073/pnas.83.19.7358
- Spiropoulos, J., Casalone, C., Caramelli, M., & Simmons, M. M. (2007). Immunohistochemistry for PrP^{Sc} in natural scrapie reveals patterns which are associated with the PrP genotype. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *33*(4), 398-409. doi: 10.1111/j.1365-2990.2007.00800.x
- Spiropoulos, J., Lockey, R., Sallis, R. E., Terry, L. A., Thorne, L., Holder, T. M., Beck, K. E., & Simmons, M. M. (2011). Isolation of prion with BSE properties from farmed goat. *Emerg Infect Dis*, *17*(12), 2253-2261. doi: 10.3201/eid1712.110333
- Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K., & Prusiner, S. B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*, *51*(2), 229-240. doi: 10.1016/0092-8674(87)90150-4
- Steinacker, P., Blennow, K., Halbgebauer, S., Shi, S., Ruf, V., Oeckl, P., Giese, A., Kuhle, J., Slivarichova, D., Zetterberg, H., & Otto, M. (2016). Neurofilaments in blood and CSF for diagnosis and prediction of onset in Creutzfeldt-Jakob disease. *Sci Rep*, *6*, 38737. doi: 10.1038/srep38737
- Supattapone, S., Bosque, P., Muramoto, T., Wille, H., Aagaard, C., Peretz, D., Nguyen, H. O., Heinrich, C., Torchia, M., Safar, J., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., & Scott, M. (1999). Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell*, *96*(6), 869-878. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80596-6
- Supattapone, S., Nguyen, H. O., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., & Scott, M. R. (1999). Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(25), 14529-14534. doi: 10.1073/pnas.96.25.14529
- Suzuki, H., Tabata, K., Morita, E., Kawasaki, M., Kato, R., Dobson, R. C., Yoshimori, T., & Wakatsuki, S. (2014). Structural basis of the autophagy-related LC3/Atg13 LIR complex: recognition and interaction mechanism. *Structure*, *22*(1), 47-58. doi: 10.1016/j.str.2013.09.023
- Tanida, I. (2011). Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal*, *14*(11), 2201-2214. doi: 10.1089/ars.2010.3482
- Telling, G. C., Parchi, P., DeArmond, S. J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P., & Prusiner, S. B. (1996). Evidence for

- the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science*, 274(5295), 2079-2082. doi: 10.1126/science.274.5295.2079
- Thackray, A. M., Lockey, R., Beck, K. E., Spiropoulos, J., & Bujdoso, R. (2012). Evidence for co-infection of ovine prion strains in classical scrapie isolates. *J Comp Pathol*, 147(2-3), 316-329. doi: 10.1016/j.jcpa.2012.01.009
- Thellung, S., Scoti, B., Corsaro, A., Villa, V., Nizzari, M., Gagliani, M. C., Porcile, C., Russo, C., Pagano, A., Tacchetti, C., Cortese, K., & Florio, T. (2018). Pharmacological activation of autophagy favors the clearing of intracellular aggregates of misfolded prion protein peptide to prevent neuronal death. *Cell Death Dis*, 9(2), 166. doi: 10.1038/s41419-017-0252-8
- Thompson, A. G. B., & Mead, S. H. (2019). Review: Fluid biomarkers in the human prion diseases. *Mol Cell Neurosci*, 97, 81-92. doi: 10.1016/j.mcn.2018.12.003
- Thorne, L., Holder, T., Ramsay, A., Edwards, J., Taema, M. M., Windl, O., Maddison, B. C., Gough, K. C., & Terry, L. A. (2012). In vitro amplification of ovine prions from scrapie-infected sheep from Great Britain reveals distinct patterns of propagation. *BMC Veterinary Research*, 8(1). doi: 10.1186/1746-6148-8-223
- Tixador, P., Herzog, L., Reine, F., Jaumain, E., Chapuis, J., Le Dur, A., Laude, H., & Beringue, V. (2010). The physical relationship between infectivity and prion protein aggregates is strain-dependent. *PLoS Pathog*, 6(4), e1000859. doi: 10.1371/journal.ppat.1000859
- Tobler, I., Gaus, S. E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P. A., & Manson, J. C. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*, 380(6575), 639-642. doi: 10.1038/380639a0
- Torres, J. M., Espinosa, J. C., Aguilar-Calvo, P., Herva, M. E., Relano-Gines, A., Villa-Diaz, A., Morales, M., Parra, B., Alamillo, E., Brun, A., Castilla, J., Molina, S., Hawkins, S. A., & Andreoletti, O. (2014). Elements modulating the prion species barrier and its passage consequences. *PLoS One*, 9(3), e89722. doi: 10.1371/journal.pone.0089722
- Trevitt, C. R. (2006). A systematic review of prion therapeutics in experimental models. *Brain*, 129(9), 2241-2265. doi: 10.1093/brain/awl150

- Turk, E., Teplow, D. B., Hood, L. E., & Prusiner, S. B. (1988). Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur J Biochem*, *176*(1), 21-30. doi: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb14246.x
- Tuzi, N. L., Cancellotti, E., Baybutt, H., Blackford, L., Bradford, B., Plinston, C., Coghill, A., Hart, P., Piccardo, P., Barron, R. M., & Manson, J. C. (2008). Host PrP glycosylation: a major factor determining the outcome of prion infection. *PLoS Biol*, *6*(4), e100. doi: 10.1371/journal.pbio.0060100
- van Eijk, J. J., van Everbroeck, B., Abdo, W. F., Kremer, B. P., & Verbeek, M. M. (2010). CSF neurofilament proteins levels are elevated in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Alzheimers Dis*, *21*(2), 569-576. doi: 10.3233/JAD-2010-090649
- van Keulen, L. J., Vromans, M. E., & van Zijderveld, F. G. (2002). Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS*, *110*(1), 23-32. doi: 10.1034/j.1600-0463.2002.100104.x
- Vargas, F., Lujan, L., Bolea, R., Monleon, E., Martin-Burriel, I., Fernandez, A., De Blas, I., & Badiola, J. J. (2006). Detection and clinical evolution of scrapie in sheep by 3rd eyelid biopsy. *J Vet Intern Med*, *20*(1), 187-193. doi: 10.1892/0891-6640(2006)20[187:daceos]2.0.co;2
- Vazquez-Fernandez, E., Vos, M. R., Afanasyev, P., Cebey, L., Sevillano, A. M., Vidal, E., Rosa, I., Renault, L., Ramos, A., Peters, P. J., Fernandez, J. J., van Heel, M., Young, H. S., Requena, J. R., & Wille, H. (2016). The Structural Architecture of an Infectious Mammalian Prion Using Electron Cryomicroscopy. *PLoS Pathog*, *12*(9), e1005835. doi: 10.1371/journal.ppat.1005835
- Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S. J., Smart, E. J., Anderson, R. G., Taraboulos, A., & Prusiner, S. B. (1996). Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(25), 14945-14949. doi: 10.1073/pnas.93.25.14945
- Wang, F., Wang, X., Yuan, C. G., & Ma, J. (2010). Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science*, *327*(5969), 1132-1135. doi: 10.1126/science.1183748
- Watts, J. C., Giles, K., Patel, S., Oehler, A., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2014). Evidence that bank vole PrP is a universal acceptor for prions. *PLoS Pathog*, *10*(4), e1003990. doi: 10.1371/journal.ppat.1003990

- Watts, J. C., Giles, K., Stohr, J., Oehler, A., Bhardwaj, S., Grillo, S. K., Patel, S., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (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*(9), 3498-3503. doi: 10.1073/pnas.1121556109
- Weissmann, C., Bueller, H., Fischer, M., Sailer, A., Aguzzi, A., & Aguet, M. (1994). PrP-deficient mice are resistant to scrapie. *Ann N Y Acad Sci*, *724*, 235-240. doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb38913.x
- Wells, G. A., Hancock, R. D., Cooley, W. A., Richards, M. S., Higgins, R. J., & David, G. P. (1989). Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata. *Vet Rec*, *125*(21), 521-524. doi: 10.1136/vr.125.21.521
- Wells, G. A., & McGill, I. S. (1992). Recently described scrapie-like encephalopathies of animals: case definitions. *Res Vet Sci*, *53*(1), 1-10. doi: 10.1016/0034-5288(92)90076-e
- Wells, G. A., Scott, A. C., Johnson, C. T., Gunning, R. F., Hancock, R. D., Jeffrey, M., Dawson, M., & Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec*, *121*(18), 419-420. doi: 10.1136/vr.121.18.419
- Westaway, D., Cooper, C., Turner, S., Da Costa, M., Carlson, G. A., & Prusiner, S. B. (1994). Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(14), 6418-6422. doi: 10.1073/pnas.91.14.6418
- Westaway, D., Goodman, P. A., Mirenda, C. A., McKinley, M. P., Carlson, G. A., & Prusiner, S. B. (1987). Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell*, *51*(4), 651-662. doi: 10.1016/0092-8674(87)90134-6
- Westaway, D., Mirenda, C. A., Foster, D., Zebardjian, Y., Scott, M., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, H., DeArmond, S. J., Ebeling, C., & *et al.* (1991). Paradoxical shortening of scrapie incubation times by expression of prion protein transgenes derived from long incubation period mice. *Neuron*, *7*(1), 59-68. doi: 10.1016/0896-6273(91)90074-a
- Westaway, D., Wang, F., Wang, X., Orrú, C. D., Groveman, B. R., Surewicz, K., Abskharon, R., Imamura, M., Yokoyama, T., Kim, Y.-S., Vander Stel, K. J., Sinniah, K., Priola, S. A., Surewicz, W. K., Caughey, B., & Ma, J. (2017). Self-propagating, protease-

- resistant, recombinant prion protein conformers with or without in vivo pathogenicity. *PLOS Pathogens*, *13*(7). doi: 10.1371/journal.ppat.1006491
- White, A. R., Enever, P., Tayebi, M., Mushens, R., Linehan, J., Brandner, S., Anstee, D., Collinge, J., & Hawke, S. (2003). Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature*, *422*(6927), 80-83. doi: 10.1038/nature01457
- Wilesmith, J. W., Wells, G. A., Cranwell, M. P., & Ryan, J. B. (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec*, *123*(25), 638-644.
- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., & Smith, P. G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, *347*(9006), 921-925. doi: 10.1016/s0140-6736(96)91412-9
- Williams, A., Lucassen, P. J., Ritchie, D., & Bruce, M. (1997). PrP Deposition, Microglial Activation, and Neuronal Apoptosis in Murine Scrapie. *Experimental Neurology*, *144*(2), 433-438. doi: 10.1006/exnr.1997.6424
- Williams, E. S., & Young, S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis*, *16*(1), 89-98. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-16.1.89>
- Wilson, D. R., Anderson, R. D., & Smith, W. (1950). Studies in scrapie. *J Comp Pathol*, *60*(4), 267-282. doi: 10.1016/s0368-1742(50)80025-5
- Wiseman, F. K., Cancellotti, E., Piccardo, P., Iremonger, K., Boyle, A., Brown, D., Ironside, J. W., Manson, J. C., & Diack, A. B. (2015). The glycosylation status of PrPC is a key factor in determining transmissible spongiform encephalopathy transmission between species. *J Virol*, *89*, 4738-4747. doi: 10.1128/JVI.02296-14
- Wood, J. L., McGill, I. S., Done, S. H., & Bradley, R. (1997). Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *Vet Rec*, *140*(7), 167-174. doi: 10.1136/vr.140.7.167
- Xu, Y., Tian, C., Wang, S.-B., Xie, W.-L., Guo, Y., Zhang, J., Shi, Q., Chen, C., & Dong, X.-P. (2014). Activation of the macroautophagic system in scrapie-infected experimental animals and human genetic prion diseases. *Autophagy*, *8*(11), 1604-1620. doi: 10.4161/auto.21482

- Yao, H., Zhao, D., Khan, S. H., & Yang, L. (2013). Role of autophagy in prion protein-induced neurodegenerative diseases. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *45*(6), 494-502. doi: 10.1093/abbs/gmt022
- Yuan, A., Rao, M. V., Veeranna, & Nixon, R. A. (2017). Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *9*(4). doi: 10.1101/cshperspect.a018309
- Yuan, J., Xiao, X., McGeehan, J., Dong, Z., Cali, I., Fujioka, H., Kong, Q., Kneale, G., Gambetti, P., & Zou, W. Q. (2006). Insoluble aggregates and protease-resistant conformers of prion protein in uninfected human brains. *J Biol Chem*, *281*(46), 34848-34858. doi: 10.1074/jbc.M602238200
- Yun, S. W., Ertmer, A., Flechsig, E., Gilch, S., Riederer, P., Gerlach, M., Schatzl, H. M., & Klein, M. A. (2007). The tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate delays prion neuroinvasion by inhibiting prion propagation in the periphery. *J Neurovirol*, *13*(4), 328-337. doi: 10.1080/13550280701361516
- Zahn, R. (2003). The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site. *J Mol Biol*, *334*(3), 477-488. doi: 10.1016/j.jmb.2003.09.048
- Zetterberg, H., Bozzetta, E., Favole, A., Corona, C., Cavarretta, M. C., Ingravalle, F., Blennow, K., Pocchiari, M., & Meloni, D. (2019). Neurofilaments in blood is a new promising preclinical biomarker for the screening of natural scrapie in sheep. *PLoS One*, *14*(12), e0226697. doi: 10.1371/journal.pone.0226697
- Zlotnik, I., & Rennie, J. C. (1963). Further observations on the experimental transmission of scrapie from sheep and goats to laboratory mice. *J Comp Pathol*, *73*, 150-162. doi: 10.1016/s0368-1742(63)80018-1
- Zlotnik, I., & Rennie, J. C. (1965). Experimental Transmission of Mouse Passaged Scrapie to Goats, Sheep, Rats and Hamsters. *J Comp Pathol*, *75*, 147-157. doi: 10.1016/0021-9975(65)90005-8
- Zomosa-Signoret, V., Arnaud, J. D., Fontes, P., Alvarez-Martinez, M. T., & Liautard, J. P. (2008). Physiological role of the cellular prion protein. *Vet Res*, *39*(4), 9. doi: 10.1051/vetres:2007048