

Óscar López Pérez

Autofagia y biomarcadores en las enfermedades priónicas

Departamento
Farmacología y Fisiología

Director/es
Bolea Bailo, Rosa
Martín Burriel, Inmaculada

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



© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**AUTOFAGIA Y BIOMARCADORES EN LAS
ENFERMEDADES PRIÓNICAS**

Autor

Óscar López Pérez

Director/es

Bolea Bailo, Rosa
Martín Burriel, Inmaculada

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Farmacología y Fisiología

2018



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

Autofagia y biomarcadores en las
enfermedades priónicas

Autor

Óscar López Pérez

Director/es

Rosa María Bolea Bailo
Inmaculada Martín Burriel

Facultad de Veterinaria
2018



Universidad
Zaragoza

Laboratorio de Genética Bioquímica

Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal

Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes

Facultad de Veterinaria

AUTOFAGIA Y BIOMARCADORES EN LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS

Memoria de tesis presentada por el licenciado

Óscar López Pérez

Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Directoras:

Dra. Rosa María Bolea Bailo

Dra. Inmaculada Martín Burriel

Zaragoza, octubre 2018



LAGENBIO
Laboratorio de
Genética Bioquímica
Universidad Zaragoza



Centro de
Encefalopatías y Enfermedades
Transmisibles Emergentes
Universidad Zaragoza

Dña. **ROSA MARÍA BOLEA BAILO**, Profesora Titular del Departamento de Patología Animal, y Dña. **INMACULADA MARTÍN BURRIEL**, Profesora Titular del Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza,

INFORMAN:

Que D. Óscar López Pérez ha realizado, bajo nuestra dirección, los trabajos correspondientes a su Tesis Doctoral titulada “**AUTOFAGIA Y BIOMARCADORES EN LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS**” que se 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 Doctor por la Universidad de Zaragoza, por lo que autorizamos su presentación para que pueda ser juzgado por el Tribunal correspondiente.

En Zaragoza, octubre de 2018.

Fdo: Rosa María Bolea Bailo

Fdo: Inmaculada Martín Burriel

Este trabajo ha sido posible realizarlo gracias a un contrato predoctoral del Gobierno de Aragón (C012/2014), cofinanciado por el Fondo Social Europeo, y gracias a la Universidad de Zaragoza, que ha aportado las instalaciones y a la cual pertenecen las Directoras 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 de Cooperación Transpirenaica en Seguridad de los Alimentos de Origen Ovino y Caprino (ConCOTSA EFA 205/11), Proyecto de Consolidación de la Cooperación Transpirenaica en materia de Seguridad Alimentaria EFA 282/13 (Transprion) y Red de Investigación Transfronteriza en Enfermedades Priónicas Humanas y Animales EFA 148/16 (Redprion).
- Proyecto AGL2015-65560-R: Implicación de la glicosilación en la Transmisión de las Enfermedades Priónicas, Biomarcadores Moleculares y Papel de las Neurotrofinas en la Neurodegeneración, del Ministerio de Economía y Competitividad.
- Proyecto AGL2015-67945-P: Biomarcadores Epigenéticos en Enfermedades Priónicas.



LAGENBIO
Laboratorio de
Genética Bioquímica
Universidad Zaragoza



Centro de
Encefalopatías y Enfermedades
Transmisibles Emergentes
Universidad Zaragoza

Dña. **ROSA MARÍA BOLEA BAILO**, Profesora Titular del Departamento de Patología Animal, y Dña. **INMACULADA MARTÍN BURRIEL**, Profesora Titular del Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza,

INFORMAN:

Que D. Óscar López Pérez, bajo nuestra dirección, presenta el trabajo correspondiente a su Tesis Doctoral titulada “**AUTOFAGIA Y BIOMARCADORES EN LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS**” para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza con Mención Internacional. Cumpliendo con la legislación vigente, este trabajo incluye dos informes de los siguientes expertos doctores pertenecientes a instituciones extranjeras:

Dr. Olivier Andréoletti, Investigador Principal de la Unité Mixte de Recherche, Institut National de la Recherche Agronomique / École Nationale Vétérinaire de Toulouse (UMR INRA/ENVT), 1225 Interactions Hôtes – Agents Pathogènes, 23 Chemin des Capelles, 31076, Toulouse, Francia. Doctor por la Universidad de Paris Sud (XI) el 27/04/2004.

Dr. Jaber Lyahyai, Professeur Assistant en Génétique, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Departement of Medical Genetics, Université Mohammed V, Impasse Souissi, Rabat 10100, Rabat, Morocco. Doctor por la Universidad de Zaragoza el 21/06/2007.

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

Estancia desde el 30 de enero hasta el 30 de abril de 2017 (90 días) en la Unité Mixte de Recherche, Institut National de la Recherche Agronomique / École Nationale Vétérinaire de Toulouse (UMR INRA/ENVT), 1225 Interactions Hôtes – Agents Pathogènes, 23 Chemin des Capelles, 31076, Toulouse, Francia, bajo la supervisión del Dr. Olivier Andréoletti, en la que el estudiante de doctorado trabajó en la investigación del uso de técnicas de propagación *in vitro* de priones y su aplicabilidad a la detección del agente causal en fluidos biológicos de animales afectados con enfermedades priónicas. Por tanto, cumple los requisitos para optar al Título de Doctor con Mención Internacional.

En Zaragoza, octubre de 2018.

Fdo: Rosa María Bolea Bailo

Fdo: Inmaculada Martín Burriel

LISTA DE ABREVIATURAS

μl. Microlitro	g. Gramo	kg: Kilogramo
μg. Microgramo	h. Hora	ml. Mililitro
°C. Grado centígrado	min. Minuto	mM. Milimolar
s. Segundo	kDa. Kilodaltons	

α7nAChR. *Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor*; receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7

A

AMC. Autofagia mediada por chaperonas

AMPK. *AMP-activated protein kinase*

ATF6. *Activating transcription factor 6*

Atg. *Autophagy-related*

Aβ. β-amiloide

B

Bag-1. *Bcl-2-associated athanogene 1*

BAMBI. *BMP and activin membrane-bound inhibitor*

Bax. *Bcl-2 associated X*

Bg. *Basal ganglia*

Bgc. *Basal ganglia cortex*

BH3-only. *Bcl-2 homology-3*; dominio de homología con Bcl-2

BNIP3. *Bcl2-interacting protein 3*

BSE. *Bovine spongiform encephalopathy*

C

Cbl. *Cerebellum*

cDNA. *Complementary DNA*

CHGA. *Chromogranin A*; cromogranina A

CJD. *Creutzfeldt-Jakob disease*

CMM. Células madre mesenquimales

CMV. Cuerpos multivesiculares

CN. *Caudate nucleus*

CNS. *Central nervous system*

Cpne8. *Copine 8*

D

DAB. Diaminobenzidine

DAMP. *Danger-associated molecular pattern*

DLC1. *DLC1 Rho GTPase-activating protein*

Dpi. Days post-inoculation

DAPk. *Death-associated protein kinase*; quinasa asociada a la muerte celular

DCN. *Deep cerebellar nuclei*

Dm. Dorsomedial

Dpl. *Doppel*

Drpr. Draper

E

E2F1. *E2F transcription factor 1*; factor de transcripción E2F1

EA. Enfermedad de Alzheimer

ECC. Enfermedad crónica caquetizante de los cérvidos

ECJ. Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

ECM. *Extracellular matrix*

EEB. Encefalopatía espongiiforme bovina

eECJ. Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica

EEF. Encefalopatía espongiiforme felina

EET/EETs. Encefalopatía(s) espongiiforme(s) transmisible(s)

EH. Enfermedad de Huntington

eIF2 α . *Eukaryotic initiation factor 2 α* ; factor de iniciación eucariota 2 α

ELA. Esclerosis lateral amiotrófica

ELISA. *Enzyme-linked immunosorbent assay*; ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EP. Enfermedad de Parkinson

ERAD. *ER-associated protein degradation*; degradación proteica asociada al RE

Erk1/2. *Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2*; quinasas reguladas por señal extracelular 1 y 2

ESCRT. *Endosomal sorting complex required for transport*

ETV. Encefalopatía transmisible del visón

EVs. *Extracellular vesicles*

F

FBXW7. *F-box and WD repeat domain containing 7*

FE. Fosfatidiletanolamina

fECJ. Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar

Fc. *Frontal cortex*

FFI. *Fatal familial insomnia*

FN1. *Fibronectin 1*

G

GALT. *Galactose-1-phosphate uridylyltransferase*

GAS5. *Growth arrest-specific 5*

GFAP. *Glial fibrillary acidic protein*

Gl. *Granular layer*

Gm. *Grey matter*

GPI. *Glicosilfosfatidilinositol*

Grp. *Glucose-regulated protein*; proteína regulada por glucosa

GSS. Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker

H

Hc. *Hippocampus*

H-E. Hematoxylin and eosin

Hip. *Hsc70-interacting protein*

HMN. *Hypoglossal motor nucleus*

Hop. *Hsc70-hsp90 organizing protein*

Hsc. *Constitutive heat shock protein*; proteína de choque térmico constitutiva

Hsp. *Heat shock protein*; proteína de choque térmico

HSP90AA1. *Heat shock protein 90 alpha family class A member 1*

Ht. *Hypothalamus*

HTT. *Huntingtina*

I

Ic. *Internal capsule*

iECJ. Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica

IEF. *Insomnio esporádico fatal*

IFF. *Insomnio familiar fatal*

IHC/IHQ. *Immunohistochemistry*; inmunohistoquímica

IL11RA. *Interleukin 11 receptor subunit alpha*

IL1RN. *Interleukin-1 receptor antagonist*; receptor antagonista de la interleucina-1

IP₃R. *Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*; receptor de inositol 1,4,5-trifosfato

Ire-1. *Inositol-requiring enzyme 1*

ISEL. *In situ end labelling*

ITGA8. *Integrin subunit alpha 8*

J

JNK. *C-Jun N-terminal kinase*; quinasa N-terminal de c-Jun

L

LAMP-2a. *Lysosome-associated membrane protein type 2a*

LCN. *Lateral cuneate nucleus*

LCR. Líquido cefalorraquídeo

LIR. *LC3-interacting region*; región de interacción con LC3

LN. *Lateral nucleus*

LRRN4. *Leucine rich repeat neuronal 4*

LSM. *Laser scanning microscopy*

M

MAP1-LC3/LC3. *Microtubule-associated protein 1 light chain 3*

MCP. Muerte celular programada

MEC. Matriz extracelular

miRNAs. MicroRNAs

MI. *Molecular layer*

Mo. *Medulla oblongata*

N

NBT/BCIP. Nitro blue tetrazolium /5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate

NCCD. *The Nomenclature Committee on Cell Death*; Comité de Nomenclatura de la Muerte Celular

NDV. Núcleo motor dorsal del nervio vago

Nor98. Forma atípica del scrapie

NTN. *Nucleus of the trigeminal nerve spinal tract*

NVN. *Dorsal nucleus of the vagus nerve*

O

ON. *Olivary nucleus*

ORF. *Open reading frame*; marco de lectura abierto

P

P. *Pons*

PAPSS2. 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2

PAS. *Phagophore assembly site*; sitio de formación del fagoforo

PCR. *Polymerase chain reaction*; reacción en cadena de la polimerasa

Pdi. *Protein disulfide isomerase*; proteína disulfuro isomerasa

PERK. *Protein kinase (PKR)-like ER kinase*

PIRIBS. *Parallel in-register intermolecular beta-sheet*

PK. Proteínasa K

PKA. *Protein kinase A*; proteína quinasa A

Pl. *Purkinje layer*

PMCA. *Protein misfolding cyclic amplification*; amplificación cíclica de proteínas mal plegadas

PMP22. Proteína de la mielina periférica 22

polyQ. Poliglutamina

PPA. Proteína precursora de amiloide

PRND. *Doppel protein*

PRNP. *Prion protein gene*

PrP. Proteína prion

PrP^c. Proteína prion celular

PrP^{res}/PrP²⁷⁻³⁰. Proteína prion resistente a la digestión con proteasa

PrP^{Sc}. Proteína prion patológica

PtdIns. *Phosphatidylinositol*; fosfatidilinositol

PtdIns3K. *Phosphatidylinositol 3-kinase*; fosfatidilinositol 3-quinasa

PtdIns3P. *Phosphatidylinositol 3-phosphate*; fosfatidilinositol 3-fosfato

PVSPr. Prionopatía variable sensible a la proteasa

Q

qRT-PCR. Quantitative real-time PCR

QTL. *Quantitative trait loci*

R

RARB. *Retinoic acid receptor beta*; receptor de ácido retinoico beta

RE. Retículo endoplasmático

RESET. *Rapid ER stress-induced export*

RGS4. *Regulator of G protein signaling 4*

RT. Room temperature

S

SAF. *Scrapie-associated fibrils*; fibrillas asociadas al scrapie

SC. *Cervical spinal cord*; médula espinal cervical

sCJD. *Sporadic CJD*

SCRG1. *Scrapie responsive gene 1*

SLR. Sistema linforreticular

SN. *Septal nucleus*

SNARE. *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*

SNC. Sistema nervioso central

SNE. Sistema nervioso entérico

SNP. Sistema nervioso periférico

SQSTM1. *Sequestosome 1*

STMN2. *Stathmin 2*

T

T. *Thalamus*

TBS. *Tris-buffered saline*

TBST. *Tris buffered saline; 0.05% Tween 20*

Tc. *Thalamic cortex*

TGF- β . Transforming growth factor-beta

TOR/mTOR. (*Mammalian*) target of rapamycin; diana de la rapamicina

TORC1. Target of rapamycin complex 1; complejo 1 de la diana de rapamicina

TUNEL. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

TSEs. Transmissible Spongiform Encephalopathies

U

Ub. Ubiquitina

UBA. *Ubiquitin-associated*

Ubl. *Ubiquitin-like*

Tabla de aminoácidos

A: Alanina

H: Histidina

N: Asparagina

T: Treonina

C: Cisteína

I: Isoleucina

P: Prolina

V: Valina

E: Ácido glutámico

K: Lisina

Q: Glutamina

Y: Tirosina

F: Fenilalanina

L: Leucina

R: Arginina

W: Triptófano

G: Glicina

M: Metionina

S: Serina

UPR. *Unfolded protein response*; respuesta a proteínas desplegadas

UPS. *Ubiquitin-proteasome system*; sistema ubiquitina-proteasoma

V

vCJD. *Variant Creutzfeldt-Jakob disease*

vECJ. Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

Vm. Ventromedial

Vps. *Vacuolar protein sorting*

Vps/HOPS. *Homotypic fusion and vacuolar protein sorting-tethering complex*

W

Wm. *White matter*

ÍNDICE GENERAL

I. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	15
II.1. AUTOFAGIA.....	17
II.1.1. GENERALIDADES.....	17
II.1.2. TIPOS DE AUTOFAGIA.....	17
II.1.2.1. Autofagia mediada por chaperonas.....	18
II.1.2.2. Microautofagia.....	19
II.1.2.3. Macroautofagia.....	20
II.1.3. MECANISMOS MOLECULARES DE LA AUTOFAGIA.....	22
II.1.3.1. Inducción.....	23
II.1.3.2. Nucleación del fagoforo.....	27
II.1.3.3. Expansión del fagoforo y maduración en autofagosoma.....	28
II.1.3.4. Fusión con el lisosoma y degradación.....	30
II.1.4. PAPEL FISIOLÓGICO.....	31
II.1.4.1. Autofagia en el control de la calidad intracelular.....	32
<i>Autofagia y proteasoma.....</i>	<i>33</i>
<i>Autofagia y exosomas.....</i>	<i>35</i>
II.1.4.2. Autofagia en el desarrollo y diferenciación celular.....	38
II.1.4.3. Autofagia e inmunidad.....	39
II.1.4.4. Autofagia en la estabilidad del genoma.....	40
II.1.4.5. Autofagia en la longevidad.....	40
II.1.4.6. Autofagia en la muerte celular.....	40
II.1.5. PAPEL EN LA PATOLOGÍA: ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.....	43
II.1.5.1. Autofagia en la enfermedad de Alzheimer.....	46
II.1.5.2. Autofagia en la enfermedad de Parkinson.....	48
II.1.5.3. Autofagia en la enfermedad de Huntington.....	49
II.1.5.4. Papel de la autofagia en las enfermedades neurodegenerativas	50
II.2. ENFERMEDADES PRIÓNICAS.....	52
II.2.1. GENERALIDADES.....	52
II.2.2. AGENTE CAUSAL: EL PRION.....	54
II.2.2.1. La proteína prion celular: PrP ^c	55
II.2.2.2. La proteína prion patológica: PrP ^{Sc}	57
II.2.2.3. Tráfico celular de la PrP ^c y su conversión en PrP ^{Sc}	59
II.2.2.4. La naturaleza de las distintas cepas priónicas.....	60
II.2.3. SCRAPIE.....	61
II.2.3.1. Forma clásica y atípica.....	62
II.2.3.2. Susceptibilidad genética al scrapie.....	63
<i>El gen PRNP ovino.....</i>	<i>63</i>
<i>Influencia de otros genes.....</i>	<i>64</i>
II.2.3.3. Patogenia del scrapie.....	65
II.2.4. DIAGNÓSTICO.....	68
II.2.4.1. Técnicas laboratoriales de diagnóstico.....	68
<i>Examen histopatológico del SNC y detección inmunohistoquímica de la PrP^{Sc}.....</i>	<i>68</i>
<i>Técnicas de diagnóstico rápido.....</i>	<i>69</i>
<i>Detección de la PrP^{Sc} mediante Western Blot.....</i>	<i>70</i>
<i>Técnicas no convencionales de detección de priones.....</i>	<i>70</i>
<i>PMCA.....</i>	<i>70</i>

<i>Bioensayo</i>	71
II.2.4.2. Búsqueda de biomarcadores diagnósticos.....	71
II.2.5. NEUROTOXICIDAD Y ESTRÉS CELULAR EN LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS	75
II.2.5.1. PrP mal plegada en el RE.....	77
II.2.5.2. Mecanismos de degradación de proteínas.....	79
II.2.5.3. Homeostasis del calcio y chaperonas.....	81
II.2.5.4. Respuesta a proteínas desplegadas (UPR).....	81
II.2.5.5. Muerte neuronal y apoptosis.....	82
II.2.6. AUTOFAGIA EN LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS	84
II.2.6.1. Alteraciones de la autofagia en la enfermedad priónica.....	85
II.2.6.2. Función de la PrP ^c en la regulación de la autofagia.....	86
II.2.6.3. Autofagia en la degradación de la PrP ^{Sc}	86
II.2.6.4. Papel de la autofagia en las enfermedades priónicas.....	88
II.2.6.5. Autofagia y terapia en las enfermedades priónicas.....	89
III. ESTUDIOS	93
ESTUDIO 1: Dysfunction of autophagy in the central nervous system of sheep naturally infected with classical scrapie	95
Abstract.....	97
Introduction.....	97
Materials and methods.....	99
Results.....	104
Discussion.....	119
References.....	124
ESTUDIO 2: Spatial distribution of autophagy markers in the central nervous system of sheep experimentally infected with atypical scrapie	131
Abstract.....	133
Introduction.....	133
Materials and methods.....	135
Results.....	137
Discussion.....	145
References.....	149
ESTUDIO 3: Impairment of autophagy in scrapie-infected transgenic mice at clinical stage	155
Abstract.....	157
Introduction.....	157
Materials and methods.....	160
Results.....	165
Discussion.....	176
References.....	181
ESTUDIO 4: Validation of biomarkers potentially involved in prion replication <i>in vitro</i> in ovine scrapie	187
Abstract.....	189
Introduction.....	189
Materials and methods.....	191
Results.....	197
Discussion.....	212
References.....	217
ESTUDIO 5: Increased circulating microRNAs miR-342-3p and miR-21-5p in natural sheep prion disease	221
Abstract.....	223

Full-text.....	223
References.....	233
ESTUDIO 6: Circulating exosomes as biomarkers in natural ovine scrapie	237
Abstract.....	239
Introduction.....	239
Materials and methods.....	241
Results.....	248
Discussion.....	255
References.....	259
IV. DISCUSIÓN GENERAL.....	267
V. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	279
VI. RESUMEN/ABSTRACT.....	285
VII. ANEXOS.....	293
Anexo 1: Protocolo de tinción con Hematoxilina-Eosina.....	295
Anexo 2: Técnica de inmunohistoquímica para la detección de PrP ^{Sc}	295
Anexo 3: Detección de PrP ^{Sc} mediante la técnica de PET blot.....	296
Anexo 4: Técnica de inmunohistoquímica para la detección de microglía.....	297
Anexo 5: Técnica de inmunohistoquímica para la detección de GFAP.....	298
Anexo 6: Técnica de inmunohistoquímica para la detección de marcadores de autofagia (ATG5, LC3-B, LC3-A y p62), BAMBI y CHGA.....	299
Anexo 7: Protocolo de Western blot para la detección de marcadores de autofagia (ATG5, LC3-B, LC3-A y p62), BAMBI, CHGA y PrP ^{Sc}	300
Anexo 8: Protocolo de Dot blot para la detección de PrP ^{Sc}	301
Anexo 9: Aislamiento de exosomas de plasma.....	302
Anexo 10: Aislamiento de exosomas de líquido cefalorraquídeo.....	303
VIII. REFERENCIAS.....	305

ÍNDICE DE FIGURAS

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Tipos de autofagia.....	21
Figura 2: Mecanismos moleculares de la autofagia.....	25
Figura 3: Coordinación entre la liberación de exosomas y la autofagia en el mantenimiento de la homeostasis celular.....	38
Figura 4: Formación y estructura primaria de la PrP ^c	56
Figura 5: Estructura secundaria de la PrP ^c y PrP ^{Sc}	58
Figura 6: Vías de estrés celular activadas por la formación de PrP ^{Sc}	78

ESTUDIO 1

Figure 1: Histopathological (A-C) and immunohistochemical (D-F) features from different regions of animals studied.....	105
Figure 2: Semi-quantitative assessment values of spongiosis (A-B), intraneuronal vacuolation (C-D) and PrP ^{Sc} deposition (E-F).....	106
Figure 3: mRNA expression profiles of the <i>ATG5</i> , <i>BECN1</i> , <i>ATG9</i> and <i>LC3-B</i> autophagy-related genes.....	107
Figure 4: Specificity of antibodies.....	110
Figure 5: Semi-quantitative scoring of immunohistology for autophagy-related proteins.....	111
Figure 6: Immunostaining patterns of ATG5 protein in different CNS regions....	112
Figure 7: Immunostaining patterns of LC3-B protein in different CNS regions...	114
Figure 8: Immunostaining patterns of LC3-A protein in different CNS regions...	115
Figure 9: Immunostaining patterns of p62 protein in different CNS regions.....	117
Figure 10: Percentage of LC3-B, LC3-A and p62 positively stained Purkinje cells	119

ESTUDIO 2

Figure 1: Neuropil spongiosis, intraneuronal vacuolation (A) and PrP ^{Sc} deposition (B) in different CNS areas of atypical scrapie-infected sheep (white bars) and control animals (black bars).....	138
Figure 2: Semi-quantitative scoring of immunohistology for autophagy-related proteins in atypical scrapie-infected sheep (white bars) compared to control animals (black bars).....	140
Figure 3: Immunostaining patterns of autophagy-related proteins in different CNS regions of atypical scrapie sheep compared to control animals.....	141
Figure 4: Semi-quantitative scoring of immunohistology for autophagy-related proteins in atypical scrapie-infected sheep (white bars) compared to classical scrapie-infected sheep (grey bars).....	143
Figure 5: Immunostaining patterns of autophagy-related proteins in different CNS regions of atypical scrapie sheep compared to classical scrapie animals.....	144

ESTUDIO 3

Figure 1: Spongiform changes (A) and PrP ^{Sc} deposition (B) in different CNS areas of Tg338 scrapie-infected mice.....	166
Figure 2: Semi-quantitative scoring and immunostaining patterns of LC3-B in the CNS of Tg338 scrapie-infected mice.....	168
Figure 3: Semi-quantitative scoring and immunostaining patterns of p62 in the CNS of Tg338 scrapie-infected mice.....	170
Figure 4: Semi-quantitative scoring and immunostaining patterns of LC3-B in the CNS of Tg338 and wild-type control mice.....	173
Figure 5: Semi-quantitative scoring and immunostaining patterns of p62 in the CNS of Tg338 and wild-type control mice.....	174
Figure 6: Gene expression profiles.....	175

ESTUDIO 4

Figure 1: mRNA expression profiles of genes potentially involved in prion replication in medulla oblongata of sheep naturally-infected with scrapie (black bars) and control animals (grey bars).....	198
Figure 2: Neuropil spongiosis, intraneuronal vacuolation and PrP ^{Sc} deposition in medulla oblongata of scrapie-infected sheep (Sc-Mo) and control animals (C-Mo).....	198
Figure 3: Neuropil spongiosis and intraneuronal vacuolation (A), PrP ^{Sc} deposition (B) and microgliosis (C) in different CNS areas of scrapie-infected sheep.....	200
Figure 4: Immunostaining patterns and semi-quantitative scoring of BAMBI in the CNS of scrapie-infected sheep.....	202
Figure 5: Immunostaining patterns and semi-quantitative scoring of CHGA in the CNS of scrapie-infected sheep.....	203
Figure 6: Specificity of antibodies.....	205
Figure 7: mRNA expression profiles of <i>Bambi</i> and <i>Chga</i> genes in mesencephalon of preclinical (grey bars) and clinical (black bars) scrapie-infected Tg338 mice.....	206
Figure 8: Spongiform changes (A), PrP ^{Sc} deposition (B) and microgliosis (C) in different CNS areas of Tg338 scrapie-infected mice.....	207
Figure 9: Immunostaining patterns and semi-quantitative scoring of BAMBI in the CNS of Tg338 scrapie-infected mice.....	209
Figure 10: Immunostaining patterns and semi-quantitative scoring of CHGA in the CNS of Tg338 scrapie-infected mice.....	210

ESTUDIO 5

Figure 1: Scrapie-associated histopathology in the CNS.....	227
Figure 2: Circulating plasma miRNA alterations in scrapie sheep.....	230
Figure 3: miRNA expression in cervical spinal cord of symptomatic scrapie sheep.....	231

ESTUDIO 6

Figure 1: Characterization of exosomes by transmission electron microscopy (A-D).....	249
Figure 2: Characterization of exosomes derived from blood plasma by dynamic light scattering.....	249
Figure 3: miRNA profiles in plasma-derived exosomes.....	250
Figure 4: miRNA profiles in cerebrospinal fluid and CSF-derived exosomes.....	251
Figure 5: PrP ^{res} detection by Dot blot (left) and Western blot (right) in PMCA reactions seeded with serially diluted (10^{-2} - 10^{-9}) brain homogenate from three scrapie-infected sheep.....	251
Figure 6: Detection of the proteinase K-resistant core fragment (PrP ^{res}) of the pathologic prion by Dot blot (A) and Western blot (B-C) in PMCA reactions seeded with serially diluted (1/5, 1/10 and 1/50) plasma-derived exosomes obtained from scrapie-affected sheep.....	253
Figure 7: Detection of the proteinase K-resistant core fragment (PrP ^{res}) of the pathologic prion by Dot blot (A) and Western blot (B-C) in PMCA reactions seeded with serially diluted (1/5, 1/10 and 1/50) CSF-derived exosomes obtained from scrapie-affected sheep.....	254

ÍNDICE DE TABLAS

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Tabla 1: Proteínas Atg/ATG de la maquinaria molecular central involucradas en la formación del autofagosoma..... 24

Tabla 2: Clasificación de riesgo a padecer scrapie en función del genotipo para el gen *PRNP*..... 63

ESTUDIO 1

Table 1: Age and *PRNP* genotype of the animals used..... 100

Table 2: Primer sequences for each gene analysed..... 102

Table 3: Spearman correlation values between scrapie-related histopathological lesions..... 104

Table 4: Spearman correlation values between autophagy gene expression levels and histological features (spongiosis, intraneuronal vacuolation and PrP^{Sc} deposition)..... 109

Table 5: Spearman correlation values between gene expression levels and histological features in specific CNS areas (frontal cortex, thalamus, cerebellum and medulla oblongata)..... 109

Table 6: Spearman correlation values between histological features (spongiosis, intraneuronal vacuolation and PrP^{Sc}, ATG5, LC3-A, LC3-B and p62 immunostaining)... 118

ESTUDIO 2

Table 1: Spearman correlation values between autophagy markers scores and histological features (spongiosis, intraneuronal vacuolation and PrP^{Sc} deposition)..... 142

ESTUDIO 3

Table 1: Tg338 and wild-type mice used for the gene expression and protein distribution analysis of autophagy markers in the central nervous system..... 161

Table 2: Thermo Fisher Scientific assays for the amplification of candidate genes.. 164

Table 3: Spearman correlation values between autophagy markers (LC3-B and p62) and scrapie-related histopathological lesions (spongiform changes and PrP^{Sc} deposition)..... 172

ESTUDIO 4

Table 1: Animals used for the gene expression analysis in medulla oblongata of scrapie-infected sheep..... 191

Table 2: Primers used for the amplification of candidate genes..... 193

Table 3: Animals used for BAMBI and CHGA protein distribution analysis in the central nervous system of scrapie-infected sheep..... 194

Table 4: Tg338 mice used for the gene expression and protein distribution analysis of *Bambi* and *Chga* in the central nervous system..... 196

Table 5: Correlation values between scrapie-related lesions in medulla oblongata of scrapie-affected sheep and expression of genes potentially involved in prion replication..... 199

Table 6: Spearman correlation values between BAMBI and CHGA immunostaining scores and scrapie histopathological lesions..... 205

Table 7: Spearman correlation values between BAMBI and CHGA immunostaining scores and scrapie histopathological lesions (spongiform changes, PrP^{Sc} deposition and microgliosis)..... 212

ESTUDIO 5

Table 1: List of miRNA assays used..... 226

Table 2: Age and *PRNP* genotype of the sheep used..... 226

ESTUDIO 6

Table 1: Animals used in this study..... 243

I. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

ANTECEDENTES

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs), o enfermedades priónicas, son un grupo de trastornos neurodegenerativos de desenlace fatal que afectan tanto al hombre como a los animales (Prusiner, 1998a). La primera EET descrita, y la más extensamente estudiada hasta la fecha, es el scrapie de ovejas y cabras, por lo que está considerada un buen modelo animal natural para estudiar los mecanismos neuropatológicos de estas enfermedades (Pattison & Jones, 1967). Las EETs se caracterizan por presentar un largo periodo de incubación completamente libre de síntomas y una patología progresiva que conduce inevitablemente a la muerte. De acuerdo con la hipótesis conocida como “sólo proteína”, las enfermedades priónicas están causadas por la conversión conformacional de una proteína prion celular fisiológica, o PrP^c, codificada por el gen *PRNP* (*prion protein*), en una isoforma infecciosa parcialmente resistente a las proteasas y propensa a formar agregados denominada PrP^{Sc} (Prusiner, 1982). La acumulación de esta proteína en el sistema nervioso central (SNC) provoca degeneración neuronal de tipo espongiforme (vacuolización del cuerpo neuronal y espongiosis del neuropilo), activación de células gliales y pérdida neuronal por muerte celular (Bell & Ironside, 1993; H. Fraser, 1993). Desde hace años, el campo de investigación de las EETs se ha centrado en intentar caracterizar los mecanismos moleculares básicos de los procesos patológicos implicados en la patogenia y en la neurodegeneración asociada a la enfermedad priónica. Desafortunadamente, y a pesar de los grandes esfuerzos de los investigadores, estos mecanismos no se conocen todavía con exactitud.

Los datos disponibles actualmente indican que las neuronas no logran recuperar la homeostasis tras la exposición a la PrP^{Sc}, lo que inevitablemente conduce a la disfunción y muerte celular debido a mecanismos que se originan inicialmente como una respuesta de supervivencia a la acumulación intracelular de la proteína patológica (Mays & Soto, 2016). Recientemente se ha propuesto que la alteración de las distintas vías celulares que mantienen la homeostasis proteica interna, entre las que se encuentra la autofagia, es una de las principales causas de toxicidad en estos trastornos, aunque la relación causal entre estas alteraciones y la patogenia de la enfermedad sigue siendo una conjetura (Lindquist & Kelly, 2011; C. Hetz & Mollereau, 2014). La autofagia es un proceso intracelular fundamental, altamente conservado entre eucariotas, involucrado en

la eliminación de constituyentes citoplasmáticos a través de la degradación lisosomal (Rubinsztein, 2006). De manera fisiológica, la autofagia actúa como una respuesta adaptativa de supervivencia a varias formas de estrés celular, funcionando en parte como un mecanismo de control de calidad que evita la acumulación de orgánulos dañados y proteínas alteradas o mal plegadas. De esta forma, cuando se encuentra regulada de manera adecuada, la autofagia mantiene una homeostasis celular normal y protege al organismo contra varias patologías, y cuando no funciona correctamente, favorece la aparición de éstas. Durante los últimos años, la disfunción de este proceso se ha asociado con frecuencia a una gran cantidad de situaciones patológicas, incluidas varias enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y las enfermedades priónicas (Anglade *et al.*, 1997; Mok *et al.*, 2007; Pickford *et al.*, 2008; Martínez-Vicente *et al.*, 2010; Wong & Cuervo, 2010; Son *et al.*, 2012).

Gracias al rápido avance de la investigación en el campo de la autofagia, que ha permitido descubrir y caracterizar señales reguladoras y productos genéticos individuales que participan en el proceso (Levine & Klionsky, 2004), los investigadores han utilizado una amplia variedad de herramientas genéticas, bioquímicas y morfológicas para monitorizar y manipular la vía autofágica y explorar así sus diversas funciones bajo diferentes condiciones fisiológicas y patológicas. Hasta hace una década, los datos sobre la autofagia en las EETs eran muy limitados y consistían en su mayoría en estudios ultraestructurales de microscopía electrónica. La simple presencia de vacuolas autofágicas en las neuronas se ha demostrado en varios modelos de EET, como en enfermedades priónicas humanas o en scrapie inducido experimentalmente (Boellaard *et al.*, 1989; Boellaard *et al.*, 1991; Schatzl *et al.*, 1997; Liberski *et al.*, 2004; Sikorska *et al.*, 2004). Estos hallazgos motivaron a muchos investigadores a analizar en detalle si existe algún tipo de vínculo entre la autofagia y la infección por priones, sobre todo por el impacto que este proceso ha resultado tener en otras enfermedades neurodegenerativas (Bursch & Ellinger, 2005; Rubinsztein, 2006). De esta manera, se han observado con frecuencia alteraciones en los niveles de expresión de genes y proteínas relacionados con la autofagia en varios modelos celulares y murinos infectados con priones (Mok *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2012; Homma *et al.*, 2014; Moon *et al.*, 2016; Llorens *et al.*, 2017; Thellung *et al.*, 2018). Además, varios estudios han sugerido que la PrP^c podría desempeñar un papel crucial en la modulación de la ruta autofágica en las células

neuronales (Oh *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2012; H. Y. Shin *et al.*, 2013; Jeong & Park, 2015), y otros han demostrado que la inducción de la autofagia por compuestos químicos tiene efectos beneficiosos y da como resultado la disminución de la carga celular de la PrP^{Sc} tanto *in vitro* como *in vivo* (Aguib *et al.*, 2009; Heiseke *et al.*, 2010; H. Yao *et al.*, 2013).

No obstante, el análisis de la autofagia en las enfermedades priónicas se encuentra incompleto en la actualidad. Los mecanismos moleculares precisos implicados en el deterioro autofágico, la función biológica *per se* de la autofagia bajo la situación de una infección priónica, su implicación durante el curso patológico, si es completamente beneficiosa durante la neurodegeneración, o incluso la simple existencia de una conexión con la neuropatología asociada a la enfermedad, son cuestiones que actualmente no se comprenden en su totalidad. Además, la mayoría de estudios que han investigado el papel de la autofagia bajo el contexto de una enfermedad priónica han sido realizados en modelos celulares y murinos de EET, muchos de ellos orientados a la evaluación de los efectos que la manipulación genética o farmacológica del flujo autofágico produce sobre la infección, y pocos dirigidos al análisis de la relación del proceso con las lesiones neuropatológicas asociadas a la enfermedad. Por lo tanto, es necesario adquirir un entendimiento más preciso de cómo está involucrada la maquinaria autofágica en las enfermedades priónicas, ya que una mejor comprensión de la autofagia y sus consecuencias para la neurodegeneración puede proporcionar nueva información sobre los mecanismos moleculares patológicos que subyacen al deterioro autofágico en enfermedades neurodegenerativas comunes y, principalmente, puede beneficiar al desarrollo de estrategias terapéuticas innovadoras y efectivas basadas en la manipulación de este proceso. Por ello, además de estudios *in vitro* más detallados, se requieren experimentos apropiados en modelos *in vivo* para esclarecer el impacto de la autofagia en la infección priónica y comprobar si desempeña un papel general bajo las condiciones de estas enfermedades.

Los estudios genómicos aplicados en modelos animales pueden contribuir a la determinación de genes implicados en la neuropatología de estas enfermedades que ayuden a comprender mejor los mecanismos y eventos moleculares que conducen a la neurodegeneración. Las herramientas genómicas, como la secuenciación masiva del transcriptoma (Mortazavi *et al.*, 2008; Rosenkranz *et al.*, 2008; Wilhelm *et al.*, 2008), permiten comparar los niveles de expresión génica global entre muestras de individuos

enfermos y sanos, o entre diferentes etapas de la enfermedad, para así poder determinar genes implicados en la patogénesis priónica que puedan servir como posibles biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad, o como dianas para su uso en estrategias terapéuticas (Huzarewich *et al.*, 2010). De esta forma, varios estudios transcriptómicos llevados a cabo en muestras del SNC tanto de individuos afectados por la enfermedad natural, incluido el scrapie ovino, como de modelos murinos adaptados a las EETs, han identificado genes expresados diferencialmente que señalan alteraciones generalizadas en varias vías de la función neuronal (Xiang *et al.*, 2005; Filali *et al.*, 2011; Basu *et al.*, 2012; Filali *et al.*, 2012; Vanni, 2017). Sin embargo, muy pocos de ellos se han confirmado como biomarcadores útiles para el diagnóstico de estas enfermedades, ya que se requieren estudios experimentales adicionales antes de utilizar estas moléculas en ensayos clínicos (Huzarewich *et al.*, 2010). La confirmación de un biomarcador génico requiere un proceso de validación funcional convincente incluyendo estudios que añadan información y confianza a estos potenciales biomarcadores mediante cuantificación proteica, utilizando técnicas de inmunoensayo como la inmunohistoquímica, para determinar el nivel de proteínas codificadas por los genes que presentan niveles de regulación transcripcional diferenciales.

Hasta la fecha, la proteína PrP^{Sc} es el único componente conocido del agente causal de las EETs, y su detección directa de manera *post-mortem* en el tejido cerebral de los individuos enfermos se utiliza como el único marcador bioquímico de la presencia y distribución de la infectividad (Aguzzi & Falsig, 2012). En el caso del scrapie ovino, el diagnóstico mediante la observación de los signos clínicos, junto con la detección de PrP^{Sc} en tejido linfóide obtenido mediante biopsias del tercer párpado (Vargas *et al.*, 2006), tonsilas (van Keulen *et al.*, 1996) y/o mucosa rectal (Monleon *et al.*, 2005) son los únicos métodos de diagnóstico *in vivo*. Sin embargo, el cuadro clínico del scrapie es difuso, ya que no existen signos patognomónicos de la enfermedad, y la distribución periférica del prion en los tejidos linfoides puede variar considerablemente en función del genotipo del animal y de la cepa priónica infectiva (van Keulen *et al.*, 1996; Andreoletti *et al.*, 2000; Monleon *et al.*, 2011). Asimismo, el uso de la PrP^{Sc} como biomarcador eficaz de diagnóstico *in vivo* durante la fase preclínica de la enfermedad no se considera un método fiable, ya que la presencia de la PrP^{Sc} es mínima en tejidos y fluidos corporales fácilmente accesibles como la sangre o la orina (Gough & Maddison, 2010). Además, los análisis basados en la detección de la PrP^{Sc} pueden ser menos eficientes para identificar casos de

scrapie atípico (Andreoletti *et al.*, 2011). Por lo tanto, para proporcionar alternativas útiles a la metodología diagnóstica actual de las EETs, resulta necesario identificar biomarcadores distintos a la PrP^{Sc} que puedan ser detectados durante la fase inicial de la enfermedad a partir de un tejido o fluido accesible, lo que aumentaría considerablemente las posibles estrategias de tratamiento y/o erradicación de la cadena alimentaria para controlar la propagación de estas enfermedades tanto en humanos como en animales.

Además de los modelos animales, los modelos *in vitro* también pueden resultar útiles para identificar biomarcadores o genes involucrados en la patogénesis de las EETs. Mediante la comparación transcriptómica de líneas celulares con diferentes susceptibilidades a la infección, no explicada por la distinta expresión de la PrP^c, se ha descrito recientemente una red génica reguladora que es capaz de modular la resistencia/susceptibilidad a la propagación priónica *in vitro* (Marbiah *et al.*, 2014). Aunque algunas variantes del gen *PRNP* se han asociado a la susceptibilidad a la infección priónica en humanos (Aguzzi, 2006) y ovejas (Hunter, 2007) y son capaces de modular la progresión y la patogenia de la enfermedad, los distintos periodos de incubación que se producen en animales infectados con scrapie con el mismo genotipo sugiere la existencia de otros factores genéticos independientes de la PrP^c que pueden controlar la replicación priónica, facilitándola o impidiéndola (C. R. Moreno *et al.*, 2003). La validación *in vivo* de los genes y variaciones genéticas potencialmente asociados a la replicación del prion, podría facilitar tanto la identificación de individuos en riesgo, permitiendo predicciones más robustas en los parámetros epidemiológicos, como la identificación de rutas bioquímicas involucradas en la enfermedad que mejorarán la comprensión de la patogénesis priónica y el desarrollo de biomarcadores y terapias.

Por otro lado, los microRNAs (miRNAs) han ganado atención durante los últimos años como posibles biomarcadores diagnósticos obtenidos de manera mínimamente invasiva, ya que a menudo son secretados por los tejidos afectados a fluidos corporales como la sangre, suero, plasma o líquido cefalorraquídeo (LCR), donde muestran gran estabilidad debido a la protección conferida por chaperonas o vesículas como los exosomas (Mitchell *et al.*, 2008). Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificantes de proteínas que regulan la expresión génica de manera post-transcripcional mediante la inhibición o degradación del mRNA (S. S. Hebert & De Strooper, 2009). En varias enfermedades neurodegenerativas se ha observado con frecuencia alteraciones en

el metabolismo del RNA, incluido el de los miRNAs, ya que estas moléculas son fácilmente identificables mediante el uso de herramientas básicas de identificación molecular, como las técnicas de expresión genómica (Hruska-Plochan *et al.*, 2015). De esta manera, algunos estudios han descrito variaciones en los niveles de expresión de varios miRNAs en cultivos de células neuronales infectadas con priones, en el SNC de modelos murinos de EET y en la enfermedad humana natural, aunque se desconoce cómo estas alteraciones se relacionan con la patogénesis de la enfermedad (Saba *et al.*, 2008; Montag *et al.*, 2009; Lukiw *et al.*, 2011; Bellingham, Coleman, *et al.*, 2012; Majer *et al.*, 2012; Saba *et al.*, 2012; Boese *et al.*, 2016). Si los niveles de los miRNAs liberados por las neuronas se encuentran también alterados durante la enfermedad priónica *in vivo*, estas moléculas podrían detectarse directamente en la circulación del individuo afectado para ser utilizadas como un biomarcador de la enfermedad obtenido a partir de un fluido biológico fácilmente accesible. Hasta la fecha, ningún estudio previo ha explorado esta posibilidad.

Además de la autofagia, los exosomas también son utilizados por la célula como un método para aliviar las condiciones de estrés intracelular mediante la secreción selectiva de material nocivo no deseado (Baixauli *et al.*, 2014). Los exosomas son pequeñas vesículas membranosas que se liberan desde casi todos los tipos celulares al entorno extracelular y se encuentran en fluidos corporales como la sangre o el LCR (Yanez-Mo *et al.*, 2015). Mediante esta forma de secreción, los exosomas pueden transferir su contenido desde la célula donante a otras células, desempeñando una función primordial de comunicación intercelular en varios procesos fisiológicos (Mittelbrunn & Sanchez-Madrid, 2012; Robbins & Morelli, 2014). Estas vesículas, además de contener repertorios específicos de miRNAs que muestran un perfil alterado tras la infección priónica *in vitro* (Bellingham, Coleman, *et al.*, 2012), también pueden contener tanto la PrP^c como la PrP^{Sc} (Fevrier *et al.*, 2004; Leblanc *et al.*, 2006; Veith *et al.*, 2009), proporcionando un mecanismo potencial para la propagación y diseminación de la infectividad entre las células y la neuroinvasión del SNC (Hartmann *et al.*, 2017). Aunque actualmente existen muy pocos estudios sobre la infectividad de estas vesículas en las EETs, se ha demostrado que los exosomas aislados del plasma sanguíneo de modelos murinos de EET contienen infectividad y son capaces de transmitir la enfermedad priónica *in vivo*, por lo que pueden ser posibles portadores de la PrP^{Sc} en la sangre (Cervenakova *et al.*, 2016). Debido a que la importancia de los exosomas como

biomarcadores potenciales de estas enfermedades sólo se ha analizado *in vitro* y en modelos murinos, el estudio *in vivo* de su infectividad y de las alteraciones en los perfiles de expresión de los miRNAs, en distintas etapas de la infección del hospedador natural de la enfermedad y en fluidos biológicos fácilmente accesibles, como plasma o LCR, permitiría identificar nuevas moléculas implicadas en la patogénesis de las EETs que puedan ser útiles como biomarcadores de diagnóstico.

OBJETIVOS

Atendiendo a los antecedentes descritos, el propósito general de la presente Tesis Doctoral titulada: “**Autofagia y biomarcadores en las enfermedades priónicas**” es contribuir al conocimiento de las EETs fundamentalmente desde dos líneas de interés.

Por un lado, se pretende adquirir más información acerca de los mecanismos celulares y moleculares implicados en la neuropatología de estas enfermedades. Para ello, en la primera parte de esta Tesis Doctoral se han incluido tres estudios cuyo objetivo consiste en determinar la posible implicación de la autofagia en la neuropatología asociada al scrapie mediante el uso de modelos de la enfermedad tanto naturales como experimentales. La evaluación de la autofagia bajo la situación específica de la infección priónica, probablemente podría ayudar a adquirir nuevos datos para comprender mejor el papel de este proceso en la enfermedad humana.

Por otro lado, la búsqueda de nuevos biomarcadores y la validación a nivel proteico de los potenciales biomarcadores génicos ya identificados, siguen siendo necesarios en las EETs, principalmente en el hospedador natural de la enfermedad, ya que la mayoría de estudios genómicos se han realizado en modelos murinos. En la segunda parte de la presente Tesis Doctoral hemos incluido tres estudios en los que analizamos el posible potencial como biomarcadores de la enfermedad de un conjunto de genes implicados en la replicación priónica, y de miRNAs y exosomas obtenidos de fluidos biológicos fácilmente accesibles del hospedador natural.

Para abordar experimentalmente cada una de las líneas de interés, esta Tesis Doctoral se ha organizado en seis estudios cuyos objetivos se describen a continuación:

Estudio N°1: Dysfunction of autophagy in the central nervous system of sheep naturally infected with classical scrapie (*submitted manuscript*).

Objetivo general: Estudiar la implicación *in vivo* de la autofagia en la neuropatología priónica de un modelo animal natural de la enfermedad, utilizando muestras del SNC procedentes de ovejas infectadas de forma natural con scrapie clásico.

Objetivos específicos:

- Obtener un perfil lesional mediante el estudio histopatológico de la degeneración espongiiforme (espongiosis del neuropilo y vacuolización intraneuronal) y la determinación del patrón de depósito de PrP^{Sc} en las regiones neuroanatómicas más relevantes del encéfalo.
- Analizar la expresión génica en el SNC de marcadores de autofagia implicados en distintas etapas del proceso (*ATG5*, *BECN1*, *ATG9* y *LC3-B*) mediante PCR cuantitativa en tiempo real.
- Estudiar la expresión y distribución proteica en el SNC de varios marcadores de autofagia (*ATG5*, *LC3-B*, *LC3-A* y *p62*) mediante técnicas inmunohistoquímicas.
- Confirmar la especificidad de los anticuerpos utilizados mediante Western blot.
- Investigar la posible asociación de la autofagia con las lesiones neuropatológicas de la enfermedad mediante el cálculo de correlaciones estadísticas.

Estudio N°2: Spatial distribution of autophagy markers in the central nervous system of sheep experimentally infected with atypical scrapie (*preliminary manuscript for main article*).

Objetivo general: Confirmar y complementar los resultados obtenidos en el primer estudio, mediante el análisis inmunohistoquímico de la actividad autofágica en el SNC de ovejas infectadas experimentalmente con scrapie atípico, dado que la distribución neuroanatómica de las lesiones histopatológicas y de los depósitos de PrP^{Sc} en esta forma clínica de la enfermedad es distinta a la presentada por la forma clásica.

Objetivos específicos:

- Obtener un perfil lesional mediante el estudio histopatológico de la degeneración espongiiforme y la determinación del patrón de depósito de PrP^{Sc} en las regiones neuroanatómicas más relevantes del encéfalo.
- Estudiar la expresión y distribución proteica en el SNC de varios marcadores de autofagia (ATG5, LC3-B, LC3-A y p62) mediante técnicas inmunohistoquímicas.
- Investigar la posible asociación de la autofagia con las lesiones neuropatológicas de la enfermedad mediante el cálculo de correlaciones estadísticas.
- Comparar la distribución inmunohistoquímica de los marcadores de autofagia en la forma atípica de la enfermedad con los resultados descritos en la forma clásica, para validar si existen diferencias regionales en la regulación autofágica en respuesta a la enfermedad.

Estudio N°3: Impairment of autophagy in scrapie-infected transgenic mice at clinical stage (*preliminary manuscript for main article*).

Objetivo general: Analizar los mecanismos moleculares de la autofagia en diferentes estadios clínicos del proceso patológico y su relación con la neuropatología priónica, en el SNC de ratones transgénicos Tg338 infectados con scrapie ovino, para valorar el uso de este modelo murino como un método adecuado para estudiar la autofagia y las EETs de manera conjunta y así adquirir más información con respecto al papel de este proceso en la enfermedad natural. Además, y dado que este modelo sobreexpresa la PrP^c ovina, se pretende determinar si esta proteína por sí misma es capaz de modular la actividad autofágica *in vivo*.

Objetivos específicos:

- Obtener un perfil lesional mediante el estudio histopatológico de la degeneración espongiiforme y la determinación del patrón de depósito de PrP^{Sc} mediante la técnica de PET blot en las regiones neuroanatómicas más relevantes del encéfalo.
- Cuantificar el nivel de transcritos en mesencéfalo y médula espinal cervical de un conjunto de genes, factores de transcripción y RNAs no-codificantes implicados en la autofagia (*Atg5*, *Lc3*, *E2f1*, *Fbxw7*, *p62* y *Gas5*) mediante PCR cuantitativa en tiempo real.
- Estudiar la expresión y distribución proteica en el SNC de los dos principales marcadores de autofagia (LC3-B y p62) mediante técnicas inmunohistoquímicas.

- Investigar la posible asociación de la autofagia con las lesiones neuropatológicas de la enfermedad mediante el cálculo de correlaciones estadísticas.
- Comparar la distribución inmunohistoquímica de LC3-B y p62 en ratones de tipo *wild-type* con la de los ratones Tg338 inoculados con tejido cerebral sano, para determinar si la sobreexpresión de la PrP^c en ausencia de infección es suficiente para alterar la actividad autofágica.
- Determinar si los resultados obtenidos en el modelo murino Tg338 se asemejan a los cambios observados en el modelo natural de la enfermedad.

Estudio N°4: Study of genes potentially involved in prion replication in ovine scrapie (*preliminary manuscript for main article*).

Objetivo general: Estudiar la implicación *in vivo* de un conjunto de genes, potencialmente implicados en la propagación priónica *in vitro*, en la neuropatología asociada al scrapie clásico, y su potencial uso como biomarcadores, mediante su análisis de expresión génica y proteica en el SNC del modelo ovino natural de la enfermedad y del modelo transgénico murino Tg338.

Objetivos específicos:

- Analizar la expresión de diez genes aparentemente involucrados en la replicación priónica (*BAMBI, CHGA, DLC1, FNI, GALT, IL11RA, ITGA8, LRRN4, PAPSS2* y *RGS4*) en la médula oblongada de ovejas infectadas de forma natural con scrapie clásico mediante PCR cuantitativa en tiempo real.
- Cuantificar el nivel de transcritos de los genes expresados diferencialmente en el SNC de ratones transgénicos Tg338 infectados con scrapie ovino en diferentes estadios clínicos de la enfermedad.
- Estudiar la expresión y distribución de las proteínas codificadas por los genes con una regulación de expresión diferencial, en varias zonas del SNC de los dos modelos de scrapie mediante técnicas inmunohistoquímicas.
- Confirmar la especificidad de los anticuerpos utilizados mediante Western blot.
- Investigar la posible asociación entre la expresión génica y proteica de los genes regulados de forma diferencial y las lesiones neuropatológicas de la enfermedad, incluidos los cambios espongiiformes, los depósitos de PrP^{Sc} y la microgliosis, mediante el cálculo de correlaciones estadísticas.

Estudio N°5: Increased circulating microRNAs miR-342-3p and miR-21-5p in natural sheep prion disease (*published in Journal of General Virology*).

Objetivo general: Analizar las posibles alteraciones de un conjunto de miRNAs circulantes, seleccionados por mostrar una expresión diferencial en el SNC de varios modelos de EET, en el plasma sanguíneo y médula espinal cervical de ovejas infectadas de forma natural con scrapie clásico, para su uso potencial como biomarcadores de la enfermedad.

Objetivos específicos:

- Determinar las lesiones histopatológicas, la astrogliosis y los depósitos de PrP^{Sc} en la médula espinal cervical de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie clásico.
- Analizar la expresión de ocho miRNAs candidatos (let-7b-5p, let-7d-5p, miR-128-3p, miR-132-3p, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-342-3p y miR-342-5p) en muestras de plasma sanguíneo y médula espinal cervical mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

Estudio N°6: Circulating exosomes as biomarkers in natural ovine scrapie (*preliminary manuscript for main article*).

Objetivo general: Estudiar el posible potencial de exosomas obtenidos de fluidos biológicos fácilmente accesibles del hospedador natural, para su uso como biomarcadores de la enfermedad.

Objetivos específicos:

- Aislar exosomas de plasma sanguíneo y LCR de ovejas infectadas de forma natural con scrapie mediante el uso de kits comerciales.
- Caracterizar los exosomas aislados con microscopía electrónica de transmisión y dispersión dinámica de luz.
- Cuantificar, en los exosomas aislados, los niveles de expresión del conjunto de miRNAs estudiados en el anterior trabajo, mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

- Determinar si los miRNAs circulantes que muestran un perfil alterado en plasma y LCR, se encuentran libres en el fluido corporal o incluidos en exosomas, mediante la comparación de las variaciones presentes en el fluido con las de la fracción exosomal.
- Determinar la presencia de la PrP^{Sc} y la infectividad de los exosomas de plasma y LCR en diferentes estadios clínicos de la enfermedad, mediante técnicas sensibles como la amplificación cíclica de proteínas mal plegadas y el bioensayo en el modelo transgénico murino Tg338.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. AUTOFAGIA

II.1.1. GENERALIDADES

La palabra “autofagia” deriva de las raíces griegas *auto* (uno mismo) y *phagos* (comer), y significa literalmente “comerse a sí mismo”. El bioquímico belga Christian de Duve (De Duve, 1963) utilizó por primera vez el término “autofagia” en 1963 para describir un hecho observable relacionado con la formación de vesículas de membrana única y/o doble, que tenían contenido citoplasmático en su interior en diferentes etapas de digestión. La carga autofágica está compuesta por elementos del citoplasma, que incluyen proteínas anormales, mal plegadas o agregadas, y orgánulos completos dañados como el retículo endoplasmático (RE), la mitocondria y los peroxisomas, así como microorganismos patógenos intracelulares. Actualmente, el término se refiere a los procesos evolutivamente conservados de catabolismo celular y reciclaje, en los que el citoplasma considerado no esencial y los componentes viejos o dañados, son secuestrados en vesículas y transportados a los lisosomas para su degradación, manteniendo así el equilibrio homeostático entre la formación, síntesis, eliminación, y posterior recambio de los elementos celulares. La autofagia ocurre de manera fisiológica tanto en animales como en humanos actuando como una respuesta de supervivencia a varias formas de estrés celular, mediante el suministro de nutrientes durante la inanición y la eliminación de orgánulos dañados y proteínas mal plegadas. Sin embargo, durante los últimos años se ha observado que la disfunción del sistema autofágico acompaña a una gran variedad de situaciones patológicas, incluyendo ciertos tipos de cáncer, miocardiopatías, y enfermedades neurodegenerativas.

II.1.2. TIPOS DE AUTOFAGIA

Las células cuentan con un amplio repertorio de estrategias para eliminar proteínas. El proteasoma es el principal mecanismo para degradar proteínas de manera selectiva, tanto citoplasmáticas como nucleares. Sin embargo, la mayoría de células también dependen de rutas lisosómicas para realizar la proteólisis, especialmente en condiciones limitantes de nutrientes (Cuervo & Dice, 1998). Los lisosomas representan el principal compartimento catabólico en células eucariotas. Estos orgánulos son vesículas ácidas con un pH interno de 5.1-5.5 que contienen varias clases de enzimas hidrolíticas y proteolíticas que, en conjunto, son capaces de degradar la mayoría de

macromoléculas de origen natural (Majeski & Dice, 2004). Existen varias rutas diferentes que entregan proteínas y constituyentes celulares a los lisosomas, incluidas la vía endolisosomal, la vía RESET (*rapid ER stress-induced export*), o la ruta autofágica, aunque la frecuencia de cada una de ellas depende del tipo celular y de la función (Saftig & Klumperman, 2009). Por ejemplo, cuando se requiere silenciar la señalización de un receptor, la endocitosis puede suministrar proteínas extracelulares y de membrana a los lisosomas para su degradación (Majeski & Dice, 2004).

En células eucariotas, la maquinaria autofágica implica la presentación e introducción de los componentes intracelulares a degradar en los lisosomas, a través de tres procesos distintos catalogados según su método de captación y administración de la carga al lisosoma: la autofagia mediada por chaperonas (AMC), la microautofagia y la macroautofagia (Mizushima *et al.*, 2008; Cuervo, 2010b). Todos estos sistemas están interconectados y la comunicación entre ellos garantiza la eliminación eficiente de los componentes celulares obsoletos (Nixon, 2013). En la Figura 1 se muestra una imagen representativa de los distintos tipos de autofagia.

II.1.2.1. Autofagia mediada por chaperonas

A diferencia de otras rutas de degradación lisosómica, en la AMC las proteínas citosólicas no son transportadas en vesículas, sino que son introducidas a los lisosomas molécula a molécula (Figura 1C) (Cuervo & Dice, 1998; Franch *et al.*, 2001). Las proteínas que se degradan se identifican por contener la secuencia específica de aminoácidos KFERQ (Chiang *et al.*, 1989; Dice, 1990), que es reconocida por un complejo de chaperonas presente en el citosol formado principalmente por la chaperona Hsc70 (*constitutive heat shock protein 70*) y las co-chaperonas Hsp40 (*heat shock protein 40*), Hsp90 (*heat shock protein 90*), Hip (*hsc70-interacting protein*), Hop (*hsc70-hsp90 organizing protein*) y bag-1 (*Bcl-2-associated athanogene 1*) (Agarraberes & Dice, 2001). Este complejo se une a los sustratos proteicos y, posteriormente, a la membrana lisosómica mediante la interacción del sustrato con un receptor de membrana denominado LAMP-2a (*lysosome-associated membrane protein type 2a*) (Cuervo & Dice, 1996). Las proteínas a degradar requieren ser plegadas correctamente antes de ser introducidas en la luz del lisosoma, probablemente por el propio complejo de chaperonas (Salvador *et al.*, 2000). A través del poro de membrana que forman las subunidades de LAMP-2a, la

chaperona intralisosomal Ly-Hsc70 trasloca e introduce las proteínas en la luz del lisosoma, donde son degradadas por enzimas hidrolíticas (Cuervo, 2010b). Finalmente, el complejo de chaperonas se separa de la membrana del lisosoma para unirse a otra proteína citoplasmática que contenga la secuencia KFERQ.

II.1.2.2. Microautofagia

En la microautofagia el material citoplasmático a degradar es captado directamente por el propio lisosoma, cuya membrana experimenta un proceso de deformación, ya sea por invaginación interna o por extensión de la misma, para rodear partes del citoplasma (Figura 1B). Posteriormente, los extremos de la membrana lisosomal se fusionan formando una vesícula dentro del lisosoma (Mijaljica *et al.*, 2011). La degradación microautofágica en levaduras puede ser de tipo no selectiva, si degrada partes del citoplasma de manera aleatoria, o selectiva, si degrada orgánulos específicos, como mitocondrias (micromitofagia), peroxisomas (micropexofagia), o incluso partes del núcleo (micronucleofagia) (Kunz *et al.*, 2004; Farre *et al.*, 2009). Actualmente, la información disponible sobre los mecanismos de la microautofagia ha sido obtenida casi exclusivamente de estudios llevados a cabo en levaduras (Farre *et al.*, 2009). Por el contrario, pocos investigadores han estudiado este tipo de autofagia en eucariotas superiores, principalmente por la falta de herramientas específicas para detectar directamente este proceso, por lo que, a diferencia de la AMC y la macroautofagia, la microautofagia no está bien caracterizada en mamíferos en cuanto a mecanismos moleculares, regulación y significado fisiológico o patológico. Recientemente se ha descrito un proceso muy similar a la microautofagia que también contribuye a la degradación del citosol, denominado microautofagia endosomal, en el que se introducen selectivamente proteínas citoplasmáticas solubles en las vesículas intraluminales de los endosomas tardíos en proceso de maduración, a través de la invaginación de la membrana que se produce durante la formación de las propias vesículas. Este proceso depende de los complejos de transporte endosomal ESCRT-I y -III (*endosomal sorting complex required for transport*) para formar las vesículas en las que se internaliza el material citoplasmático, y de la chaperona Hsc70 para seleccionar e introducir las proteínas en las vesículas (Sahu *et al.*, 2011).

II.1.2.3. Macroautofagia

La macroautofagia se caracteriza por la presencia de vesículas especializadas que se forman a partir de unas membranas iniciales en el citoplasma de origen desconocido, llamadas membranas de aislamiento o fagoforos (Figura 1A). Durante este proceso, regiones citoplasmáticas enteras que incluyen proteínas y orgánulos completos son englobadas por estas membranas pre-autofagosómicas, cuyos extremos se alargan y se fusionan como si fueran macrófagos intracelulares, envolviendo el material del citoplasma dentro de vesículas de doble membrana de 0.5-1.5 μm de diámetro denominadas vacuolas autofágicas o autofagosomas. Posteriormente, la membrana externa de los autofagosomas se acopla y fusiona con los lisosomas para entregar la carga citoplasmática, exponiendo el compartimento interno del autofagosoma a hidrolasas lisosomales, las cuales degradan su membrana interna. Del resultado de la fusión, el autofagosoma se convierte en una vesícula de membrana simple llamada autolisosoma o autofagolisosoma. De esta forma, el contenido del autofagosoma gana acceso a la maquinaria degradativa del lisosoma, donde será degradado por enzimas hidrolíticas. Las macromoléculas resultantes son liberadas al citosol a través de permeasas de la membrana lisosomal para ser reutilizadas por la célula (Klionsky & Emr, 2000; Yoshimori, 2004; Rubinsztein *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2014).

Al igual que la microautofagia, la macroautofagia también puede ser selectiva o no selectiva en función del tipo de carga. La macroautofagia selectiva, sólo degrada componentes citoplasmáticos concretos para facilitar la eliminación de excedentes o estructuras dañadas antes de que se vuelvan tóxicas para las células (Parzych & Klionsky, 2014). Este tipo de autofagia puede degradar componentes específicos como mitocondrias (macromitofagia), peroxisomas (macropexofagia), el RE (macroreticulofagia), y complejos de señalización cuando ya no son necesarios (Khaminets *et al.*, 2016), mediante el reconocimiento selectivo de señales de degradación y receptores de autofagia en el orgánulo a degradar (Mijaljica *et al.*, 2012; Okamoto, 2014). De esta forma, la autofagia se convierte en un regulador crítico de la homeostasis de ciertos orgánulos, particularmente de las mitocondrias, permitiendo la eliminación selectiva de mitocondrias disfuncionales que liberan especies reactivas de oxígeno y factores pro-apoptóticos (Youle & Narendra, 2011). Otro ejemplo de autofagia selectiva en mamíferos es la activación del proceso como defensa inmune innata contra patógenos

bacterianos intracelulares, denominado xenofagia, durante el cual, las bacterias invasoras son atrapadas en autofagosomas y degradadas (Deretic & Levine, 2009). La eliminación específica de proteínas tóxicas propensas a formar agregados es otra función autofágica considerada selectiva (Rubinsztein *et al.*, 2005). Por el contrario, durante la macroautofagia no selectiva, cualquier parte del citoplasma es susceptible de ser reciclada de forma masiva. En este caso, los autofagosomas contienen principalmente material citoplasmático aleatorio. Este tipo de autofagia se ha observado en todos los eucariotas analizados y, en general, es inducida por la privación de nutrientes o perturbaciones metabólicas, aunque también se produce constitutivamente a un nivel basal bajo.

De todos los procesos de autofagia descritos anteriormente, la macroautofagia (en lo sucesivo autofagia) es la ruta mejor caracterizada a nivel molecular y la que presenta una morfología más obvia, de modo que con frecuencia se hace referencia a ella como sinónimo de autofagia.

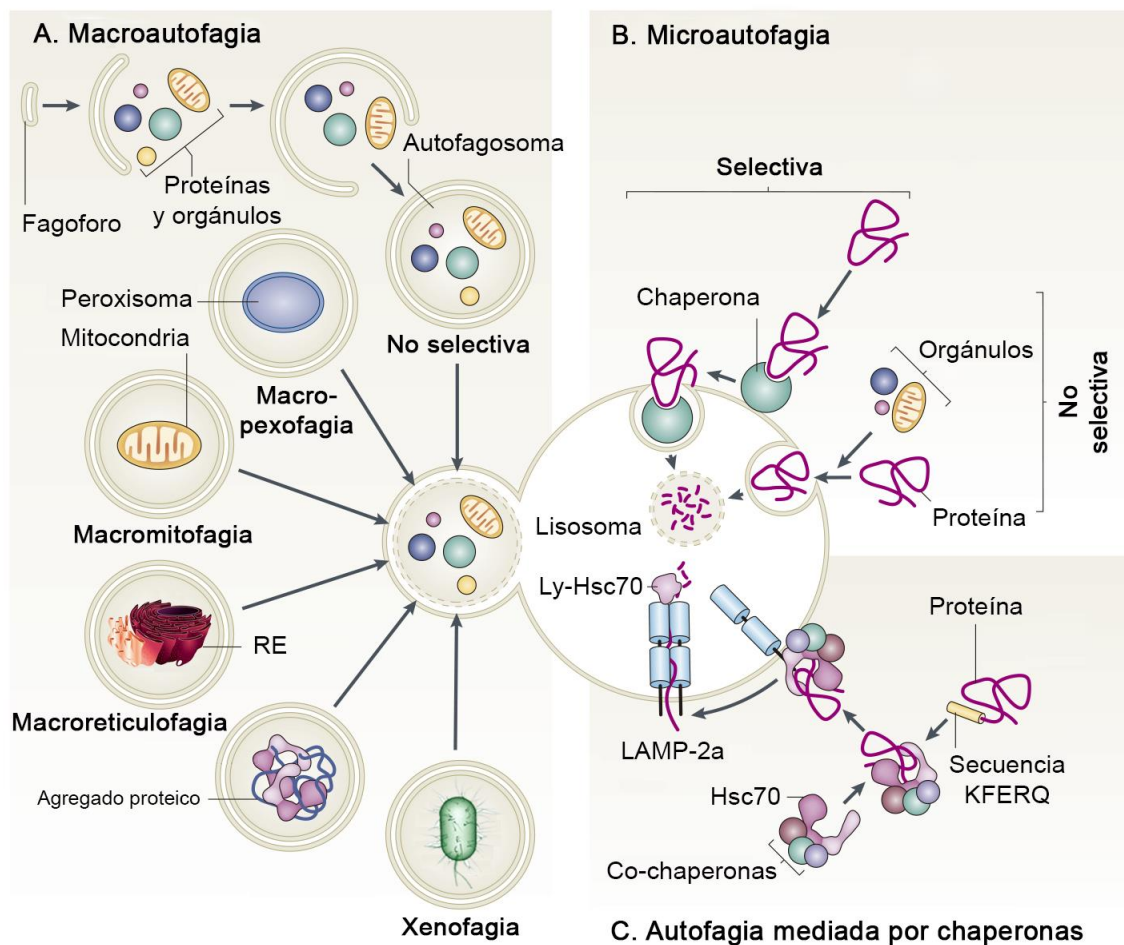


Figura 1: Tipos de autofagia. (A) Macroautofagia, (B) Microautofagia y (C) Autofagia mediada por chaperonas. Adaptada de (Cuervo, 2011).

II.1.3. MECANISMOS MOLECULARES DE LA AUTOFAGIA

La autofagia es un proceso altamente conservado entre eucariotas que ha sido caracterizado desde organismos unicelulares como las levaduras, hasta organismos pluricelulares como el hombre (Reggiori & Klionsky, 2002). El análisis de genes y proteínas en sistemas de levaduras ha demostrado ser extremadamente útil en la investigación de la autofagia y su estudio en otros organismos, puesto que existen homólogos de genes de levadura en otros eucariotas, y en muchos casos los productos genéticos correspondientes son ortólogos que llevan a cabo funciones similares (Klionsky *et al.*, 2003). Hasta la fecha, los análisis genéticos realizados en levaduras, principalmente en *Saccharomyces cerevisiae*, han permitido identificar más de 30 genes relacionados con la autofagia (*autophagy-related*; Atg) que codifican proteínas esenciales para la ejecución del proceso, y que son requeridas tanto para funciones selectivas como no selectivas de la autofagia (Tsukada & Ohsumi, 1993; Levine & Klionsky, 2004; K. Suzuki & Ohsumi, 2007).

De todos los genes *Atg*, se requiere de un subconjunto de ellos para la formación del autofagosoma en todos los subtipos de autofagia. Los productos proteicos correspondientes codificados por estos genes forman parte de la denominada “maquinaria molecular central” de la autofagia. A pesar de que estas proteínas participan en la formación del autofagosoma, la maquinaria central también puede funcionar de forma no canónica. Por ejemplo, la microautofagia y la macroautofagia, que son vías morfológicamente distintas, usan las mismas proteínas de la maquinaria central, aunque en un patrón de organización diferente. Además, su regulación puede ser distinta en función del tipo celular, e incluso existen otros mecanismos adicionales que permiten que la autofagia incorpore información sobre el número y la forma de la carga para adaptarse a las necesidades de la célula en función de la naturaleza del objetivo a degradar (Xie & Klionsky, 2007). La maquinaria central de proteínas Atg está compuesta por varios complejos proteicos, clasificados según sus respectivas funciones (Tabla 1).

Estas proteínas deben comunicarse eficazmente y actuar de manera coordinada para permitir la formación del fagoforo, su maduración en autofagosoma, y su posterior fusión con el lisosoma. La formación del autofagosoma requiere de un estricto control espacial y temporal por parte de las proteínas para que la expansión del fagoforo concluya por completo antes de que el autofagosoma se cierre, evitando así la captación ineficiente

de la carga, o para permitir que solo los autofagosomas completos, y no los fagoforos inmaduros, se fusionen con el lisosoma, evitando la entrega prematura de la carga en la luz (Ariosa & Klionsky, 2016). Para ello, la biogénesis del autofagosoma se puede resumir en varias etapas distintas (Yin *et al.*, 2016): inducción, nucleación del fagoforo, expansión y maduración en autofagosoma, acoplamiento y fusión con el lisosoma, y degradación y reciclaje de la carga (Figura 2). Aunque muchos de estos genes y proteínas tienen sus correspondientes homólogos en mamíferos, para simplificar, a lo largo de este apartado utilizaremos la nomenclatura unificada de la levadura.

II.1.3.1. Inducción

Es importante una regulación celular estricta para que el proceso autofágico se mantenga a un nivel basal no perjudicial y se induzca cuando sea necesario, ya que como este proceso tiene capacidad degradativa a gran escala, una degradación insuficiente o excesiva del citoplasma debido a un incorrecto control de la autofagia podría provocar varios grados de daño a la estabilidad y la integridad de la célula (Heiseke *et al.*, 2010). Para que se inicie la autofagia, los estímulos necesarios son captados a través de rutas de señalización que detectan cambios en la disponibilidad de nutrientes, como el complejo proteico que contiene a la diana de la rapamicina (*target of rapamycin complex 1*; TORC1) (Yin *et al.*, 2016). TOR, o mTOR (su homólogo en mamíferos), es una serina/treonina quinasa que detecta e integra varias señales ambientales para inhibir el catabolismo y coordinar el crecimiento celular. Se le considera el principal regulador negativo de la autofagia y el que mejor está caracterizado. Las vías de señalización mediante las que se puede activar incluyen el estado energético, factores de crecimiento, y niveles de nutrientes, principalmente de nitrógeno y aminoácidos (Kamada *et al.*, 2000; Laplante & Sabatini, 2012). La proteína quinasa A (*protein kinase A*; PKA) es otro regulador negativo del proceso autofágico, en este caso en respuesta a los niveles de carbono (Stephan *et al.*, 2009), mientras que el sensor de energía AMPK (*AMP-activated protein kinase*) actúa como regulador positivo (J. Kim *et al.*, 2011).

La iniciación del proceso autofágico es llevada a cabo por el complejo quinasa Atg1, formado por la serina/treonina quinasa Atg1, su subunidad reguladora Atg13, y el subcomplejo de andamiaje Atg17-Atg31-Atg29 (Kamada *et al.*, 2000). En condiciones de presencia de nutrientes, TORC1 mantiene la autofagia a un nivel basal mediante la

Tabla 1: Proteínas Atg/ATG de la maquinaria molecular central involucradas en la formación del autofagosoma. Adaptada de (Feng et al., 2014)

Complejo proteico	Proteína en levaduras	Proteína en mamíferos	Características y función
Complejo quinasa Atg1/ULK	Atg1	ULK1/2	Serina/treonina quinasa; fosforilada por TORC1; reclutamiento de proteínas Atg al PAS
	Atg13	ATG13	Subunidad reguladora; fosforilada por TORC1 y/o PKA; enlace entre Atg1 y Atg17
	Atg17	RB1CC1/FIP200	Proteína de andamiaje; forma complejo con Atg31 y Atg29
	Atg31		Forma complejo con Atg17 y Atg29
	Atg29		Forma complejo con Atg17 y Atg 31
	Atg11		Proteína de andamiaje en autofagia selectiva para la organización del PAS
Complejo PtdIns3K	Vps34	VPS34/PIK3C3	PtdIns 3-quinasa
	Vps15	VPS15/PIK3R4	Serina/treonina quinasa reguladora
	Vps30/Atg6	beclin-1/BECN1	Componente del complejo PtdIns3k-I y II
	Atg14	ATG14	Componente del complejo PtdIns3k-I
Atg9 y su sistema de transporte	Atg9	ATG9A/B	Proteína transmembrana; transporta la membrana al fagoforo
	Atg11		Transporte de Atg9 hacia el PAS
	Atg23		Transporte de Atg9 hacia el PAS
	Atg27		Transporte de Atg9 hacia el PAS
	Atg2	ATG2	Interactúa con Atg18; recuperación de Atg9 del PAS
	Atg18	WIPI2	Proteína de unión a PtdIns3P; recuperación de Atg9 del PAS
Sistema de conjugación Ubl Atg12	Atg12	ATG12	Proteína Ubl
	Atg7	ATG7	Enzima de activación de tipo E1
	Atg10	ATG10	Enzima de conjugación de tipo E2
	Atg16	ATG16L1	Interactúa con Atg5 y Atg12
	Atg5	ATG5	Conjugada con Atg12
Sistema de conjugación Ubl Atg8	Atg8	LC3A/B/C, GABARAP, GABARAPL1/2	Proteína Ubl; conjugada con FE
	Atg7	ATG7	Enzima de activación de tipo E1
	Atg3	ATG3	Enzima de conjugación de tipo E2
	Atg4	ATG4A/B/C/D	Cisteín-proteasa; enzima de desconjugación
Componentes implicados en la degradación y flujo de reciclaje	Atg15		Enzima lipasa; degradación de la membrana interna del autofagosoma
	Atg22		Permeasa integral de membrana; liberación de macromoléculas al citosol

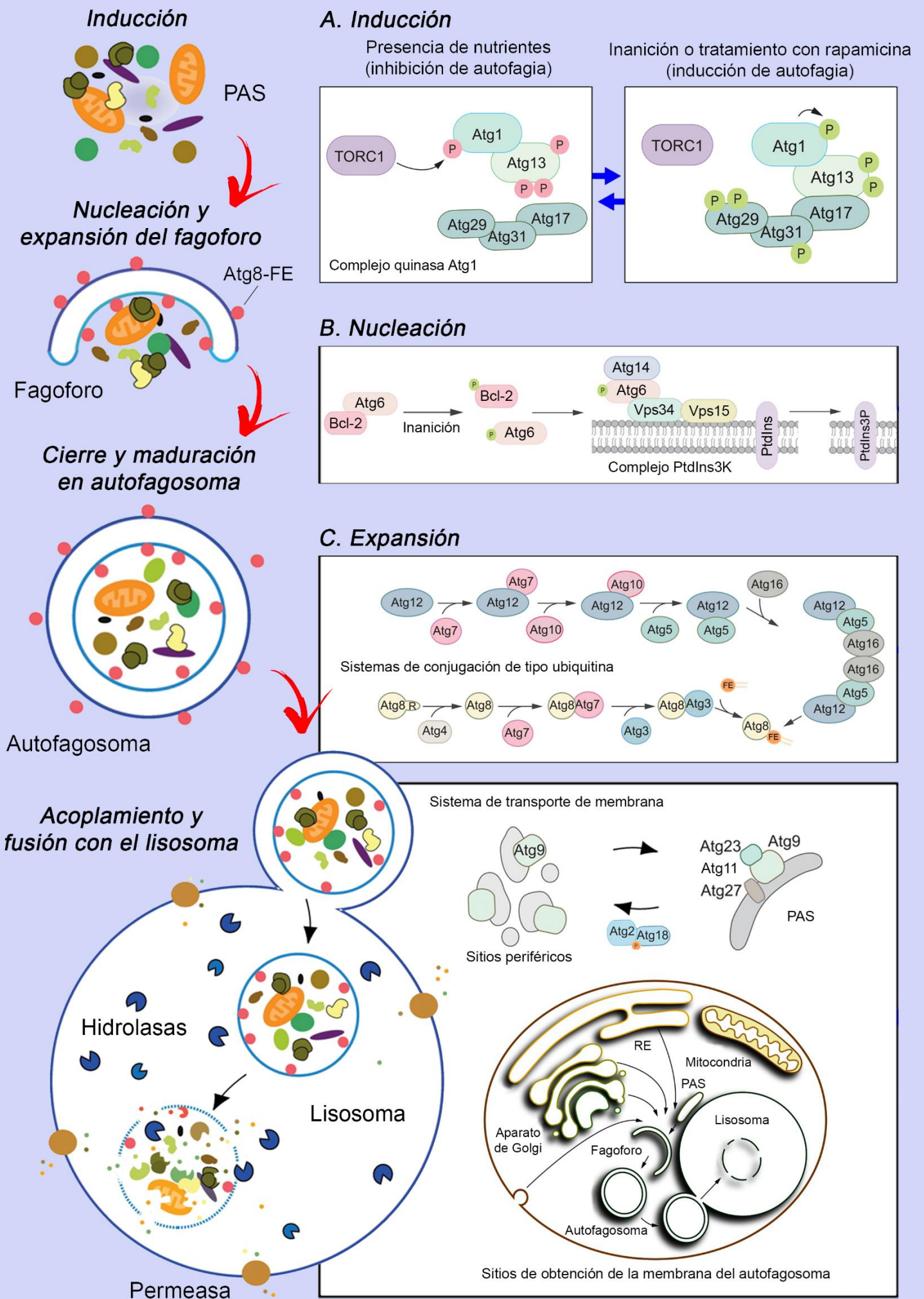


Figura 2: Mecanismos moleculares de la autofagia. Etapas de la formación del autofagosoma: (A) inducción, (B) nucleación del fagoforo, (C) expansión y maduración en autofagosoma, fusión con el lisosoma, y degradación y reciclaje de la carga. Adaptada de (Reggiori & Klionsky, 2013; Ariosa & Klionsky, 2016; Yin *et al.*, 2016)

fosforilación directa de ciertas proteínas, incluidas Atg1 y Atg13, impidiendo la activación del complejo Atg1-Atg13-Atg17-Atg31-Atg29 y evitando la inducción de la autofagia (Figura 2A). Durante la inanición, o tratamientos con compuestos químicos como la rapamicina, se inicia una cascada de señalización intracelular que inhibe a TORC1, permitiendo la desfosforilación de Atg1 y Atg13. En esta situación, Atg1 se auto-fosforila, dando como resultado un incremento en su actividad quinasa y la activación de la autofagia. En su forma inducida, Atg1 actúa como un regulador y participa en el reclutamiento y activación de otras proteínas Atg, lo que permite que se trasladen al sitio de formación del fagoforo y comiencen la nucleación (K. Suzuki *et al.*, 2007; Papinski *et al.*, 2014; Ariosa & Klionsky, 2016).

Al igual que muchos otros procesos celulares, la inducción de la autofagia no solo implica la modificación y acción post-traduccionales de las proteínas Atg, sino también una activación transcripcional coordinada de los genes *Atg* (M. Jin & Klionsky, 2014). Para explorar en profundidad la regulación transcripcional de los genes *Atg*, las dianas de los principales reguladores autofágicos como TORC1, y cómo está regulada específicamente cada proteína Atg, los investigadores han comenzado a analizar proteínas reguladoras y factores de transcripción implicados en el control de la autofagia. Durante los últimos años, varias de estas moléculas han sido identificadas y caracterizadas (Yin *et al.*, 2016). Entre ellas, el factor de transcripción E2F1 (*E2F transcription factor 1*) regula la autofagia incrementando el nivel de transcritos de *BNIP3* (*Bcl2-interacting protein 3*), un miembro BH3-only (*Bcl-2 homology-3*) de la familia de proteínas Bcl-2 que activa la autofagia en condiciones de hipoxia (Shaw *et al.*, 2008; Bellot *et al.*, 2009). Además, E2F1 también induce la actividad autofágica activando la expresión ciertos genes *Atg*, como *Atg1*, *Atg5* y *Atg8* (Polager *et al.*, 2008; Polager & Ginsberg, 2009).

Otras moléculas reguladoras que controlan la autofagia son la ubiquitina-ligasa FBXW7 (*F-box and WD repeat domain containing 7*), que incrementa el flujo autofágico mediante la degradación de TORC1, el RNA no codificante *GAS5* (*growth arrest-specific 5*), eIF2 α (*eukaryotic initiation factor 2 α*), Ire-1 (*Inositol-requiring enzyme 1*), IP₃R (*Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*), Erk1/2 (*Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2*), DAPk (*Death-associated protein kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), la proteína supresora de tumores p53, GTPasas, y el calcio (Meijer & Codogno, 2006; Criollo *et al.*, 2007; Maiuri *et al.*, 2007; Rubinsztein *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2016;

N. Zhang *et al.*, 2016). Algunos estímulos adicionales que son capaces de inducir la autofagia, y que pueden ser más complejos y estar más interconectados a nivel del organismo, incluyen el estrés del RE, el amonio procedente de aminoácidos, el agotamiento de hierro, la densidad celular, factores hormonales y la temperatura (Levine & Kroemer, 2008; Yin *et al.*, 2016).

II.1.3.2. Nucleación del fagoforo

En la autofagia, la nucleación se refiere al proceso de movilización y reclutamiento de proteínas necesarias para la posterior expansión del fagoforo. El sitio celular propuesto en levaduras donde se produce la nucleación del fagoforo y formación del autofagosoma es el PAS (*phagophore assembly site*) (K. Suzuki *et al.*, 2001; J. Kim *et al.*, 2002). El PAS se puede definir como una estructura formada por la vesícula en formación (fagoforo) y las proteínas de la maquinaria central, cuya configuración exacta depende de la etapa del proceso de formación en la que se encuentre el autofagosoma. Aunque en eucariotas más complejos falta un sitio de PAS definitivo, la asociación entre las proteínas Atg y el fagoforo ha sido observada tanto en células de levadura como de mamífero, si bien las últimas muestran múltiples ubicaciones subcelulares de colocalización, posiblemente correspondientes a varios sitios de PAS (Mizushima *et al.*, 2001; Mizushima, Kuma, *et al.*, 2003). Las acciones coordinadas de la maquinaria central en el PAS producen la expansión y transformación del fagoforo en el autofagosoma. Durante este proceso, la mayoría de las proteínas de la maquinaria central, a excepción de Atg8, se excluyen de la vesícula cuando ésta se ha completado y se reubican en sitios periféricos distintos al PAS (Xie & Klionsky, 2007).

En *S. cerevisiae*, Vps34 y Vps15, junto con Atg6 y Atg14, forman el complejo de clase III fosfatidilinositol 3-quinasa (PtdIns3K), que es la maquinaria de nucleación que se recluta en el PAS tras la inducción del proceso. La función de este conjunto de proteínas consiste en catalizar en la membrana del PAS la conversión de fosfatidilinositol (PtdIns) a fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns3P) (Figura 2B) (Burman & Ktistakis, 2010). La formación de esta última molécula sirve como señal de reclutamiento que permite que varias proteínas Atg que presentan alta afinidad por PtdIns3P, como Atg18, se unan a ella en el sitio de nucleación (Yin *et al.*, 2016).

Vps15 (*vacuolar protein sorting 15*) es una serina/treonina quinasa reguladora que interactúa con Vps34 y la activa, siendo requerida para la asociación de Vps34 a la membrana del PAS (Stack *et al.*, 1993). Además de participar en la autofagia, Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*) también interviene en varias vías de transporte vesicular de endosomas y lisosomas (Lindmo & Stenmark, 2006), mientras que beclin-1, el homólogo mamífero de Atg6, funciona principalmente en la autofagia (Zeng *et al.*, 2006). Un mecanismo de control importante que regula negativamente el proceso autofágico es el complejo de interacción Atg6-Bcl-2. En presencia de nutrientes, Bcl-2 inhibe directamente la autofagia al unirse a Atg6 y evitar que esta proteína se asocie al complejo PtdIns3K. Por el contrario, durante la inanición, Bcl-2 se disocia de Atg6, permitiendo que éste último realice su función en la formación de PtdIns3K (Figura 2B). Además, Atg6 puede servir como un adaptador molecular que permite que el complejo PtdIns3K se una a varias proteínas, formando diferentes formas funcionales que pueden aumentar o suprimir la formación del autofagosoma (Ariosa & Klionsky, 2016).

II.1.3.3. Expansión del fagoforo y maduración en autofagosoma

El fagoforo es el compartimento activo de captación de la carga en la autofagia, y es relativamente transitorio en comparación con el autofagosoma. Debido a esto, la investigación actual ha centrado su atención en este último, a pesar de que el autofagosoma es en esencia un compartimento terminal cuya función únicamente consiste en fusionarse con el lisosoma, cuando en realidad, los pasos realmente activos de la autofagia son la formación del fagoforo y la captación de la carga (Yin *et al.*, 2016).

A diferencia de las vesículas utilizadas en otros procesos celulares, como la exocitosis y endocitosis, donde las vesículas utilizadas son generalmente de un tamaño uniforme y nacen de un orgánulo preexistente que ya contiene su carga, el autofagosoma se forma *de novo*, es decir, se genera por adición de componentes y puede ser de tamaño variable en función de la carga (Yin *et al.*, 2016). La membrana necesaria para expandir el fagoforo debe administrarse desde varios lugares de la célula, ya que en el PAS no se produce síntesis de lípidos (Ariosa & Klionsky, 2016). Aún se debate sobre la fuente de la membrana que se incorpora, pues se ha observado que proviene tanto del RE como de la membrana plasmática, así como de la membrana externa de la mitocondria (Figura 2C) (Cuervo, 2010a). El componente principal de reclutamiento de membrana es la proteína transmembrana Atg9. El movimiento bidireccional de Atg9 entre el PAS y sitios

periféricos al PAS es necesario para la formación del autofagosoma, y se ha sugerido que este traslado podría contribuir al tránsito y entrega de material de membrana necesario para el crecimiento y expansión del fagoforo (Reggiori *et al.*, 2005; Mari *et al.*, 2010), aunque no está claro si este movimiento lo realiza solo una vez de forma sincronizada, o si se traslada continuamente durante la formación de cada autofagosoma. El transporte eficaz de Atg9 desde los supuestos sitios donantes de membrana al PAS durante condiciones de inanición depende de los factores de transporte Atg11, Atg23 y Atg27, mientras que la recuperación de Atg9 del PAS en presencia de nutrientes depende de Atg2, Atg18 y del complejo quinasa Atg1 (Figura 2C) (Feng *et al.*, 2014).

La autofagia emplea el uso de dos sistemas de conjugación de tipo ubiquitina para extender y alargar el fagoforo. En las levaduras, estos sistemas incluyen dos proteínas Ubl (*ubiquitin-like*), Atg8 y Atg12, y varias enzimas que las modifican covalentemente para generar sus respectivas formas conjugadas (Ohsumi, 2001). En organismos más complejos estos sistemas Ubl se conservan, con homólogos de mamíferos que funcionan de manera similar a los de la levadura. No obstante, una distinción importante es la presencia de numerosos homólogos de Atg8 (LC3-A, LC3-B, LC3-C, GABARAP y GABARAPL1/2) (Feng *et al.*, 2014). MAP1-LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*), o LC3, presenta tres isoformas diferentes: LC3-A, LC3-B y LC3-C, las cuales muestran similitudes y diferencias funcionales (Mann & Hammarback, 1994). A pesar de que las tres tienen una región conservada requerida para la formación del autofagosoma, y experimentan el mismo tipo de modificación covalente que Atg8, la isoforma más frecuentemente utilizada como marcador para monitorizar la autofagia en mamíferos es LC3-B (Wu *et al.*, 2006; Mizushima & Yoshimori, 2007; H. Suzuki *et al.*, 2014). No obstante, la importancia y función de cada isoforma se encuentra todavía bajo investigación.

In vivo, la glicina C-terminal de Atg12 se une a una lisina interna de Atg5, una reacción que depende de la enzima de activación de tipo E1, Atg7, y de la enzima de conjugación de tipo E2, Atg10 (Figura 2C) (Mizushima, Yoshimori, *et al.*, 2003). Posteriormente, el conjugado Atg12-Atg5 forma un complejo multimérico con Atg16, el cual se asocia a la membrana por mediación de Atg5 (Mizushima, Kuma, *et al.*, 2003). Durante la segunda reacción de conjugación Ubl, el residuo C-terminal de arginina de Atg8 es procesado primero por la cisteín-proteasa Atg4 para exponer un residuo de

glicina, dando lugar a la forma llamada LC3-I en mamíferos (Hemelaar *et al.*, 2003). La proteína es a continuación reconocida y procesada por Atg7, y por su propia enzima de conjugación de tipo E2, Atg3. Finalmente, Atg8 se une covalentemente a una molécula lipídica de fosfatidiletanolamina (FE), formando Atg8-FE en levaduras y LC3-II en mamíferos (Ohsumi, 2001; Ichimura *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2014). Esta última reacción de unión requiere al complejo Atg12-Atg5-Atg16, el cual actúa como enzima de tipo E3, facilitando la lipidación de Atg8 y dirigiendo su correcta localización en la membrana del PAS (Mizushima, Yoshimori, *et al.*, 2003). Durante la formación del autofagosoma, Atg8-FE y el complejo Atg12-Atg5-Atg16 se encuentran integrados en la membrana fagoforo mientras ésta se expande. Atg12-Atg5-Atg16 se localiza principalmente en el lado externo del fagoforo, mientras que Atg8-FE no muestra una preferencia por ninguno de los lados (Xie & Klionsky, 2007). Aunque está bien establecido que los dos sistemas Ubl son esenciales para la autofagia y se necesitan para la formación normal del autofagosoma, se desconoce cuál es la función exacta de estas proteínas y cómo sus reacciones de modificación covalente favorecen la expansión y maduración del fagoforo (Ariosa & Klionsky, 2016).

Una vez completada la formación del autofagosoma, el complejo Atg12-Atg5-Atg16 es liberado al citosol y la vesícula se dirige al orgánulo degradativo para acoplarse y fusionarse con él. Por el contrario, una cantidad significativa de Atg8-FE permanece en el autofagosoma completo durante su transporte al lisosoma (Mizushima *et al.*, 2001; Mizushima, Kuma, *et al.*, 2003). Como Atg8-FE se asocia de manera estable con la membrana autofagosomal, la autofagia se puede detectar bioquímicamente o microscópicamente mediante la evaluación del nivel de este marcador (Kabeya *et al.*, 2000). Durante las etapas finales de la autofagia, la población de Atg8-FE que se encuentra en el lado externo del autofagosoma, se disocia de la membrana y de FE de una manera dependiente de Atg4, un paso previo que inicia el desensamblaje de las proteínas Atg del autofagosoma maduro y que es necesario para que inicie la fusión (Xie & Klionsky, 2007; Ariosa & Klionsky, 2016).

II.1.3.4. Fusión con el lisosoma y degradación

La fusión eficaz del autofagosoma con el lisosoma o la vacuola, el análogo del lisosoma en levaduras, permite la entrega de la carga interna en la luz del orgánulo, dando como resultado la formación de un cuerpo autofágico en levaduras, o un

autolisosoma/autofagolisosoma en eucariotas superiores. Aunque el mecanismo que controla el momento de la fusión sigue siendo en gran parte desconocido, se han identificado recientemente varias proteínas que facilitan la fusión y son miembros de otros procesos celulares que también están implicados en mecanismos de transporte de entrega de la carga al lisosoma, e incluyen las proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), el complejo de clase C Vps/HOPS (*homotypic fusion and vacuolar protein sorting-tethering complex*), y miembros de la familia de proteínas ESCRT (Ariosa & Klionsky, 2016). Tras la fusión, la membrana interna del autofagosoma que envuelve la carga se degrada por la lipasa Atg15, y la población de Atg8-FE asociada al lado interno se libera a la luz del lisosoma (Epple *et al.*, 2001). Tanto el contenido del autofagosoma como Atg8-FE, se degradan por hidrolasas, y los metabolitos resultantes generados en el proceso proteolítico, principalmente aminoácidos, son liberados al citoplasma a través de diversas permeasas localizadas en la membrana, como Atg22, y reutilizados por la célula (Yang *et al.*, 2006).

II.1.4. PAPEL FISIOLÓGICO

La autofagia es un mecanismo de supervivencia esencial que actúa principalmente como una respuesta catabólica adaptativa a la adversidad ambiental. Aunque de manera fisiológica ocurre de manera constitutiva a un nivel basal, la autofagia incrementa rápidamente su actividad cuando las células están expuestas a condiciones extremas de estrés metabólico, especialmente, a la privación de nutrientes, una de las amenazas más comunes para muchos organismos (Kroemer *et al.*, 2010). La respuesta más simple de la autofagia es servir de fuente de energía durante la inanición: cuando hay una falta de nutrientes en el entorno o los recursos se vuelven limitados, la célula se ve obligada a descomponer y reciclar parte de sus propias reservas, incluido material celular preexistente como proteínas, lípidos y carbohidratos, para satisfacer las demandas de sustratos metabólicos. Mediante esta forma de auto-digestión, la célula genera aminoácidos y ácidos grasos libres que pueden administrarse a otros sitios del organismo, o reciclarse para sintetizar y renovar macromoléculas y componentes celulares esenciales y así mantenerse con vida hasta que la situación mejore. Adicionalmente, los aminoácidos generados, junto con los ácidos grasos, pueden ser procesados y utilizados por el ciclo de Krebs para mantener la producción del ATP celular (Levine & Kroemer, 2008). En organismos unicelulares como las levaduras, esta respuesta a la inanición es una de las

funciones básicas de la autofagia, aunque en realidad, este papel se extiende también a los humanos y a otros mamíferos. A modo de ejemplo, a lo largo del día, la autofagia se activa entre comidas en órganos como el hígado para mantener sus funciones metabólicas, suministrando aminoácidos y energía a través del proceso catabólico (Kuma *et al.*, 2004; Mizushima & Klionsky, 2007). El requisito para esta función no se limita a la falta de nutrientes, ya que, en ciertos entornos, especialmente en ausencia de factores de crecimiento u oxígeno, o cuando las células tienen alta necesidad energética, la autofagia también se activa para mantener la homeostasis celular (Levine & Kroemer, 2008).

El descubrimiento de los genes y proteínas Atg en la levadura y su posterior estudio en profundidad en varios modelos animales y celulares, ha permitido confirmar que la autofagia desempeña una función fisiológica esencial en la supervivencia del organismo durante el estrés nutricional. Tal vez la evidencia *in vivo* más clara de esta función ha sido proporcionada por estudios de eliminación de genes *Atg* fundamentales, como *Atg5* o *Atg7*, donde los animales mueren pocas horas después del nacimiento debido a su incapacidad para adaptarse al periodo de inanición neonatal (Kuma *et al.*, 2004; Komatsu *et al.*, 2005). Además, este tipo de estudios ha revelado la importancia de la autofagia en diversos procesos fisiológicos adicionales, como el control de la calidad intracelular, desarrollo y diferenciación celular, inmunidad innata y adaptativa, estabilidad del genoma, longevidad, muerte celular y participación frente al estrés del RE (Levine & Yuan, 2005; Lum, DeBerardinis, *et al.*, 2005; Maiuri *et al.*, 2007; Yorimitsu & Klionsky, 2007; Levine & Kroemer, 2008; Mizushima *et al.*, 2008).

II.1.4.1. Autofagia en el control de la calidad intracelular

Para funcionar de manera eficiente, las células deben mantener el contenido total de proteínas expresadas en un estado estable, lo cual es particularmente complicado debido a la inherente naturaleza inestable de muchas proteínas en condiciones fisiológicas. La homeostasis proteica, o proteostasis, se define como el equilibrio entre la síntesis y la degradación necesarias para eliminar y reemplazar las proteínas, y engloba las diversas rutas y procesos biológicos que controlan tanto la síntesis y degradación proteica, como su procesamiento y tráfico dentro de las células. Casi 1.400 proteínas regulan la proteostasis en células de mamíferos, como parte de una red estrechamente coordinada (Powers *et al.*, 2009; Y. E. Kim *et al.*, 2013). De esta manera, las células emplean varios mecanismos de control de la calidad destinados a degradar y reciclar

material celular para mantener la homeostasis interna y preservar la viabilidad. Entre estos mecanismos se encuentra el proteasoma y las rutas lisosómicas, que incluyen vías endocíticas y autofágicas (Majeski & Dice, 2004).

Autofagia y proteasoma

Las dos principales rutas de degradación de los componentes celulares que utilizan los organismos eucariotas son la autofagia y el sistema ubiquitina-proteasoma (*ubiquitin-proteasome system*; UPS) (X. Wang *et al.*, 2008). El UPS degrada fundamentalmente proteínas normales de vida media corta después de haber cumplido su función en la célula, como por ejemplo proteínas involucradas en la regulación de la división celular, en la transcripción de genes, en la transducción de señales, o en la endocitosis (Hochstrasser, 1995). Durante este proceso, las proteínas son marcadas para la degradación mediante una conjugación covalente con ubiquitina (Ub) en una reacción secuencial en la que participan varias enzimas (P. C. Lee *et al.*, 2011). Posteriormente, el reconocimiento y degradación del sustrato ubiquitinado lo lleva a cabo el proteasoma (Bedford *et al.*, 2010). La autofagia, por su parte, se encarga de la degradación de proteínas de vida media larga y orgánulos enteros (Yoshimori, 2004). No obstante, la preferencia por el sustrato de estos sistemas proteolíticos es relativa, ya que hay estudios que indican que el UPS también puede participar en la degradación de proteínas de vida larga, y la autofagia en la degradación de proteínas de vida corta (Fuertes, Martin De Llano, *et al.*, 2003; Fuertes, Villarroja, *et al.*, 2003).

El UPS y la autofagia también funcionan como sistema de protección frente a las proteínas mal plegadas o dañadas (Zheng *et al.*, 2009). En condiciones normales, la célula controla de manera eficiente las proteínas mal plegadas a través del replegamiento mediado por chaperonas y enzimas plegadoras. Estas moléculas representan una importante vía de control de la calidad y se localizan principalmente en el citoplasma y en el RE, donde median el plegamiento adecuado de las proteínas recién traducidas, previenen la agregación proteica y dirigen la degradación de proteínas mal plegadas (Sitia & Braakman, 2003). Por lo general, las chaperonas se subdividen en tres tipos: Grp (*glucose-regulated protein*), Pdi (*protein disulfide isomerase*) y Hsp (*heat shock protein*) (Schroder & Kaufman, 2005). Cuando fracasan los intentos de replegamiento por parte de las chaperonas, las proteínas mal plegadas son dirigidas a la degradación a través de la actividad proteolítica combinada del UPS y de la autofagia, por lo que la colaboración e

interacción entre ambos sistemas resulta esencial para el control de la calidad proteica (Zheng *et al.*, 2009).

Sin embargo, cuando la capacidad celular para eliminar las proteínas mal plegadas se ve abrumada, las proteínas tienden a formar agregados, que son generalmente más difíciles de replegar y degradar. En esta situación, las células han desarrollado un sistema que implica la agregación de los propios agregados proteicos en cuerpos de inclusión especializados, denominados agresomas (Johnston *et al.*, 1998). Durante este mecanismo, los agregados de proteínas se transportan a lo largo de los microtúbulos hacia el centro organizador de microtúbulos, en donde forman una estructura esférica, generalmente de 1 a 3 μm de diámetro, llamada agresoma, que contiene proteínas, chaperonas, enzimas de ubiquitinación y componentes del proteasoma. La formación de estos cuerpos de inclusión forma parte de una respuesta protectora de la célula, ya que los agresomas restringen la distribución intracelular de la proteína mal plegada (Taylor *et al.*, 2003), activan la ruta autofágica (García-Mata *et al.*, 2002), y se unen a proteínas motoras asociadas a los microtúbulos como la dineína, lo que permite su transporte retrógrado a lo largo de la red de microtúbulos para facilitar el suministro de los agregados proteicos dispersados a la maquinaria proteolítica para su degradación (Kopito, 2000; Johnston *et al.*, 2002).

Si bien hasta hace no mucho tiempo el UPS y la autofagia se consideraban dos vías proteolíticas paralelas, muchos de los estudios publicados en los últimos años han hecho cambiar esta percepción considerablemente. La evidencia actual indica que la inhibición del proteasoma, de manera farmacológica o por manipulación genética, produce la inducción de la autofagia como una respuesta protectora celular (Pandey *et al.*, 2007). De forma similar, la inhibición de la autofagia da como resultado un aumento en la actividad proteasómica (Zhu *et al.*, 2007), lo que sugiere que ambos procesos se comportan como mecanismos compensatorios en el control de la calidad proteica. Existen varias proteínas de señalización que conectan la vía proteasómica con la vía autofágica, estableciendo un vínculo funcional entre ambos sistemas. Entre ellas se encuentra la proteína p62, o SQSTM1 (*sequestosome 1*), una molécula adaptadora que facilita la degradación selectiva de las proteínas ubiquitinadas transportándolas a la maquinaria autofágica (Bjorkoy *et al.*, 2005; Bjorkoy *et al.*, 2006). El fragmento C-terminal de p62 se une al sustrato ubiquitinado a través del dominio UBA (*ubiquitin-associated*), y a LC3

a través de la región LIR (*LC3-interacting region*), lo que permite a p62 formar y degradar agregados de proteínas ubiquitinadas a través de la autofagia (Pankiv *et al.*, 2007). Por otro lado, el fragmento N-terminal de p62 interactúa con el proteasoma a través del dominio UBL (*ubiquitin-like*) para transportar sustratos hacia la degradación proteasomal (Seibenhener *et al.*, 2004). El aumento en los niveles proteicos de p62 en respuesta a la inhibición del proteasoma, sugieren que el UPS puede degradar p62 (Pankiv *et al.*, 2007). Además, varios estudios indican que p62 se colocaliza con los autofagosomas y puede ser degradado por la autofagia (Pankiv *et al.*, 2007), ya que los niveles de esta proteína disminuyen tras el tratamiento con estimuladores de la autofagia como la rapamicina (Bjorkoy *et al.*, 2005) y aumentan tras la inhibición de la misma (Bjorkoy *et al.*, 2005; Yue, 2007). Debido a ello, la acumulación de p62 se considera un signo de mal funcionamiento autofágico (Bjorkoy *et al.*, 2009).

Autofagia y exosomas

Mientras que los componentes citosólicos y los orgánulos se administran a los lisosomas para su degradación a través de la vía autofágica, el material extracelular y las proteínas de membrana se administran a través de la vía endocítica, por lo tanto, tanto los autofagosomas como los endosomas convergen en el lisosoma para entregar su carga para la degradación (Figura 3). Además de estos sistemas, en algunas situaciones las células eliminan el material no deseado o dañado a través de su liberación al entorno extracelular por medio de exosomas. De esta manera, los exosomas son utilizados por la célula como un método para aliviar las condiciones de estrés intracelular mediante la secreción selectiva de material nocivo o no deseado, como proteínas y RNA dañado, a través de estas vesículas, lo cual, en coordinación con la vía autofágica, resulta esencial para mantener la homeostasis de la célula (Baixauli *et al.*, 2014).

Los exosomas son pequeñas vesículas membranosas que se encuentran en todos los fluidos corporales (Yanez-Mo *et al.*, 2015). Presentan un diámetro que varía de 50 a 150 nm, y se liberan en casi todos los tipos celulares al entorno extracelular de manera constitutiva, aunque varias señales de activación, como el estrés celular, pueden modular su secreción (Villarroya-Beltri *et al.*, 2014). A diferencia de otros tipos de vesículas extracelulares liberadas por las células, como las microvesículas, que se generan directamente a partir de la membrana plasmática, los exosomas tienen origen endocítico, y se forman como vesículas intraluminales mediante la invaginación de la membrana

limitante de los endosomas tardíos, también denominados cuerpos multivesiculares (CMV) (Raposo & Stoorvogel, 2013).

Principalmente, los exosomas contienen proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en forma de mRNA y RNA no codificante, incluidos microRNAs (miRNAs). La carga de proteínas en los exosomas se controla a través de varios mecanismos, la mayoría de los cuales todavía no se comprenden por completo, aunque se sabe que la maquinaria ESCRT, compuesta por cuatro complejos multiméricos, ESCRT-0, -I, -II y -III, es esencial para la clasificación de las proteínas y la formación de las vesículas intraluminales en los CMV (Kowal *et al.*, 2014). Mediante estudios de análisis de secuenciación, se ha observado que algunas especies de RNA, como RNA ribosómico, RNA fragmentado, y RNA estructural, son particularmente abundantes en los exosomas, mientras que otros apenas se detectan (Nolte-'t Hoen *et al.*, 2012; Villarroya-Beltri *et al.*, 2013). Además, los exosomas también contienen repertorios específicos de ciertos tipos de mRNA y miRNAs (Mittelbrunn *et al.*, 2011; Guduric-Fuchs *et al.*, 2012; Nolte-'t Hoen *et al.*, 2012; Villarroya-Beltri *et al.*, 2013).

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificantes de proteínas, de unos 21-23 nucleótidos de longitud, que regulan la expresión génica de manera post-transcripcional mediante la inhibición o degradación del mRNA, desempeñando un papel fundamental en varios procesos biológicos, como en la supervivencia y función neuronal (S. S. Hebert & De Strooper, 2009). Los miRNAs pueden regular proteínas específicas implicadas en procesos celulares como la autofagia, lo cual resulta fundamental para aliviar el estrés celular (Shah *et al.*, 2018). En concreto, los miRNA-27a y miRNA-27b regulan el mecanismo autofágico para eliminar mitocondrias dañadas (J. Kim *et al.*, 2016), y los miRNA-181a y miRNA-299-5p sensibilizan las células a la apoptosis mediante la supresión de la autofagia (Cheng *et al.*, 2016; Y. Zhang *et al.*, 2016). A su vez, la autofagia también puede regular la homeostasis y actividad de los miRNAs, ya que, aunque no degrada los miRNAs directamente, puede degradar de manera selectiva varias enzimas de procesamiento que regulan su biogénesis (Gibbings *et al.*, 2012).

Una vez se forman las vesículas intraluminales, el CMV puede fusionarse con los lisosomas para degradar su contenido, o con la membrana plasmática, liberando las vesículas al entorno extracelular en forma de exosomas, aunque se desconoce qué tipo de señales o mecanismos coordinan el destino de los CMV (Figura 3) (B. B. Guo *et al.*,

2016). Mediante esta forma de secreción celular, los exosomas pueden transferir su contenido desde la célula donante a otras células, propagando señales a las células circundantes para coordinar respuestas sistémicas y regulando a larga distancia las propiedades de las células receptoras (Mittelbrunn & Sanchez-Madrid, 2012). De esta manera, los exosomas desempeñan una función primordial en la comunicación intercelular en varios procesos fisiológicos, como el desarrollo del organismo, las respuestas inmunitarias, la comunicación neuronal y glial, y la reparación de tejidos (Korkut *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2010; Fruhbeis *et al.*, 2013; Robbins & Morelli, 2014).

La evidencia actual sugiere que existe una estrecha relación, tanto a nivel molecular como funcional, entre las diferentes vías de autofagia, y la biogénesis y secreción de los exosomas, como indica el descubrimiento de la anteriormente descrita microautofagia endosomal (Sahu *et al.*, 2011). Aunque durante el proceso de macroautofagia, los autofagosomas se fusionan de manera general con los lisosomas, también pueden fusionarse con vesículas endosomales como los CMV, formando una vesícula denominada anfisoma, la cual, posteriormente, se fusiona con el lisosoma (Figura 3) (Sanchez-Wandelmer & Reggiori, 2013). Algunos estudios han demostrado que las mutaciones en los componentes de la maquinaria ESCRT, dan lugar a un mayor número de autofagosomas y una actividad autofágica aumentada para evitar la acumulación perjudicial de CMV disfuncionales (J. A. Lee *et al.*, 2007; Djeddi *et al.*, 2012). Además, la modulación de la ruta autofágica permite regular la formación de los CMV y la liberación de los exosomas (Fader & Colombo, 2006). En condiciones que estimulen la autofagia, como la inanición, tratamiento con rapamicina, o sobreexpresión de LC3, los CMV se dirigen a la vía autofágica, inhibiendo la secreción de exosomas de la célula (Fader *et al.*, 2008). Este tipo de interacción entre la autofagia selectiva y los CMV permite regular la homeostasis del RNA celular y la actividad de los miRNAs, ya que la coordinación entre ambos procesos puede determinar el destino de ciertos miRNAs para ser exportados en exosomas (Baixauli *et al.*, 2014). El equilibrio entre la inducción de la autofagia y la liberación de exosomas podría estar regulado por el estado metabólico concreto de la célula, aunque actualmente se desconoce qué sensores metabólicos regulan el destino de ciertas moléculas hacia la degradación autofágica o secreción en exosomas.

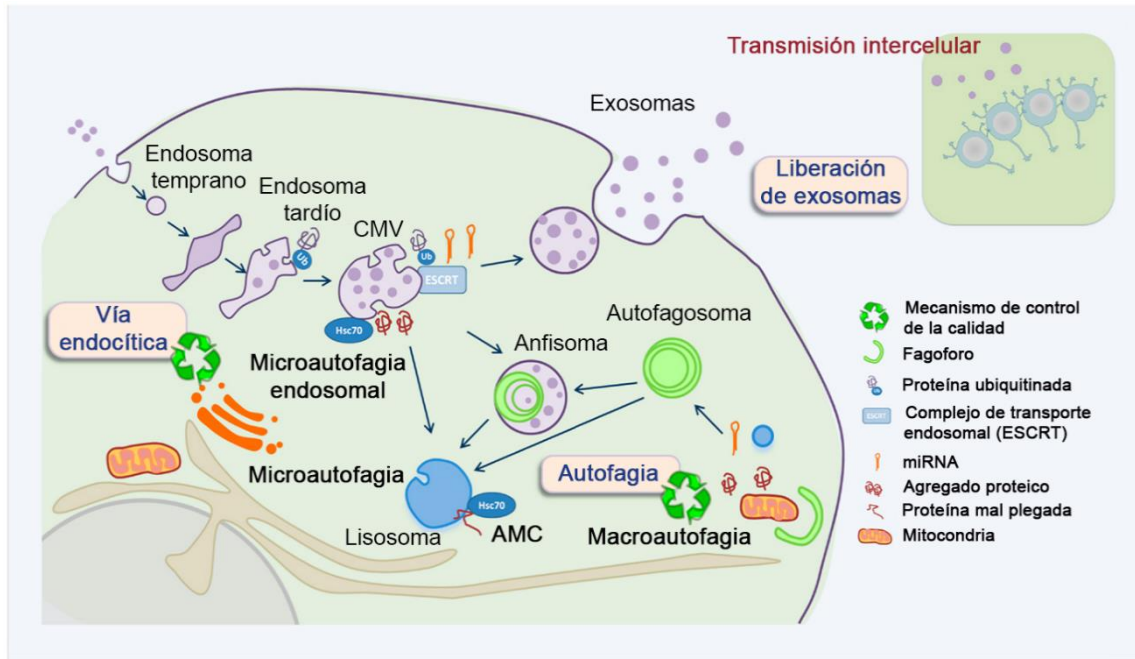


Figura 3: Coordinación entre la liberación de exosomas y la autofagia en el mantenimiento de la homeostasis celular. La secreción de exosomas al entorno extracelular es una forma alternativa de aliviar el estrés intracelular cuando los sistemas degradativos se encuentran comprometidos. De esta manera, los exosomas pueden transferir su contenido desde la célula donante a otras células, desempeñando funciones de comunicación intercelular. Adaptada de (Baixauli *et al.*, 2014).

II.1.4.2. Autofagia en el desarrollo y diferenciación celular

La capacidad de la autofagia para responder rápidamente a señales ambientales externas y modificar la arquitectura intracelular, le permite ser un mecanismo esencial de remodelación estructural de la célula durante el desarrollo del organismo (Di Bartolomeo *et al.*, 2010; Mizushima & Levine, 2010). En mamíferos, la autofagia es vital para el desarrollo embrionario previo a la implantación, la supervivencia de los recién nacidos, y la organogénesis. Por ejemplo, la autofagia actúa durante la transición a la lactancia mediante el suministro de nutrientes, ya que, tras el nacimiento, la entrega de nutrientes placentarios de la madre termina de forma repentina, lo que expone a los recién nacidos a una severa inanición (Kuma *et al.*, 2004). Durante las últimas etapas del desarrollo embrionario y postnatal, la autofagia también desempeña un papel importante en la cardiogénesis, la osteogénesis, el desarrollo del sistema nervioso central (SNC), y la diferenciación celular (Di Bartolomeo *et al.*, 2010).

Además, varios estudios demuestran que la autofagia controla el tamaño de la célula (Neufeld, 2003; Aladzsisy *et al.*, 2007; Vellai *et al.*, 2008). En organismos

pluricelulares, la disponibilidad de nutrientes y de factores de crecimiento está íntimamente relacionada con el tamaño de la célula, el cual requiere de un balance adecuado entre la síntesis y la degradación de macromoléculas. Por otro lado, la autofagia regula también la proliferación celular (Cianfanelli *et al.*, 2015). En condiciones de falta de nutrientes o de factores de crecimiento, la autofagia incrementa su nivel basal para favorecer la degradación de las reservas celulares y detener el ciclo celular, haciendo que las células adopten un estado metabólico quiescente (G. Yao, 2014). Cuando los nutrientes vuelven a estar disponibles, la autofagia se inhibe y las células continúan proliferando.

En el SNC la autofagia neuronal desempeña un papel importante en el crecimiento de la sinapsis y la plasticidad requeridas para el aprendizaje y la memoria (Son *et al.*, 2012). La inducción de la actividad autofágica mediante la sobreexpresión de Atg1 potencia el crecimiento sináptico, mientras que la inhibición a través de mutaciones en determinados genes reduce el tamaño de la sinapsis, de manera que su disminución o aumento da como resultado un efecto proporcional en el tamaño de esta estructura (Shen & Ganetzky, 2009). Por el contrario, el UPS es un importante regulador negativo del crecimiento sináptico en la unión neuromuscular, por lo que ambos procesos convergen para regular el desarrollo de la sinapsis (Wan *et al.*, 2000).

II.1.4.3. Autofagia e inmunidad

Además de participar en la eliminación de proteínas y orgánulos, la autofagia ha evolucionado como una forma primaria de inmunidad innata contra la invasión microbiana. Este mecanismo de defensa celular, conocido como xenofagia, es capaz de reconocer microorganismos patógenos intracelulares de manera selectiva, como bacterias, virus y protozoos, y dirigirlos a la maquinaria autofágica para degradarlos (Deretic & Levine, 2009). Por el contrario, algunos microorganismos han evolucionado para evadir o incluso subvertir la autofagia para sus propios fines, estableciendo un nicho de replicación dentro de los autofagosomas, o dependiendo de la autofagia para obtener nutrientes (Ravikumar *et al.*, 2010). Además de prevenir enfermedades infecciosas, la autofagia desempeña otras funciones en la inmunidad, como el control de la respuesta proinflamatoria, la presentación de antígenos, y la regulación del desarrollo del sistema inmune (Deretic *et al.*, 2013).

II.1.4.4. Autofagia en la estabilidad del genoma

La maquinaria autofágica protege al genoma limitando el daño del DNA y la inestabilidad cromosómica (Mathew *et al.*, 2007). Indirectamente, esta función ejerce efectos protectores evitando el inicio y la progresión de un tumor, el envejecimiento y la neurodegeneración. Aunque los mecanismos precisos por los que el mal funcionamiento de la autofagia puede comprometer la estabilidad genómica no están claros, algunas posibilidades que se han propuesto son la imposibilidad de controlar y reparar las proteínas, la degradación ineficaz de los centrosomas, la insuficiente generación de energía para una correcta replicación y reparación del DNA, y la liberación excesiva de especies reactivas de oxígeno debido a la eliminación inadecuada de las mitocondrias dañadas (S. Jin & White, 2007; Mathew *et al.*, 2007).

II.1.4.5. Autofagia en la longevidad

De manera general, la autofagia disminuye con la edad, ya que varias proteínas clave de la vía autofágica muestran una expresión disminuida en el encéfalo durante el envejecimiento (Lipinski *et al.*, 2010). La acumulación intracelular progresiva de proteínas mal plegadas y dañadas, así como de orgánulos disfuncionales como las mitocondrias, debido a una disminución en la actividad proteolítica general, es uno de los signos y causas del envejecimiento (Terman *et al.*, 2007). Por tanto, la eliminación de los agregados de proteínas y de los orgánulos que funcionan de manera inadecuada ayudaría a mejorar la función celular, extender la vida útil y evitar la muerte celular. Bajo este contexto, la modulación de la autofagia se ha propuesto como una posible estrategia terapéutica para tratar y mejorar el envejecimiento, ya que el aumento de su actividad a nivel de todo el organismo confiere efectos anti-envejecimiento y contribuye al incremento de la longevidad en diferentes modelos experimentales, aunque actualmente se desconocen los mecanismos específicos de esta función (Rubinsztein *et al.*, 2011).

II.1.4.6. Autofagia en la muerte celular

Aunque en la mayoría de las situaciones la autofagia constituye principalmente una vía de adaptación y protección que permite que las células sobrevivan en respuesta a varios factores estresantes, en otras también puede favorecer la muerte de la célula, estando ambas funciones mediadas por el mismo conjunto de genes (Debnath *et al.*, 2005;

Eskelinen, 2005). La demostración experimental de la doble función de este proceso, y de la existencia de la muerte celular autofágica en condiciones fisiológicas, proviene de estudios en *Drosophila*. Durante el desarrollo de este modelo, se observó que la degeneración de la glándula salival de la larva requiere de la autofagia para que ocurra la muerte celular, favoreciendo la muerte de la célula al mismo tiempo que produce la eliminación de tejidos obsoletos (Berry & Baehrecke, 2007, 2008). Por lo tanto, una considerable acumulación de autofagosomas puede indicar tanto una vía de supervivencia celular en respuesta a un agente patógeno, como una ruta alternativa de muerte celular (Mizushima *et al.*, 2008), aunque aún no se sabe qué factores determinan si la autofagia es protectora o tóxica, y si la toxicidad ocurre como resultado de cruzar un umbral de auto-digestión debido a la eliminación excesiva y prolongada de todos los constituyentes subcelulares, la degradación específica de factores de supervivencia esenciales para la célula, u otros mecanismos aún no definidos, como moléculas que modulen la magnitud de la autofagia y que hagan que el proceso pase de ser un mecanismo favorecedor de la supervivencia a uno que propicie la muerte celular (Lum, Bauer, *et al.*, 2005; L. Yu *et al.*, 2006; Gozuacik & Kimchi, 2007; Maiuri *et al.*, 2007). Durante los últimos años se han descubierto algunas de estas moléculas que hacen posible la diferenciación entre ambas funciones, como Draper (Drpr), JNK y DAPk, aunque se desconoce cómo estos factores son capaces de dirigir la autofagia desde una ruta de supervivencia a una de muerte (Bialik & Kimchi, 2010; McPhee *et al.*, 2010; Shimizu *et al.*, 2010).

Dentro del campo de investigación de la muerte celular no existe un consenso claro sobre la clasificación de los diferentes tipos de muerte celular programada (MCP), y la clasificación más antigua, aunque también considerada la más precisa, se basa exclusivamente en la morfología. A pesar de que esta categorización fue establecida en base en las características ultraestructurales observadas en células embrionarias durante la morfogénesis, dicha clasificación es ampliamente aceptada para los organismos adultos. De acuerdo con esta clasificación introducida por Schweichel y Merker (Schweichel & Merker, 1973), se diferencian tres tipos de MCP: apoptosis, autofagia, y muerte celular citoplasmática. La muerte celular autofágica, o MCP de tipo II (J. Kovacs *et al.*, 1986; Clarke, 1990), se caracteriza morfológicamente por la presencia de abundantes vacuolas autofágicas en el citoplasma, dilatación mitocondrial, agrandamiento tanto del aparato de Golgi como del RE, y finalmente, destrucción nuclear (Bursch, 2001, 2004). Dado que el campo continúa expandiéndose, con el consecuente

descubrimiento de nuevos mecanismos que regulan múltiples rutas de muerte celular, el Comité de Nomenclatura de la Muerte Celular (*The Nomenclature Committee on Cell Death*; NCCD) ha propuesto una clasificación actualizada de los subtipos de MCP centrándose en aspectos esenciales y mecánicos del proceso. De acuerdo con esta reciente revisión (Galluzzi *et al.*, 2018), actualmente es posible discriminar hasta catorce rutas de muerte celular, de las cuales, algunas de ellas son más comunes, mientras que otras ocurren solamente en un tipo de célula.

Bajo ciertas condiciones, la autofagia y la apoptosis son dos procesos independientes que pueden influir por separado en la toma de decisiones de vida y muerte de la célula (Eisenberg-Lerner *et al.*, 2009), mientras que en otras situaciones ambos procesos se entrecruzan y se regulan mutuamente entre sí para determinar el destino celular (Bursch *et al.*, 2000; Denton *et al.*, 2015). La autofagia puede preceder o coexistir con la apoptosis, e incluso puede reducir la posibilidad de apoptosis mediante la captación y degradación específica de las mitocondrias y de proteínas pro-apoptóticas (Maiuri *et al.*, 2007; Eisenberg-Lerner *et al.*, 2009; Platini *et al.*, 2010; Marino *et al.*, 2014). A su vez, la activación de la apoptosis inhibe la autofagia, ya que las caspasas pueden escindir e inactivar proteínas esenciales para la autofagia y convertirlas en proteínas pro-apoptóticas (Marino *et al.*, 2014). Además, ambos procesos participan en las mismas rutas de señalización, como las que involucran a las proteínas p53 y BH3-only, y comparten varios mecanismos y elementos reguladores comunes (Denton *et al.*, 2015). Las moléculas reguladoras de la apoptosis, como los miembros de la familia Bcl-2, pueden regular la autofagia (Levine *et al.*, 2008), y las proteínas Atg, como Atg4, Atg5 y Atg6, también pueden participar en la apoptosis (Fimia & Piacentini, 2010).

Sin embargo, a pesar de que varios estudios han demostrado que la autofagia sí puede promover la muerte celular (Shimizu *et al.*, 2004; L. Yu *et al.*, 2004), en respuesta a la mayoría de las formas de estrés celular la autofagia es principalmente un mecanismo protector que se activa como primera respuesta al daño celular para prevenir la muerte de la célula, y si no se logra eliminar el daño, la autofagia se bloquea y la célula muere (Liberski *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2016). Para demostrar que la autofagia no se induce durante el estrés para evitar la muerte celular, sino que es responsable de la propia muerte, se debería mostrar que la muerte de la célula está causada de manera dependiente de la autofagia, lo que significa que debería suprimirse por la inhibición genética o

farmacológica de la actividad autofágica (Galluzzi *et al.*, 2012). Sin embargo, la eliminación de genes relacionados con la autofagia acelera la muerte celular en lugar de retrasarla (Levine & Yuan, 2005; Maiuri *et al.*, 2007) y, al contrario, cuando se bloquea la apoptosis en ratones con deficiencia de Bax/Bak, la autofagia se activa como un mecanismo de supervivencia celular (Lum, Bauer, *et al.*, 2005). De acuerdo con Bursch y Ellinger (Bursch & Ellinger, 2005), la observación de vacuolas autofágicas en células en proceso de muerte mediante microscopía electrónica es indicativo de que la muerte celular es de tipo autofágica, aunque actualmente se considera que la simple presencia de autofagosomas es insuficiente para distinguir entre “muerte celular con autofagia” y “muerte celular por autofagia” (Levine & Kroemer, 2008). Algunos estudios han asociado la muerte de la célula a un defecto en la degradación de los sustratos de la ruta del UPS junto con una disfunción continua de la autofagia, pudiendo no estar causada por la propia activación autofágica (Degterev *et al.*, 2005; Korolchuk *et al.*, 2009; Pivtoraiko *et al.*, 2010).

Por lo tanto, actualmente no hay evidencias de que la autofagia promueva la muerte celular que ocurre fisiológicamente *in vivo*, por ejemplo, durante el desarrollo (Berry & Baehrecke, 2007, 2008). Debido a los hallazgos mencionados, está surgiendo un consenso de que la autofagia podría ser un impostor de muerte celular que, en realidad, funciona principalmente para promover la salud celular y del organismo (Kroemer & Levine, 2008). Probablemente, la clave esté en que un nivel de autofagia tanto excesivo como muy bajo pueda ser nocivo para la célula, un complejo equilibrio que da como resultado su paradójico papel dual en la supervivencia y muerte de la célula (Heiseke *et al.*, 2010).

II.1.5. PAPEL EN LA PATOLOGÍA: ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Aunque se ha prestado mucha atención a la autofagia inducida bajo diferentes condiciones de estrés celular, la eliminación rutinaria del contenido citoplasmático, incluso durante condiciones de crecimiento favorables, también es indispensable para una fisiología celular adecuada (Yin *et al.*, 2016). Por lo general, la autofagia ocurre a un nivel basal constitutivo en prácticamente todas las células. Los niveles basales de autofagia funcionan en parte como un mecanismo de control de calidad y son de gran importancia para evitar la acumulación de proteínas mal plegadas y orgánulos defectuosos,

manteniendo de esta manera la salud y una homeostasis celular normal (Heiseke *et al.*, 2010). Mediante esta función, la autofagia protege al organismo contra varias patologías, y cuando no funciona correctamente, favorece la aparición de éstas, lo cual nos lleva a la otra cara de la autofagia y sus conexiones con la fisiopatología y la enfermedad. La disfunción de este proceso se ha relacionado con una gran cantidad de enfermedades humanas y animales que incluyen cardiomiopatías, infecciones, cáncer, y enfermedades relacionadas con el mal plegamiento de proteínas que conducen a la degeneración neuronal, muscular, o hepática (De Duve & Wattiaux, 1966; Huang & Klionsky, 2007; Martinez-Vicente & Cuervo, 2007; Levine & Kroemer, 2008; Mizushima *et al.*, 2008; Jiang & Mizushima, 2014).

Una característica común de varias enfermedades neurodegenerativas es la acumulación intracelular de agregados de proteínas tóxicas que de alguna manera escapan al proceso de degradación, lo que conduce inevitablemente a la disfunción y muerte de las neuronas (Nixon, 2005; Shibata *et al.*, 2006). La simple existencia de estos agregados es una señal de mal funcionamiento o de un problema en los mecanismos de degradación neuronal (Chu, 2011). Desafortunadamente, la mayoría de estas enfermedades están relacionadas con la edad, por lo que es difícil demostrar una correlación directa entre una autofagia defectuosa y el fenotipo de la enfermedad. Sin embargo, la demanda de autofagia basal es específica de cada tejido. En tejidos cuyas células no se dividen tras la diferenciación, como las neuronas, miocitos o hepatocitos, la autofagia basal adquiere una relevancia vital (Komatsu *et al.*, 2005; Hara *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2007; Nakai *et al.*, 2007). La integridad de las neuronas depende en gran medida de la degradación autofágica basal en comparación con las células no neuronales, ya que, por su naturaleza post-mitótica, están predisuestas a la acumulación de proteínas mal plegadas y orgánulos dañados que podrían diluirse a través de la división celular en las células que sí se replican. Además, con el fin de procesar y transmitir información de manera efectiva, las neuronas poseen una arquitectura celular única que utiliza estructuras altamente especializadas para la comunicación intercelular que no se encuentran en otros tipos de células, como el soma/pericarion, axones, dendritas y sinapsis. El transporte eficiente de proteínas, orgánulos y autofagosomas a distancias significativas del pericarion neuronal a través de axones y dendritas podría verse alterado por un mecanismo autofágico defectuoso, lo que afectaría a la comunicación intercelular y, posteriormente, contribuiría a la neurodegeneración (Son *et al.*, 2012).

Varios estudios genéticos *in vivo* han proporcionado un vínculo directo entre la desregulación autofágica y la neurodegeneración. A diferencia de los ratones *knock-out* para los genes *Atg5* y *Atg7* previamente comentados, que mueren de manera temprana durante la embriogénesis o el periodo neonatal (Kuma *et al.*, 2004; Komatsu *et al.*, 2005), los ratones *knock-out* para los mismos genes, pero específicos del tejido nervioso, consiguen sobrevivir al periodo postnatal (Hara *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2006). Sin embargo, estos ratones acumulan en las neuronas agregados de proteínas anormales positivas a Ub en cuerpos de inclusión, sufren neurodegeneración y pérdida neuronal, y acaban desarrollando déficits motores progresivos y reflejos anormales que se asemejan a las características clínicas y patológicas de las enfermedades neurodegenerativas. De acuerdo con este modelo, en ausencia de autofagia, la degradación de proteínas citoplasmáticas disminuye, lo que aumenta su propensión a dañarse y plegarse incorrectamente y, posteriormente, a ubiquitinarse y agregarse, a pesar de una función proteasómica aparentemente normal (Levine & Kroemer, 2008). Además, las alteraciones en genes que participan en la función lisosómica o en el tráfico y suministro de los autofagosomas a los lisosomas, también causan un fallo en la ejecución de la autofagia y neurodegeneración (Myllykangas *et al.*, 2005; Shacka *et al.*, 2007; Nedelsky *et al.*, 2008).

La importancia de que las proteínas y orgánulos de las neuronas estén controlados de manera tan firme, sugiere que la autofagia neuronal está regulada de forma diferente a la de las células no neuronales (Mizushima *et al.*, 2008; Mitra *et al.*, 2009). En comparación con otros sistemas, el SNC presenta bajos niveles de autofagosomas en condiciones normales e incluso durante la inanición (W. H. Yu *et al.*, 2004), probablemente porque las neuronas eliminan los autofagosomas más rápidamente, o porque simplemente responden de manera diferente a la inanición mediante un mecanismo de inducción y formación más estrictamente regulado, pudiendo no requerir un nivel sustancial de autofagia debido a su susceptibilidad al desequilibrio del flujo autofágico (Ariosa & Klionsky, 2016). A pesar de ello, las evidencias previamente descritas demuestran que la renovación constitutiva del contenido citosólico por autofagia es extremadamente importante para mantener la homeostasis celular del SNC, cuya intensa sensibilidad a la acumulación de orgánulos dañados y agregados citoplasmáticos dañinos podría conducir fácilmente al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas incluso en ausencia de expresión de cualquiera de las proteínas mutantes asociadas a la enfermedad (Frake *et al.*, 2015; Kiriyaama & Nochi, 2015).

El requerimiento de autofagia es más evidente bajo condiciones de enfermedad, donde los niveles de autofagosomas pueden aumentar drásticamente en neuronas lesionadas o en proceso de degeneración (Petersen *et al.*, 2001). La acumulación de vacuolas autofágicas, que reflejan la presencia de una actividad autofágica anormal o incrementada, ha sido observada con frecuencia en poblaciones neuronales específicas de las regiones cerebrales afectadas por la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, y las enfermedades priónicas, por lo que se ha sugerido un papel crucial de este proceso durante el transcurso de estas enfermedades (Boellaard *et al.*, 1989; Boellaard *et al.*, 1991; Ravikumar *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2003; Webb *et al.*, 2003; Liberski *et al.*, 2004; Sikorska *et al.*, 2004; Iwata *et al.*, 2005; Nixon *et al.*, 2005; Rubinsztein *et al.*, 2005; Berger *et al.*, 2006; Mizushima & Hara, 2006; Rubinsztein, 2006; Ventruti & Cuervo, 2007).

II.1.5.1. Autofagia en la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA), la forma más común de demencia senil, se caracteriza patológicamente por la acumulación intracelular de ovillos neurofibrilares, formados por la hiperfosforilación de la proteína tau, y de placas amiloides, cuyo principal componente es el péptido β -amiloide ($A\beta$), formado a partir de la proteólisis secuencial de la proteína precursora de amiloide (PPA) por la acción de secretasas (Vassar *et al.*, 1999).

La primera evidencia de la participación de la autofagia en el proceso neurodegenerativo de esta enfermedad, se obtuvo al observar mediante microscopía electrónica abundantes vacuolas autofágicas en muestras cerebrales de pacientes diagnosticados con la EA, principalmente dentro de neuritas distróficas, aunque también en el pericarion de las neuronas afectadas (Nixon *et al.*, 2005). Poco después, estudios de inmunomarcaje identificaron un gran número de estas vacuolas presentes en el encéfalo antes de la aparición extracelular de $A\beta$ en forma de placas, sugiriendo que la acumulación de las vacuolas constituye una característica distintiva temprana de la enfermedad (W. H. Yu *et al.*, 2005). Curiosamente, las vacuolas autofágicas constituyen un reservorio principal del $A\beta$ intracelular y de los elementos cruciales para su formación, ya que están altamente enriquecidas en secretasas, y contienen tanto la PPA completa como la forma escindida, lo que indica que la autofagia puede contribuir a la generación del péptido patógeno dentro de las propias vacuolas a partir del procesamiento del

precursor amiloide (W. H. Yu *et al.*, 2005). A su vez, la carga intracelular de A β incrementa la actividad autofágica y altera el proceso de formación de los autofagolisosomas, dando como resultado una acumulación excesiva de vacuolas autofágicas (Ling *et al.*, 2009; Pajak, Songin, Strosznajder, & Gajkowska, 2009; Pajak, Songin, Strosznajder, Orzechowski, *et al.*, 2009; Lipinski *et al.*, 2010).

Sin embargo, y al igual que sucede en la mayoría de enfermedades neurodegenerativas, la causa real de la toxicidad celular, y el papel clave de la autofagia en el desarrollo de la EA, son todavía objeto de debate. La evidencia actual sugiere que el aumento de autofagosomas observado en esta enfermedad se debe a la ineficaz degradación de los mismos debido a un defecto en la maquinaria autofágica, dando como resultado la acumulación de A β y la muerte de las neuronas (Ulamek-Kozioł *et al.*, 2013). De forma general, los autofagosomas y endosomas dentro de las neuronas se forman a lo largo de las neuritas y en las sinapsis, y para completar su función requieren de un transporte retrógrado eficiente a lo largo de los microtúbulos hacia el pericarion, que contiene la mayor concentración de lisosomas. En la EA, el transporte retrógrado del autofagosoma y su maduración en autofagolisosoma se encuentran dañados, lo que resulta en una acumulación masiva de vacuolas autofágicas inmaduras a lo largo de las neuritas degeneradas (Nixon, 2007; Boland *et al.*, 2008). Varios estudios han propuesto la disfuncionalidad de la proteína tau como posible causa de esta defectuosa eliminación autofágica (Funderburk *et al.*, 2010). La proteína tau controla la estabilidad de los microtúbulos, por lo que su aumento o hiperfosforilación, puede afectar la actividad de estas estructuras en las células neuronales, alterando el sistema de transporte. Esto pone a las neuronas en grave peligro debido a la errónea colocación de orgánulos celulares como las mitocondrias o los lisosomas (Avila *et al.*, 2004). En particular, la degradación del autofagosoma por los lisosomas es una ruta dependiente de los microtúbulos (Jahreiss *et al.*, 2008), por lo que la actividad patológica de la proteína tau puede afectar funciones neuronales de transporte autofágico a través de neuritas y sinapsis (Yue, 2007).

Además, la expresión de la proteína beclin-1, que disminuye en el cerebro humano de manera dependiente de la edad, también se encuentra reducida de manera temprana en varias regiones cerebrales de pacientes con la EA (Pickford *et al.*, 2008). Algunos estudios han descrito que la reducción genética *in vivo* de *beclin-1* produce neurodegeneración y un aumento en la acumulación intracelular y extracelular de A β

debido a la interrupción de la autofagia neuronal y de la degradación autofagolisosómica (Pickford *et al.*, 2008; Jaeger *et al.*, 2010). Otros marcadores de autofagia, como ATG5, ATG12 y LC3, presentan una expresión incrementada en las neuronas en proceso de degeneración durante la fase temprana de la EA, que disminuye conforme progresa la duración de la enfermedad (J. F. Ma *et al.*, 2010). Esta combinación de inducción incrementada de autofagia, incompleta maduración y eliminación de los autofagosomas, que a su vez favorecen la producción de A β , y reducción progresiva de proteínas clave de la autofagia, sugiere un bloqueo en el sistema de degradación, lo cual probablemente altera la eliminación de los péptidos tóxicos y crea las circunstancias apropiadas para su agregación y acumulación en esta enfermedad (Nixon, 2007; Boland *et al.*, 2008; Jaeger *et al.*, 2010). De hecho, se ha demostrado que algunos de estos cambios inician la neurodegeneración en *Drosophila* (Ling & Salvaterra, 2009).

II.1.5.2. Autofagia en la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP), uno de los trastornos neurodegenerativos más comunes, está causada por la muerte celular de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, y se caracteriza por la presencia de inclusiones intracitoplasmáticas que contienen α -sinucleína y ubiquitina, denominadas cuerpos de Lewy (Son *et al.*, 2012).

Los primeros exámenes ultraestructurales en pacientes con la EP revelaron características de apoptosis y de autofagia en las neuronas dopaminérgicas en proceso de degeneración de la sustancia negra (Anglade *et al.*, 1997), y más tarde, se demostró que la inhibición tanto de la AMC como de la macroautofagia produce una acumulación de α -sinucleína, sugiriendo que ambas rutas son importantes para la degradación de esta proteína en las neuronas y que la autofagia puede desempeñar un papel relevante en la patogenia de la EP (Webb *et al.*, 2003; Cuervo *et al.*, 2004; Vogiatzi *et al.*, 2008). Además, al igual que en la EA, beclin-1 también participa en la eliminación intracelular de la α -sinucleína. La estimulación *in vivo* de la expresión de esta proteína en el encéfalo incrementa la activación lisosomal y autofágica, reduce la acumulación de α -sinucleína en el sistema límbico y mejora la patología sináptica y dendrítica (Spencer *et al.*, 2009). Asimismo, varias proteínas asociadas a la forma familiar de la EP, se han visto involucradas en el proceso autofágico. Por ejemplo, la sobreexpresión de la forma *wild-type* de la α -sinucleína altera la maquinaria autofágica, tanto *in vivo* como *in vitro*, al causar una ubicación errónea de Atg9 (Winslow *et al.*, 2010). También, la expresión de

A53T y A30P, dos formas mutantes de la α -sinucleína, inhibe la AMC al presentar una mayor afinidad de unión por la proteína de membrana lisosomal LAMP-2a, produciéndose una inducción compensatoria de macroautofagia (Cuervo *et al.*, 2004; Xilouri *et al.*, 2009).

II.1.5.3. Autofagia en la enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH), incluida en las denominadas enfermedades de expansión de poliglutamina (polyQ), está causada por la repetición del triplete CAG en el gen de la huntingtina (*HTT*), lo que codifica una cantidad anormal y excesiva del aminoácido glutamina en el extremo N-terminal de la proteína. Estas colas adicionales de glutamina, hacen que las proteínas interaccionen entre sí por el extremo N-terminal y se facilite la formación de acúmulos proteicos y agregados intraneuronales, una característica patológica típica de la EH (Rubinsztein, 2002).

Las primeras evidencias de autofagia alterada en esta enfermedad, se obtuvieron durante el análisis *post-mortem* del encéfalo de pacientes con la EH (Tellez-Nagel *et al.*, 1974). Más tarde, se observó un aumento de membranas endosomales y de vacuolas con características ultraestructurales de autofagosomas en varios modelos experimentales, sugiriendo que la sobreexpresión y acumulación de la forma mutante de la *HTT* en el citoplasma de las neuronas activa el sistema endo-lisosomal y contribuye al proceso autofágico (Kegel *et al.*, 2000). Una probable función homeostática de la forma *wild-type* de la *HTT* es actuar como centinela del RE mediante la regulación de la autofagia en respuesta al estrés del orgánulo, por lo que la expresión de la forma mutante de la proteína puede perturbar la función del RE y producir un aumento de vacuolas autofágicas (Atwal & Truant, 2008).

Aunque el mecanismo preciso que sustenta la disfunción autofágica en la EH sigue siendo desconocido, se ha propuesto que la captación ineficaz de la carga citosólica por parte de los autofagosomas es responsable de una degradación deficiente que da lugar a la acumulación de la proteína en las células (Son *et al.*, 2012). Mediante el uso de modelos celulares y murinos de la EH, se observó que las vacuolas autofágicas en esta enfermedad se forman a velocidades normales y se eliminan de manera adecuada por los lisosomas, sin embargo, se detectó un defecto primario en la capacidad de los autofagosomas para reconocer los componentes citosólicos que provoca que no puedan atrapar eficazmente la

carga en su luz (Martinez-Vicente *et al.*, 2010). Otro mecanismo que se considera, es que la HTT mutante capte a la proteína beclin-1, reduciendo su función y la degradación autofágica de la proteína tóxica (Shibata *et al.*, 2006). Además, las mutaciones que afectan a la dineína impiden la correcta fusión del autofagosoma con el lisosoma, reducen la degradación autofágica de las proteínas agregadas y aumentan la toxicidad de la HTT (Ravikumar *et al.*, 2005). Por lo tanto, el aumento inicial de autofagia observado en varios modelos de la EH puede representar un intento de eliminar la proteína HTT mutante de la célula, aunque a lo largo del tiempo la maquinaria autofágica acaba volviéndose disfuncional, lo que facilita la progresión de la enfermedad y la neurodegeneración (Son *et al.*, 2012).

II.1.5.4. Papel de la autofagia en las enfermedades neurodegenerativas

Todas estas observaciones han provocado controversia con respecto a si el aumento de autofagosomas observado en las neuronas en proceso de degeneración ejerce un papel homeostático protector, o en su lugar contribuye a la muerte neuronal, ya que todavía no se ha identificado qué factores celulares pueden determinar si la activación de la autofagia es beneficiosa o patogénica durante la neurodegeneración (Son *et al.*, 2012). Los primeros estudios que demostraron que los autofagosomas se acumulan en el encéfalo de pacientes afectados con diversas enfermedades neurodegenerativas sugirieron inicialmente que la autofagia podría contribuir a la patogénesis de estos trastornos (A. Williams *et al.*, 2006; Rubinsztein *et al.*, 2007). Aunque la autofagia parece ser principalmente un proceso de protección en el SNC, en función del tipo y gravedad del patógeno, la respuesta de la neurona podría cambiar desde la degradación de las proteínas tóxicas a través de la autofagia, lo que conllevaría la recuperación de la condición normal de la célula, hasta la iniciación de rutas apoptóticas que producen la muerte celular (Banerjee *et al.*, 2010; Ulamek-Kozioł *et al.*, 2013).

Sin embargo, actualmente existen evidencias convincentes de que la autofagia protege contra las enfermedades neurodegenerativas. Tanto el péptido A β como las formas mutantes de la proteína HTT o de la α -sinucleína, han demostrado ser sustratos de la actividad autofágica, lo que indica que, además de eliminar las proteínas mal plegadas que se generan espontáneamente durante la degradación proteica rutinaria, la eliminación de las proteínas tóxicas propensas a formar agregados también depende en gran medida de este sistema degradativo (Ravikumar *et al.*, 2002; Webb *et al.*, 2003; J. Y. Shin *et al.*,

2014). De hecho, la autofagia ejerce un efecto beneficioso neuroprotector cuando es inducida farmacológicamente o por manipulación genética en varios modelos de estas enfermedades, debido a una reducción cuantitativa de la cantidad de la proteína tóxica, así como a efectos anti-apoptóticos, mientras que su inhibición produce los efectos opuestos (Rubinsztein *et al.*, 2007). La activación de la señalización de beclin-1, la inhibición del regulador negativo mTOR con rapamicina, o el tratamiento con células madre mesenquimales (CMM), reduce los niveles y la toxicidad de A β , aumenta la supervivencia neuronal y mejora los déficits cognitivos en varios modelos experimentales de la EA mediante el aumento de la autofagia (Pickford *et al.*, 2008; Caccamo *et al.*, 2010; Spilman *et al.*, 2010; J. Y. Shin *et al.*, 2014). Además, la estimulación de la autofagia tanto con rapamicina, como con inductores independientes de mTOR como el litio y la trehalosa, aumenta la degradación de las formas mutantes de la HTT y la α -sinucleína, atenúa la muerte celular y mejora el fenotipo degenerativo de la enfermedad (Qin *et al.*, 2003; Ravikumar *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2004; Iwata *et al.*, 2005; Sarkar *et al.*, 2005; Berger *et al.*, 2006; Shibata *et al.*, 2006; Sarkar *et al.*, 2007; Sarkar *et al.*, 2008). El efecto neuroprotector de la inducción de la autofagia también se ha descrito para otras enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la neuropatía periférica causada por mutaciones en la proteína de la mielina periférica 22 (PMP22) (Fortun *et al.*, 2003; Berger *et al.*, 2006; Kabuta *et al.*, 2006).

Debido a todo estos hallazgos, la explicación prevalente es que el aumento de autofagosomas que se produce por la expresión de las proteínas mutantes representa principalmente la activación del proceso como una reacción fisiológica beneficiosa o, en el caso de la EA, la consecuencia de un defecto en la maduración autofagolisosómica (A. Williams *et al.*, 2006; Martinez-Vicente & Cuervo, 2007; Rubinsztein *et al.*, 2007; Levine & Kroemer, 2008). El desarrollo de la enfermedad neurodegenerativa, implica que la autofagia puede alcanzar un punto de saturación en el que se excede su capacidad para degradar las proteínas agregadas, o que existen defectos en la vía autofágica producidos por los mismos factores patológicos que desencadenan la enfermedad (Levine & Kroemer, 2008). En cualquiera de los casos, la deficiencia en el control de la calidad de las proteínas y orgánulos en el pericarion, neuritas y sinapsis de las neuronas, probablemente altera la función neuronal normal debido a la acumulación de orgánulos dañados y agregados de proteínas tóxicas, lo que finalmente conduce a las condiciones neurodegenerativas observadas en estas enfermedades (Son *et al.*, 2012).

II.2. ENFERMEDADES PRIÓNICAS

II.2.1. GENERALIDADES

Las enfermedades priónicas o encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) son un grupo de trastornos neurodegenerativos infecciosos y fatales que afectan a numerosas especies de mamíferos, incluido el hombre. En animales, éstas incluyen, entre otras, el scrapie de ovejas y cabras, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), y la enfermedad crónica caquetizante de los cérvidos (ECC) (Imran & Mahmood, 2011b). Las enfermedades priónicas en la especie humana comprenden la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) y su forma esporádica (eECJ), iatrogénica (iECJ), y familiar (fECJ), la variante de la ECJ (vECJ), el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), el insomnio familiar fatal (IFF), el insomnio esporádico fatal (IEF), el kuru, y la prionopatía variable sensible a la proteasa (PVSP_r) (Imran & Mahmood, 2011a).

Estas enfermedades se caracterizan por un largo periodo de incubación completamente libre de síntomas, que puede durar de meses a décadas en humanos, y por un curso que progresa rápidamente y que conduce invariablemente a la muerte. De acuerdo con la hipótesis de “sólo proteína”, las EETs están producidas por un agente infeccioso no convencional desprovisto de ácido nucleico denominado prion, compuesto principalmente, si no exclusivamente, por una proteína de conformación anómala propensa a formar agregados, conocida como PrP^{Sc} (*Sc* por scrapie). Esta isoforma mal plegada se genera por la conversión conformacional de una glicoproteína de membrana denominada proteína prion celular, o PrP^c, la cual está codificada en el hospedador por el gen *PRNP* de los mamíferos (Prusiner, 1982).

La acumulación de la PrP^{Sc} en el SNC de los individuos afectados da como resultado una degeneración espongiforme progresiva, caracterizada por una serie de lesiones neuropatológicas como la espongiosis del neuropilo, la vacuolización intraneuronal, la gliosis, y la pérdida de neuronas debido a la muerte celular (Bell & Ironside, 1993; H. Fraser, 1993). Estas lesiones se manifiestan en el hospedador en forma de signos clínicos neurodegenerativos, que incluyen ataxia motora, alteraciones del comportamiento y, en los seres humanos, una pérdida progresiva de las capacidades intelectuales (Prusiner, 1998b; Aguzzi & Polymenidou, 2004). Las EETs, según su origen, pueden clasificarse en hereditarias, cuando ocurren por la existencia de

mutaciones en el gen *PRNP*; esporádicas, cuando aparecen sin una causa aparente conocida; y adquiridas, cuando son resultado de una infección por el agente causal PrP^{Sc}.

Debido a que las EETs comparten muchas similitudes con otras enfermedades producidas por la acumulación de agregados proteicos mal plegados en el SNC, éstas se incluyen en un grupo de trastornos neurodegenerativos altamente letales e incapacitantes denominados proteinopatías, junto con la EA, EP, EH, y ELA (Aguzzi & Haass, 2003; Soto, 2003). A pesar de las similitudes entre estas enfermedades, el prion sigue siendo un agente patógeno único ya que, no solo es capaz de replicar su conformación, sino que los datos epidemiológicos respaldan su capacidad para transmitirse bajo condiciones naturales y experimentales entre individuos y, hasta cierto punto, entre especies.

El prototipo de estas enfermedades priónicas es el scrapie de ovejas y cabras, enfermedad que se conoce en Europa desde hace más de 200 años y está ampliamente distribuida por todo el mundo. La transmisibilidad de esta enfermedad fue demostrada en 1936 (Cuille & Chelle, 1936), sin embargo, el interés por el scrapie se renovó desde la aparición de la epidemia de la EEB en el ganado bovino, ya que su origen se asoció con la alimentación de estos animales con harinas de carne y hueso de origen ovino contaminadas con el agente del scrapie (Wilesmith *et al.*, 1988; Wilesmith *et al.*, 1991). La epidemia de la EEB comenzó en el Reino Unido en los años 80 (Wells *et al.*, 1987), convirtiéndose en la EET animal de mayor transcendencia tras su asociación con la aparición en la especie humana de la vECJ (Will *et al.*, 1996; Bruce *et al.*, 1997). La EEB se propagó a otros países rápidamente, provocando una de las mayores crisis alimentarias de la historia. Si bien, y tras las medidas instauradas, se ha conseguido la práctica erradicación de esta enfermedad, actualmente siguen detectándose casos en algunos países de la UE (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2016), describiéndose incluso casos naturales de EEB en el ganado caprino (Eloit *et al.*, 2005; Spiropoulos *et al.*, 2011). Tras la crisis de la EEB, se descubrió que muchas especies de mamíferos que no habían presentado casos de EETs con anterioridad, eran susceptibles a las mismas. Así, se describió por primera vez la encefalopatía espongiiforme felina (EEF) (Leggett *et al.*, 1990), la encefalopatía espongiiforme de ungulados exóticos (Jeffrey and Wells, 1988; Wilesmith *et al.*, 1988; Fleetwood and Furley, 1990; Kirkwood *et al.*, 1990; Kirkwood and Cunningham, 1994) y la encefalopatía espongiiforme de los primates no humanos (Bons *et al.*, 1999).

Dentro del grupo de las EETs animales existen otras enfermedades no relacionadas con la epidemia de la EEB, como la encefalopatía transmisible del visón (ETV), que afecta a visones de granja y se considera la segunda EET animal descrita después del scrapie (Barlow, 1972), y la ECC, enfermedad priónica que afecta a los cérvidos de Norteamérica, Corea del Sur y Europa (E. S. Williams & Young, 1980; Benestad *et al.*, 2016). Recientemente ha sido descrita, en Argelia, una nueva EET que afecta a los dromedarios y que presenta características distintas al scrapie y a la EEB (Babelhadj *et al.*, 2018).

En el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos centrado nuestro estudio en el scrapie ovino, por lo que sus características en cuanto a sintomatología, susceptibilidad, y patogenicidad, se detallarán en sucesivos apartados.

II.2.2. AGENTE CAUSAL: EL PRION

Como se ha mencionado, las EETs están producidas por la conversión conformacional de la PrP^c en una isoforma patógena denominada PrP^{Sc}, la cual, a su vez, tiene la capacidad de autorreplicarse y catalizar el cambio de conformación en la PrP^c cercana al transferir su conformación aberrante, dando como resultado la acumulación de PrP^{Sc} mal plegada y agregada en el SNC (Prusiner, 1998b). El revolucionario concepto de que estas enfermedades estaban producidas por un patógeno compuesto predominante, o exclusivamente, por una proteína infecciosa mal plegada, fue descrito en la teoría de “sólo proteína”, formulada por primera vez en 1967 (Griffith, 1967) y posteriormente desarrollada por Stanley B. Prusiner en 1982, el cual introdujo el término prion (*proteinaceous infectious particle*) para designar al agente causal del scrapie y de la ECJ (Prusiner, 1982). Antes de que se formulara esta teoría, las enfermedades priónicas fueron incluidas en el grupo de las enfermedades lentivirales (Wilson *et al.*, 1950). Sin embargo, tras comprobarse que el agente causal del scrapie era resistente a los métodos que inactivan los ácidos nucleicos como el formaldehído, el calor o la radiación ionizante y ultravioleta, se especuló que este agente etiológico podría carecer de ácido nucleico específico de la enfermedad (Alper *et al.*, 1967).

No obstante, ya que la causa de estos trastornos aún no se comprende de manera completa, a lo largo de los años se han formulado varias teorías con el fin de explicar la etiología de las EETs que, si bien están menos aceptadas, aún no han sido formalmente

rechazadas. Una de ellas es la teoría del virino, la cual sostiene que las enfermedades priónicas están producidas por una partícula híbrida formada por un pequeño ácido nucleico infeccioso y una proteína codificada por el hospedador (A.G. Dickinson & Outram, 1979; Kimberlin, 1982). Esta teoría se originó con el fin de explicar el carácter infeccioso del agente causal de las EETs y la existencia de diferentes cepas del mismo. Sin embargo, no se ha logrado identificar ningún tipo de ácido nucleico ajeno al huésped (Griffith, 1967). De manera similar, también se propuso la hipótesis de que el agente etiológico de las EETs era DNA mitocondrial envuelto por una proteína (Aiken *et al.*, 1989; Manuelidis, 2007). Otra teoría es la hipótesis del virus, la cual simplemente sugiere que el patógeno es un virus no convencional aún por identificar (Diringer, 1992). A pesar de todo, los resultados de numerosos trabajos refuerzan la teoría de “sólo proteína”, pues se ha demostrado que la PrP^{Sc} es capaz de convertir a la PrP^c en medios acelulares (Saborio *et al.*, 2001; Saa *et al.*, 2006). Por ello, la hipótesis del prion es la única ampliamente aceptada en la actualidad.

II.2.2.1. La proteína prion celular: PrP^c

La proteína prion celular, o PrP^c, es una glicoproteína de superficie celular codificada por el gen *PRNP* (*prion protein*), cuya secuencia está altamente conservada en todas las especies de mamíferos. Esta proteína se expresa en la mayoría de las células (Moser *et al.*, 1995; Ford *et al.*, 2002), si bien en el animal adulto los mayores niveles se encuentran en las neuronas del encéfalo y la médula espinal, así como en las células gliales (Manson *et al.*, 1992; Harris, 2003).

Como ocurre con todas las glicoproteínas de superficie celular, la PrP^c se sintetiza en el RE. En primer lugar, se traduce la secuencia señal, la cual se une a una translocasa que orienta a la proteína hacia el interior del RE. Tras este paso, se corta la secuencia señal y la PrP^c continúa sintetizándose, comenzando la maduración de la proteína antes de que finalice la traducción. Inicialmente se sintetiza una pre-proteína que consta aproximadamente de 254 aminoácidos, formada por un péptido señal de 22 aminoácidos en el extremo N-terminal, cinco repeticiones del octapéptido PHGGGWGQ, un núcleo hidrofóbico entre los aminoácidos 112 y 145, tres aminoácidos susceptibles a la glicosilación (Asn 181, Asn 197 y Ser 232), dos residuos de cisteína (Cis) en las posiciones 179 y 214, y una región hidrofóbica de 22-23 aminoácidos en el extremo C-terminal (Figura 4) (Schatzl *et al.*, 1995; F. E. Cohen, 1999; Harris, 2003). Esta pre-

proteína sufre un proceso de maduración complejo, que conlleva la eliminación del péptido señal del extremo N-terminal, la eliminación de la región hidrofóbica del extremo C-terminal, la formación de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína, la glicosilación del residuo Ser 232, y la formación de un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Stahl *et al.*, 1987; Haraguchi *et al.*, 1989). A su vez, puede producirse la glicosilación de los residuos 181 y 197, lo cual dará lugar a tres posibles glicofomas de la proteína: la forma no glicosilada, la monoglicosilada y la diglicosilada (Caughey *et al.*, 1989; Monari *et al.*, 1994). Tras estas modificaciones post-traduccionales, la PrP^c madura presenta una secuencia de unos 210 aminoácidos y un peso molecular de 26-37 kilodaltons (kDa), dependiendo de su estado de glicosilación. Posteriormente, la PrP^c transita a través del aparato de Golgi y se dirige transportada en vesículas hacia la membrana plasmática, en donde se inserta en microdominios lipídicos ricos en colesterol y esfingolípidos por medio del anclaje GPI (Stahl *et al.*, 1987).

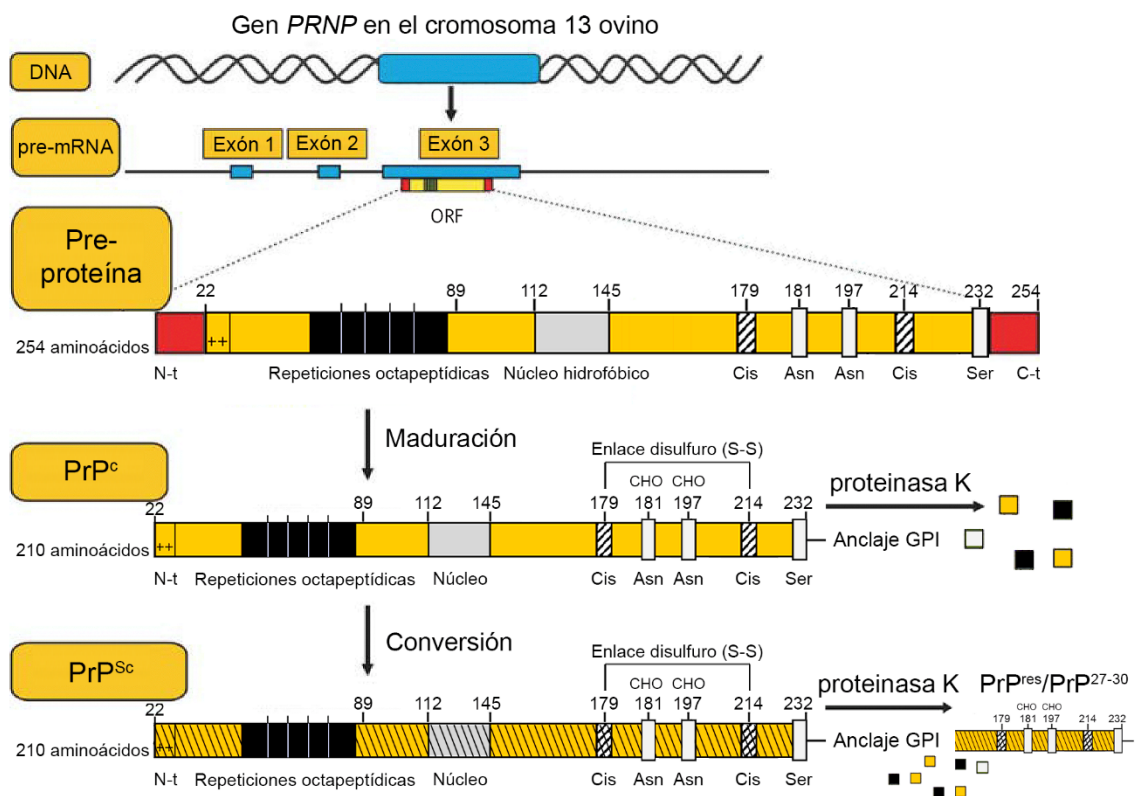


Figura 4: Formación y estructura primaria de la PrP^c. El gen *PRNP* ovino se encuentra en el cromosoma 13 y está compuesto por tres exones, el tercero de los cuales contiene un marco de lectura abierto (ORF). Durante el proceso de maduración se agregan dos glicanos (CHO) en las posiciones 181 y 197. El producto final es una proteína celular (PrP^c) que se puede convertir en la isoforma patológica (PrP^{Sc}). Tras el tratamiento con la proteínasa K la PrP^c se degrada por completo, mientras que la PrP^{Sc} sólo se degrada parcialmente, dando lugar a un producto de escisión proteolítica denominado PrP^{res} o PrP²⁷⁻³⁰. Adaptada de (Liberski *et al.*, 2008; Benvegnu *et al.*, 2009).

Actualmente, las funciones fisiológicas la PrP^c no se conocen en su totalidad. Sin embargo, mediante estudios *in vitro* y el análisis de los fenotipos que desarrollan ratones *knock-out* para la PrP^c, se ha descubierto su implicación en diversos procesos biológicos, probablemente debidos a que esta proteína es capaz de interactuar con una serie de proteínas de membrana, lo cual influye en su localización y actividad celular (Linden *et al.*, 2008). Los resultados de diversos estudios sugieren que la PrP^c participa en:

- Protección frente al estrés oxidativo y la apoptosis. Ésta ha sido una de las funciones de la PrP^c más estudiadas. Se ha observado que esta proteína previene la muerte neuronal apoptótica y la disfunción mitocondrial inducida por la privación de suero (Kuwahara *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004), además de que es capaz de inhibir al factor pro-apoptótico Bax (*Bcl-2 associated X*) (Roucou *et al.*, 2004).
- Regulación de la autofagia (H. Y. Shin *et al.*, 2013). Esta función se describirá con mayor detalle en el apartado II.2.6.2.
- Proliferación y diferenciación celular. La PrP^c participa en la neurogénesis y neuritogénesis, sinaptogénesis, adhesión celular, neurotransmisión, desarrollo axonal y mantenimiento de la sustancia blanca (Steele *et al.*, 2006; Aguzzi *et al.*, 2008).
- Participación en la respuesta inmune mediante la regulación de la migración transendotelial de monocitos y la activación de linfocitos T (Castle & Gill, 2017).
- Regulación de los ciclos circadianos (da Luz *et al.*, 2015).
- Modulación del metabolismo del cobre (G. G. Kovacs & Budka, 2008).
- Regulación de los niveles de A β y tau, y mediación de los efectos tóxicos de estas proteínas (Lauren *et al.*, 2009).

II.2.2.2. La proteína prion patológica: PrP^{Sc}

La PrP^{Sc} es una isoforma anormal de la PrP^c. Aunque ambas poseen una secuencia aminoacídica idéntica, la conversión post-traducciona l de la PrP^c en la forma patógena afecta a la conformación de la proteína, modificando su estructura secundaria (Prusiner *et al.*, 1990). Inicialmente, mediante la utilización de técnicas espectroscópicas, se observó que el contenido aproximado de hélices α y láminas plegadas β de la PrP^{Sc} era de un 30% y 43%, respectivamente (Pan *et al.*, 1993). Si bien la estructura de la PrP^{Sc} no se conoce con exactitud, actualmente existen dos modelos distintos: el modelo PIRIBS

(*parallel in-register intermolecular beta-sheet*) (Groverman *et al.*, 2014) y el modelo de beta solenoide de cuatro escalones (*4-rung β -solenoid*) (Vazquez-Fernandez *et al.*, 2016), los cuales proponen dos conformaciones estructurales de la PrP^{Sc} diferentes, aunque ambos coinciden en que es probable que no existan hélices de tipo α en la estructura de la proteína (Figura 5).

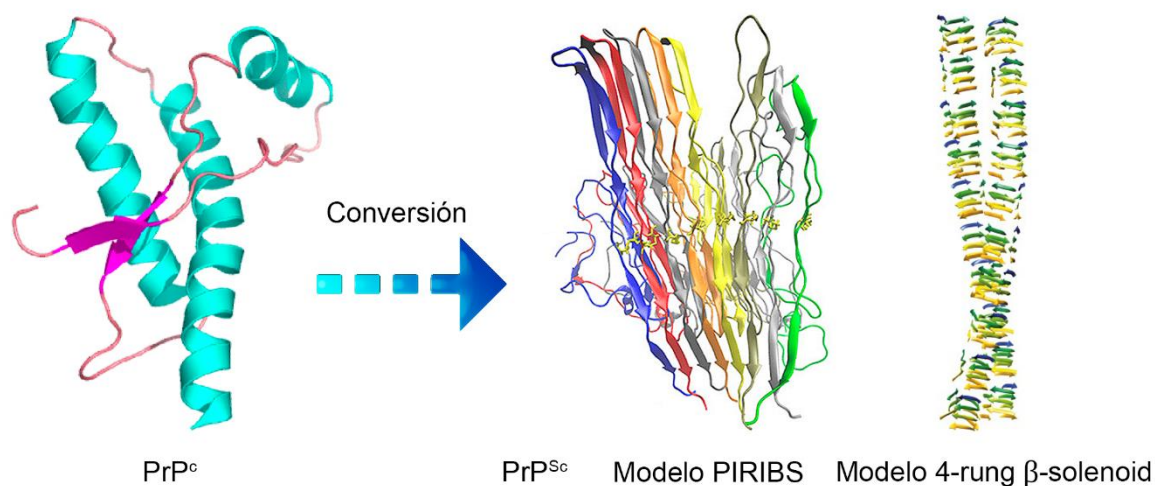


Figura 5: Estructura secundaria de la PrP^c y PrP^{Sc}. El modelo PIRIBS (*parallel in-register intermolecular beta-sheet*) y el modelo de beta solenoide de cuatro escalones (*4-rung β -solenoid*) proponen dos conformaciones estructurales de la PrP^{Sc} diferentes, aunque coinciden en que es probable que no existan hélices de tipo α en la estructura de la proteína. Adaptada de (Colacino *et al.*, 2006; Groverman *et al.*, 2014; Vazquez-Fernandez *et al.*, 2016).

La conversión conformacional de la PrP^c en PrP^{Sc} implica, no sólo una modificación estructural, sino también importantes cambios en las propiedades físico-químicas de la misma. Si bien la PrP^c es soluble en detergentes y es degradada completamente por la proteinasa K (PK), la PrP^{Sc} es insoluble en detergentes no iónicos y parcialmente resistente a la digestión con esta enzima, dando lugar a un producto de escisión proteolítica denominado PrP^{res} o PrP²⁷⁻³⁰, debido a que el núcleo resistente presenta un peso molecular de 27 a 30 kDa (Figura 4), el cual puede visualizarse mediante microscopía electrónica como estructuras fibrilares amiloideas denominadas fibrillas asociadas al scrapie (*scrapie-associated fibrils*; SAF) (Merz *et al.*, 1981; Oesch *et al.*, 1985). Además, la PrP^{Sc} posee una gran resistencia a las radiaciones ionizantes y ultravioletas, al calor, y a la desinfección con ciertos agentes químicos como el formaldehído (Prusiner, 1998b; Caughey & Chesebro, 2001).

II.2.2.3. Tráfico celular de la PrP^c y su conversión en PrP^{Sc}

Una vez que la PrP^c está en la superficie de la célula, ésta transita entre la membrana y el interior de la célula por medio de vesículas endosomales (Vey *et al.*, 1996; Peters *et al.*, 2003). Tras su internalización, la PrP^c se localiza en endosomas tempranos, desde donde se dirige a los endosomas de reciclaje para ser devuelta a la membrana plasmática, o a los CMV para ser degradada por los lisosomas a través de la vía endo-lisosomal (Harris, 2003). En el caso de las neuronas, se ha detectado también un transporte anterógrado y retrógrado de la PrP^c a través de los axones que facilita su movimiento hacia y desde las extremidades neuronales (Borchelt *et al.*, 1994). La PrP^{Sc} también parece circular a lo largo de la misma ruta endocítica, ya que se localiza en los endosomas asociados tanto al reciclaje como a las vías de degradación (Yim *et al.*, 2015), aunque degradándose a una velocidad mucho más lenta que la PrP^c (Borchelt *et al.*, 1990). No obstante, existen muchos detalles de la biología de la PrP^{Sc} celular que no se comprenden bien, debido en parte al hecho de que no es posible seguir el movimiento de esta proteína en tiempo real, ya que no existen actualmente anticuerpos específicos que distingan entre la conformación de la PrP^c y la PrP^{Sc}, y para localizarla en la célula debería desnaturalizarse previamente antes del inmunomarcaje (Taraboulos *et al.*, 1995).

Sin embargo, el compartimento celular específico en el que se produce la conversión de la forma celular de la proteína prion en la isoforma patógena mal plegada todavía no se ha determinado. Principalmente, se ha propuesto que la conversión ocurre en la membrana plasmática (Goold *et al.*, 2011; Rouvinski *et al.*, 2014) o tras la endocitosis (Caughey & Raymond, 1991; Beranger *et al.*, 2002; Yamasaki *et al.*, 2014), aunque en el caso de las formas familiares y/o esporádicas de la enfermedad, existen evidencias de que la adquisición de propiedades similares a la PrP^{Sc} puede producirse de manera espontánea en el RE durante las etapas tempranas de la biosíntesis de la PrP^c (Harris, 2003; Chiesa, 2015). También se ha descrito que el evento de conversión puede tener lugar a lo largo de la red trans del aparato de Golgi (Beranger *et al.*, 2002), e incluso en sitios extracelulares (Chesebro *et al.*, 2005). Varios estudios coinciden en que la conversión priónica se produce cuando ambas proteínas circulan a través de la ruta endocítica y la PrP^c se expone a la PrP^{Sc}, pero mientras que algunos de ellos han propuesto que esto ocurre a medida que la PrP^c transita a lo largo de la vía endo-lisosomal (Borchelt *et al.*, 1992; Magalhaes *et al.*, 2005), otros han sugerido que ocurre en la vía endocítica

de reciclaje (Marijanovic *et al.*, 2009; Goold *et al.*, 2013). Recientemente, se ha sugerido que los CMV maduros de la vía endo-lisosomal son el sitio intracelular principal de la conversión de priones, proponiendo un mecanismo de conversión similar al que ocurre en la membrana plasmática tras una infección externa (Yim *et al.*, 2015), aunque también se ha observado la generación *de novo* de la PrP^{Sc} en los CMV (Yamasaki *et al.*, 2014).

Debido a que la propagación de la infección de la PrP^{Sc} desde sitios periféricos al SNC sigue vías neuroanatómicas (Glatzel *et al.*, 2004), resulta imprescindible entender los mecanismos de transporte neuronal, en los que parecen estar implicados procesos de transporte axonal (Bartz *et al.*, 2002). Sin embargo, los mecanismos precisos mediante los cuales la PrP^{Sc} se transporta tanto dentro de las células, como entre ellas, no están bien definidos *in vivo*. Aunque el contacto directo entre células podría ser una posibilidad, en los últimos años se han propuesto otros mecanismos, como el transporte vesicular (Kalani *et al.*, 2014). Mediante estudios *in vitro* se ha observado que la PrP^{Sc} se puede liberar de las células en partículas infecciosas vesiculares que son similares a los exosomas (Schatzl *et al.*, 1997). En este sentido, los CMV pueden desempeñar varias funciones relevantes en las EETs, ya que, además de ser potencialmente el principal sitio interno de conversión priónica, también pueden tener una importancia crucial en la liberación al medio de la PrP^{Sc} y su propagación, en base al descubrimiento de que cuando los CMV se fusionan con la membrana plasmática liberan sus vesículas intraluminales como exosomas, los cuales se ha demostrado que contienen tanto la PrP^c como la PrP^{Sc} (Fevrier *et al.*, 2004; Leblanc *et al.*, 2006; Veith *et al.*, 2009). Como ya hemos comentado anteriormente, una vez liberados, los exosomas pueden fusionarse con las membranas de otras células, proporcionando un mecanismo potencial para la propagación de la infectividad entre las células (Fevrier *et al.*, 2004).

II.2.2.4. La naturaleza de las distintas cepas priónicas

La existencia de distintas cepas de agentes priónicos se sugirió por primera vez en 1961, cuando Pattison y Millson identificaron distintos fenotipos de presentación de la enfermedad en caprinos inoculados con scrapie (Pattison & Millson, 1961). Este concepto se reforzó posteriormente mediante el uso de diversas líneas endogámicas de ratones, a través del estudio del fenotipo clínico de la enfermedad, el perfil lesional en el encéfalo y el periodo de incubación en estos animales (Bruce, 2003). Dado que el agente causal de las EETs está compuesto únicamente por una proteína, el concepto de cepas priónicas fue

inicialmente difícil de racionalizar, sobre todo considerando que, en la mayoría de los casos, la variación se observaba en animales de la misma especie. Actualmente se considera que la diferencia entre las cepas priónicas radica en las distintas conformaciones que la PrP^{Sc} puede adquirir (Morales *et al.*, 2007). Estas partículas infecciosas son capaces de transmitir su conformación particular a la PrP^c del hospedador, dando lugar a características patológicas específicas.

Los métodos de tipificación de cepas priónicas se basan en la identificación de las propiedades bioquímicas y patológicas características que presentan, generalmente a través de pases seriados en ratones de laboratorio. Una vez la cepa ha alcanzado la estabilidad en una línea murina específica, su identificación y caracterización se lleva a cabo a través de la valoración de una serie de parámetros: el periodo de incubación, las manifestaciones clínicas del hospedador, el perfil de lesiones espongiiformes producido y el patrón inmunohistoquímico de los depósitos de PrP^{Sc} (H. Fraser & Dickinson, 1968; DeArmond & Prusiner, 1993). Para detectar las diferencias existentes en cuanto a severidad y distribución de las lesiones espongiiformes en el encéfalo, se desarrolló un protocolo semicuantitativo para la construcción del perfil lesional, el cual se basa en la evaluación de la vacuolización en nueve áreas distintas del encéfalo del ratón (H. Fraser & Dickinson, 1968). Asimismo, existen varias técnicas que permiten diferenciar las cepas a nivel bioquímico. El método más utilizado es la evaluación de la movilidad electroforética de la PrP^{Sc} tras la digestión con PK, pues la longitud del fragmento resistente varía en función de la cepa priónica analizada. Otra característica bioquímica utilizada es el patrón de glicosilación de la PrP^{Sc}, que depende de las proporciones relativas de las formas diglicosilada, monoglicosilada y no glicosilada de la proteína prion (Morales *et al.*, 2007).

II.2.3. SCRAPIE

El scrapie ovino es la primera EET descrita y también la más estudiada, pues los primeros casos se describieron en Inglaterra en 1732. La transmisibilidad de esta enfermedad fue demostrada por primera vez por Cuille y Chelle en 1936, cuando consiguieron infectar ovejas y cabras con tejido nervioso procedente de ovinos con scrapie (Cuille & Chelle, 1936). Esta EET se ha descrito en todo el mundo, a excepción de Australia y Nueva Zelanda. Aunque ha sido una enfermedad endémica en numerosos países durante cientos de años, nunca fue considerada un riesgo para la salud humana.

Sin embargo, el interés por el estudio de esta EET se intensificó en los años 80, con la aparición de la epidemia de la EEB, ya que se consideró que el origen de ésta fue la alimentación del ganado bovino con harinas de carne y hueso que contenían restos de animales infectados con scrapie (Wilesmith *et al.*, 1988; Wilesmith *et al.*, 1991). El posible potencial zoonótico del scrapie se describió posteriormente, tras la transmisión de la enfermedad a modelos murinos que expresan la PrP^c humana (Cassard *et al.*, 2014) y a macacos, en los que la enfermedad aparece tras un largo periodo de incubación (Comoy *et al.*, 2015).

II.2.3.1. Forma clásica y atípica

Se reconocen dos formas de scrapie, la clásica y la atípica. En el caso del scrapie clásico, la enfermedad clínica suele detectarse en animales de entre 2 y 5 años de edad (Ikegami *et al.*, 1991). Los individuos afectados generalmente viven entre 1 y 6 meses tras la aparición de los signos clínicos y, como el resto de las EETs, se caracteriza por un cuadro clínico progresivo y fatal, con la aparición de lesiones espongiiformes en el SNC (Prusiner, 1991, 1998a). Si bien los signos clínicos presentados por los animales afectados pueden ser muy variables en función de la raza, genotipo del gen *PRNP* o cepa infectiva, el scrapie clásico se caracteriza generalmente por la alteración del estado mental, presencia de prurito con pérdida de lana, temblores de cabeza, hiperexcitabilidad a estímulos externos, ataxia y rechinar de dientes (Vargas *et al.*, 2006).

El scrapie atípico se describió por primera vez en Noruega en 1998, por lo que también se le conoce como Nor98 (Benestad *et al.*, 2003). Esta forma de scrapie se definió como “atípica” debido a que la presentación clínica, los genotipos para el gen *PRNP* de los animales afectados, la epidemiología, las características moleculares de la PrP^{Sc} y la distribución neuropatológica de la misma, eran distintas con respecto al scrapie clásico (Benestad *et al.*, 2003; Luhken *et al.*, 2007; Benestad *et al.*, 2008). En general, los casos de scrapie atípico son muy poco frecuentes y aparecen en animales adultos de más de 5 años de edad (Simmons *et al.*, 2010), y se ha propuesto que puede ser una forma espontánea de la enfermedad o una forma infecciosa con tasas de infección muy bajas en condiciones normales (Benestad *et al.*, 2003; Le Dur *et al.*, 2005; Benestad *et al.*, 2008). Los signos clínicos del scrapie atípico son la ataxia, pérdida de peso y cambios de comportamiento como nerviosismo e hiperexcitabilidad. El prurito con pérdida de lana no se observa en esta enfermedad (Benestad *et al.*, 2003; Fast & Groschup, 2013).

II.2.3.2. Susceptibilidad genética al scrapie

El gen PRNP ovino

El gen *PRNP* ovino se localiza en el cromosoma 13 y está compuesto por tres exones, el tercero de los cuales contiene un marco de lectura abierto (*open reading frame*; ORF) (Figura 4) (Iannuzzi *et al.*, 1998). La mayor parte de los polimorfismos descritos en los pequeños rumiantes se localizan en el extremo C-terminal de la PrP^c, entre los codones 98 y 234 (Baylis & Goldmann, 2004). Si bien se han descrito más de 65 mutaciones en este gen, la mayor parte de ellas son mutaciones puntuales que no afectan a la susceptibilidad a la enfermedad (Meydan *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha demostrado que los polimorfismos de los codones 136, 154 y 171 del gen *PRNP* ovino, no sólo están claramente relacionados con la susceptibilidad al scrapie, sino que también son capaces de modular la progresión y la patogenia de la enfermedad, incluyendo el periodo de incubación y los signos clínicos presentados por los animales (Westaway *et al.*, 1994; Cloucard *et al.*, 1995; Gonzalez *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2014). De este modo, el codón 136 puede codificar para valina (V), alanina (A) o treonina (T) (Goldmann *et al.*, 1991; Billinis *et al.*, 2004), el 154 para arginina (R), histidina (H) o leucina (L) (Goldmann *et al.*, 1991; Alvarez *et al.*, 2006), y el 171 para arginina, histidina, glutamina (Q) o lisina (K) (Goldmann *et al.*, 1990; Belt *et al.*, 1995; DeSilva *et al.*, 2003). La combinación de estas variantes da lugar a distintos alelos, de los cuales, los cinco más estrechamente relacionados con la susceptibilidad al scrapie y más significativamente representados en las distintas razas ovinas son ARQ, VRQ, AHQ, ARR y ARH. Estos alelos pueden dar lugar a 15 genotipos diferentes, los cuales han sido clasificados en 5 niveles de riesgo en función de la probabilidad del individuo y de su posible progenie a desarrollar la enfermedad (Tabla 2) (Dawson *et al.*, 1998).

Tabla 2: Clasificación de riesgo a padecer scrapie en función del genotipo para el gen *PRNP* (Dawson *et al.*, 1998)

Categoría de riesgo	Genotipo	Susceptibilidad
<i>Riesgo 1</i>	ARR/ARR	Alta resistencia genética
<i>Riesgo 2</i>	ARR/ARQ, ARR/ARH, ARR/AHQ	Resistencia genética
<i>Riesgo 3</i>	AHQ/AHQ, AHQ/ARH, AHQ/ARQ, ARH/ARH, ARH/ARQ, ARQ/ARQ	Baja resistencia genética
<i>Riesgo 4</i>	ARR/VRQ	Susceptibilidad genética
<i>Riesgo 5</i>	AHQ/VRQ, ARH/VRQ, ARQ/VRQ, VRQ/VRQ	Alta susceptibilidad genética

Sin embargo, el sistema de clasificación descrito en la Tabla 2 no puede aplicarse para el scrapie atípico. A diferencia del scrapie clásico, la mayor parte de los casos de scrapie atípico se dan en animales de los grupos de riesgo 1, 2 y 3. En concreto, los genotipos más afectados son, por orden decreciente de prevalencia, el AHQ/AHQ, seguido por el AHQ/ARQ y el ARR/ARR (Benestad *et al.*, 2008).

Influencia de otros genes

A pesar de que está ampliamente aceptado que los polimorfismos previamente comentados afectan al periodo de incubación de la enfermedad y la susceptibilidad a la misma (Gonzalez *et al.*, 2014), los diferentes tiempos de incubación que se producen en ratones infectados con scrapie con el mismo genotipo, indican que las distintas secuencias aminoacídicas de la proteína prion no son la única influencia genética, por lo que deben de existir otros factores ambientales y/o genéticos independientes de la PrP^c, incluidos loci genéticos adicionales, que puedan contribuir a la variabilidad observada (A. G. Dickinson, 1975; Kingsbury *et al.*, 1983; Westaway *et al.*, 1987; Carlson *et al.*, 1988). Por tanto, los diferentes alelos del gen *PRNP* sólo explican una parte de la variabilidad genética que existe en las EETs (Diaz *et al.*, 2005).

Varios estudios han intentado identificar esos factores genéticos adicionales que modulan la replicación priónica, facilitándola o impidiéndola. De esta forma, a lo largo de los años, mediante estudios de asociación genética a nivel genómico tanto en modelos murinos de EET como en las especies que padecen estas patologías de forma natural, se han identificado genes candidatos o QTL (*quantitative trait loci*) en diferentes cromosomas que podrían explicar las diferencias entre individuos en cuanto al periodo de incubación y susceptibilidad a estas enfermedades, entre los cuales destacan el gen del receptor del ácido retinoico (*RARB*), el gen regulador de la estabilidad de los microtúbulos en células neuronales (*STMN2*), y genes involucrados en el tráfico de membrana (*Cpne8*) (Carlson *et al.*, 1993; Stephenson *et al.*, 2000; Lloyd *et al.*, 2001; C. R. Moreno *et al.*, 2003; Lloyd *et al.*, 2009; Mead *et al.*, 2009). Además, algunos de los genes localizados en regiones cromosómicas portadoras de QTL y asociados a la modulación de la resistencia/susceptibilidad al scrapie en ovejas, como el gen que codifica proteínas con actividad chaperona (*HSP90AA1*), muestran polimorfismos distribuidos de manera distinta entre animales con diferente respuesta a la infección priónica (Marcos-Carcavilla *et al.*, 2008; Marcos-Carcavilla *et al.*, 2010), mientras que otros como el gen que codifica

la proteína receptora antagonista de la interleucina-1 (*IL1RN*) muestran cambios en su expresión génica (Marcos-Carcavilla *et al.*, 2007).

Los estudios genómicos pueden ayudar a comprender mejor los eventos moleculares que conducen a la replicación del prion y a la neurodegeneración. Al igual que ocurre *in vivo*, también se desconocen las razones de la diferente susceptibilidad que presentan algunas líneas celulares y poblaciones neuronales a la infección priónica. Los modelos *in vitro* son una herramienta muy útil para investigar aspectos de la patogénesis de las EETs, como la infección y propagación de los priones (Marijanovic *et al.*, 2009; Goold *et al.*, 2011) o su diseminación (Fevrier *et al.*, 2004). Sin embargo, la mayoría de las líneas celulares neuronales que expresan la PrP^c son resistentes a la infección por priones, lo que indica que se requieren otros factores, además de la PrP^c, para iniciar y mantener la propagación de priones de manera crónica. Recientemente, un estudio identificó una red reguladora de genes asociada a la susceptibilidad y a la replicación priónica en la matriz extracelular (MEC) (Marbiah *et al.*, 2014). Mediante la comparación transcriptómica de líneas celulares con diferentes susceptibilidades a la infección, no explicada por la distinta expresión de la PrP^c, identificaron diferencias de expresión en varios genes cuya actividad se asoció con la inhibición de la propagación priónica, entre ellos el gen que codifica a la cromogranina A (*CHGA*). Algunos de los genes identificados en este estudio codifican proteínas expresadas a nivel de la membrana plasmática o de la MEC, un compartimento donde también se acumula la PrP^{Sc} asociada a la enfermedad. De manera similar, un estudio genómico realizado en scrapie ovino natural durante la etapa preclínica de la enfermedad, identificó una expresión diferencial en genes involucrados en la organización de la MEC (Filali *et al.*, 2012).

La validación *in vivo* de los genes y variaciones genéticas potencialmente asociadas a la replicación del prion, podría facilitar tanto la identificación de individuos en riesgo, permitiendo predicciones más robustas en los parámetros epidemiológicos, como la identificación de rutas bioquímicas involucradas en la enfermedad, lo cual mejorará la comprensión de la patogénesis priónica y el desarrollo de terapias.

II.2.3.3. Patogenia del scrapie

En el scrapie ovino, al igual que en la mayoría de los casos de EETs adquiridas, la PrP^{Sc} penetra en el organismo generalmente por vía oral. Así, la transmisión de esta

enfermedad es principalmente por vía horizontal, bien directa por contacto entre los animales o bien indirecta por la contaminación del ambiente con el agente causal (Hoinville, 1996). Se considera que el consumo de placentas de animales infectados presentes en el ambiente, es la principal vía de transmisión natural del scrapie clásico (Brotherston *et al.*, 1968; A. G. Dickinson *et al.*, 1974).

Tras la infección oral, los priones acceden al organismo fundamentalmente a través del tejido linfoide asociado al intestino, a nivel de las placas de Peyer del íleon caudal. En la incorporación del prion al organismo participan las células M, enterocitos modificados presentes en el epitelio intestinal, que poseen la capacidad para identificar e incorporar proteínas sin degradarlas con el fin de presentarlas como antígenos al sistema linforreticular (SLR). Una vez incorporada la PrP^{Sc} al SLR, ésta se replica en macrófagos y células dendríticas foliculares (Mabbott & Bruce, 2001). Por otro lado, la tonsila palatina es considerada como otro punto fundamental de penetración del prion al organismo cuando la infección se produce por vía oral. El tejido linfoide de la tonsila palatina tiene la función de identificar antígenos que penetran por vía oral. Por tanto, los primeros lugares en los que se acumula la PrP^{Sc} son las tonsilas palatinas y las placas de Peyer del intestino. Se ha detectado presencia de PrP^{Sc} en estas localizaciones incluso en corderos de 21 días de vida (Andreoletti *et al.*, 2000; Andreoletti *et al.*, 2002). Las infecciones experimentales indican que el inóculo se transporta rápidamente al tejido linfoide asociado al intestino y a los linfonodos mesentéricos, pero que la replicación de la PrP^{Sc}, es decir, la PrP^{Sc} generada *de novo*, no se detecta antes de un mes post-infección (Jeffrey *et al.*, 2006). Dada la temprana acumulación del prion en el tejido linfoide, el scrapie puede diagnosticarse, como se comentará en el próximo apartado, mediante la realización de biopsias de la tonsila palatina, la membrana nictitante, la mucosa rectal o el linfonodo retrofaríngeo (Monleon *et al.*, 2005; Langeveld *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2008).

En la enfermedad de scrapie, tras la invasión del SLR puede detectarse infectividad por primera vez en la sangre, la cual aumenta progresivamente hasta el estadio clínico de la enfermedad (Houston *et al.*, 2008; Bannach *et al.*, 2012; Lacroux *et al.*, 2012; Halliez *et al.*, 2014). Aunque el nivel de PrP^{Sc} en este fluido es muy bajo, se ha demostrado que la transfusión de sangre procedente de ovejas asintomáticas infectadas con scrapie puede transmitir la enfermedad priónica a los animales receptores con una

eficacia del 100% (Andreoletti *et al.*, 2012). Otros estudios también han demostrado la infectividad de la sangre durante la fase preclínica de la enfermedad natural, mediante la transfusión de células mononucleares que circulan en la sangre periférica (Dassanayake *et al.*, 2016). Algunos hallazgos adicionales que respaldan la existencia de infectividad circulante, incluyen la acumulación de PrP^{Sc} en órganos no neurales, como el riñón, placenta, glándula salival y glándula mamaria, donde la infectividad es más probable que llegue a través de la sangre (Jeffrey *et al.*, 2001; Andreoletti *et al.*, 2002; Ligios *et al.*, 2005; Vascellari *et al.*, 2007; Siso *et al.*, 2008).

El sistema nervioso entérico (SNE) del duodeno y del íleon es el primer lugar del sistema nervioso periférico (SNP) donde puede detectarse el prion. A medida que la enfermedad progresa, la PrP^{Sc} se distribuye por el SNE en todas las direcciones, dirigiéndose a otras partes del intestino e incluso a otras localizaciones del tubo digestivo como el esófago o los preestómagos (van Keulen *et al.*, 2000). A través de fibras simpáticas y parasimpáticas, los priones ascienden a través de los ganglios celíacos y mesentéricos hasta alcanzar el SNC en dos puntos principales: la médula espinal torácica y la médula oblongada, siendo en ésta última, por lo general, el núcleo motor dorsal del nervio vago (NDV) la zona en la que primero se deposita la PrP^{Sc} (Beekes *et al.*, 1998; Beekes & McBride, 2000). En el caso del scrapie atípico, el prion se deposita fundamentalmente a nivel cerebelar (Benestad *et al.*, 2008). Como alternativa a la infección ascendente a través del SNE/SNP, se ha propuesto que la ruta hematogena puede representar una vía paralela de neuroinvasión, mediante la cual, la PrP^{Sc} alcanzaría el SNC a través de los órganos circunventriculares, en los que la barrera hematoencefálica no existe (Siso *et al.*, 2009).

A medida que el prion se disemina en el SNC aparecen los signos de neurodegeneración: acumulación de depósitos de PrP^{Sc}, espongiosis y vacuolización, gliosis y muerte neuronal (Budka, 2003). Actualmente, se desconocen las vías o rutas moleculares asociadas a la neurodegeneración priónica. Como uno de los objetivos del trabajo de Tesis Doctoral consiste en determinar la posible implicación de la autofagia en la neuropatología asociada al scrapie, los mecanismos moleculares neurotóxicos implicados en la alteración de la homeostasis proteica celular que se han propuesto para explicar la muerte neuronal y la neurodegeneración en las EETs se detallarán en apartados posteriores.

II.2.4. DIAGNÓSTICO

II.2.4.1. Técnicas laboratoriales de diagnóstico

Dado que el agente causal carece de ácidos nucleicos y no produce una respuesta inmune en el hospedador, las EETs no pueden ser diagnosticadas mediante el uso de herramientas como la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*; PCR) o técnicas serológicas. Las técnicas para confirmar el diagnóstico de las EETs, se fundamentan en la observación *post-mortem* de las lesiones espongiiformes características de la enfermedad, junto con la detección directa de la forma resistente a la digestión con PK de la PrP^{Sc}, utilizando muestras de tejido del SNC (OIE, 2008). Estas técnicas se describen brevemente a continuación.

Examen histopatológico del SNC y detección inmunohistoquímica de la PrP^{Sc}

El diagnóstico de las EETs se ha basado históricamente en la observación microscópica de las lesiones histopatológicas características de estos procesos en el SNC, es decir, la vacuolización del pericarion neuronal y del neuropilo de la sustancia gris (o espongiosis) (Wells & McGill, 1992). Por otro lado, la técnica de la inmunohistoquímica (IHQ) se ha convertido en la principal herramienta de diagnóstico de las EETs, ya que permite la detección de los depósitos de PrP^{Sc} en tejidos previamente fijados en formol y posteriormente embebidos en parafina, antes incluso de que aparezcan las lesiones histopatológicas en el SNC (Miller *et al.*, 1993; Foster *et al.*, 1996; Jeffrey *et al.*, 1998; Monleon *et al.*, 2003). El diagnóstico por medio de esta técnica se basa en la detección *in situ* de la PrP^{Sc} mediante la utilización de anticuerpos, permitiendo determinar, no sólo la presencia de la proteína, sino también su localización celular, distribución tisular y las características morfológicas de los depósitos (Gonzalez *et al.*, 2003).

En el scrapie clásico, la vacuolización suele ser más intensa en la médula espinal, el tronco del encéfalo y el tálamo, aunque de manera general, el área más frecuentemente afectada es la médula oblongada a nivel del obex, en concreto, la primera localización anatómica en la que puede observarse la vacuolización es el NDV (Detwiler & Baylis, 2003; OIE, 2008). De forma similar, las primeras zonas del SNC en las que se detectan los depósitos de PrP^{Sc} son el NDV y la médula espinal torácica (Begara-McGorum *et al.*, 2000; Jeffrey *et al.*, 2001; Ryder *et al.*, 2001), y a medida que la enfermedad progresa, la

PrP^{Sc} se distribuye en otras áreas del SNC, generalmente de forma bilateral (Ryder *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2003). Se han descrito hasta 14 tipos de patrones morfológicos de depósito de PrP^{Sc} distintos en esta enfermedad, entre los que se incluyen el intraneuronal, intra-astrocítico, intramicroglial, particulado fino, particulado grueso, coalescente y perineuronal (Jeffrey & Gonzalez, 2007). La distribución de las lesiones y los perfiles inmunohistoquímicos de la PrP^{Sc} pueden variar notablemente entre los individuos en función de varios factores, como la cepa priónica, la vía de infección, el genotipo del gen *PRNP* del hospedador, la duración de la fase clínica, o la edad del animal en el momento de la infección (Bruce & Fraser, 1991; Begara-McGorum *et al.*, 2002; Ligios *et al.*, 2002; Ligios *et al.*, 2004; Spiropoulos *et al.*, 2007).

En cambio, la distribución topográfica de las lesiones y de la PrP^{Sc} es distinta en la forma atípica del scrapie. En este caso, las áreas más afectadas son la corteza cerebelar y cerebral, así como la sustancia negra, tálamo y núcleos basales, mientras que a nivel del tronco del encéfalo, las lesiones y la inmunotinción son de mucha menor intensidad que las observadas en los casos de scrapie clásico (Benestad *et al.*, 2003; Benestad *et al.*, 2008; S. J. Moore *et al.*, 2008). En esta EET, la vacuolización intraneuronal no se observa (S. J. Moore *et al.*, 2008), o es extremadamente infrecuente (Benestad *et al.*, 2003). Los depósitos de PrP^{Sc} son generalmente leves o moderados, y no se detectan en el NDV (Nentwig *et al.*, 2007; Benestad *et al.*, 2008), siendo más frecuentes en el núcleo del tracto espinal del trigémino y en la sustancia blanca del obex (Benestad *et al.*, 2008). Sólo se han observado unos pocos patrones morfológicos de depósito (particulado fino, particulado grueso, placas no vasculares, lineal y perineuronal), sin detectar patrón de tipo intraneuronal (Benestad *et al.*, 2008; S. J. Moore *et al.*, 2008). Además, la localización y severidad de las lesiones e inmunotinción es muy heterogénea entre los individuos afectados, ya que se han descrito casos en los que no se observa acumulación de PrP^{Sc} en el cerebelo, sin existir una correlación aparente entre la diversidad neuropatológica observada y factores como el genotipo del animal (Nentwig *et al.*, 2007).

Técnicas de diagnóstico rápido

Tras la instauración de la vigilancia activa de las EETs en el año 2000, se introdujeron los test de diagnóstico rápido, la mayoría de ellos basados en la técnica del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*enzyme-linked immunosorbent assay*; ELISA), los cuales, mediante el uso de anticuerpos conformacionales, permiten analizar

un elevado número de animales en un tiempo relativamente corto por medio de la detección inmunológica de la PrP^{Sc} en distintas secciones del SNC y del tejido linfoide (Bolea *et al.*, 2005). En la actualidad existen 7 test rápidos autorizados para el diagnóstico de las EETs en pequeños rumiantes y 9 en el caso de la EEB.

Detección de la PrP^{Sc} mediante Western blot

El diagnóstico mediante la técnica de Western blot se basa en la detección del fragmento resistente a la PK de la PrP^{Sc} (Oesch *et al.*, 1985; Deslys *et al.*, 2001). Tras la extracción y digestión de las proteínas, éstas se separan mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, la PrP^{res} se detecta mediante la utilización de anticuerpos específicos. Esta técnica se utiliza para confirmar el diagnóstico cuando las lesiones neuropatológicas son mínimas o inexistentes y en los casos en los que el tejido no es adecuado para el análisis histopatológico por estar dañado debido a procesos de autólisis, congelación o destrucción del tejido (Katz *et al.*, 1992; Mohri *et al.*, 1992). Además, también permite diferenciar cepas del agente causal, ya que en función de la conformación del mismo, la PrP^{res} da lugar a distintos patrones electroforéticos según su grado de glicosilación y el lugar de escisión de la PK (Collinge *et al.*, 1996; Telling *et al.*, 1996; Somerville *et al.*, 1997).

Técnicas no convencionales de detección de priones

PMCA: La amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (*protein misfolding cyclic amplification*; PMCA) es una técnica de replicación de priones *in vitro* desarrollada con el objetivo de simular su propagación *in vivo*. La PMCA consiste en la incubación de pequeñas cantidades de PrP^{Sc} con un sustrato que contenga PrP^c. Esta mezcla se somete a ciclos seriados de sonicación e incubación, durante los cuales la PrP^{Sc} se comporta como una semilla reclutando moléculas de PrP^c e induciendo su mal plegamiento, siendo éstas moléculas incorporadas en oligómeros (Jarrett & Lansbury, 1993; Caughey *et al.*, 1995; Soto *et al.*, 2002; Soto *et al.*, 2006). Los priones que se generan *in vitro* son infecciosos cuando se inoculan en un huésped susceptible, y mantienen generalmente las características bioquímicas, estructurales y neuropatológicas de la PrP^{Sc} procedente de encéfalos de animales enfermos, produciendo una enfermedad de similares características a la que se desarrolla tras la inoculación de material nervioso infeccioso (Castilla, Saa,

Hetz, *et al.*, 2005). Debido a que la concentración de la PrP^{Sc} fuera del SNC es muy baja, su amplificación en muestras biológicas por medio de técnicas ultrasensibles de detección de priones es uno de los pocos métodos de diagnóstico *in vivo* de la enfermedad. De hecho, la PMCA permite detectar pequeñas cantidades de priones en muestras de fluidos biológicos como sangre, orina o líquido cefalorraquídeo (LCR) (Castilla, Saa, & Soto, 2005; Atarashi *et al.*, 2007; Gonzalez-Romero *et al.*, 2008).

Bioensayo: Desde la primera transmisión experimental del scrapie a ovejas y cabras (Cuille & Chelle, 1936, 1938) los bioensayos en animales se han utilizado ampliamente en la investigación de las enfermedades priónicas. A pesar de que éstos métodos presentan limitaciones, como los largos periodos de incubación y el efecto de la barrera de especie, los bioensayos siguen siendo la técnica más sensible para la detección de priones en material potencialmente infeccioso (Institute of Medicine, 2003). La primera transmisión del scrapie a ratones en 1961 supuso un gran avance en la investigación de las EETs (Chandler, 1961), y más tarde, las mejoras en los modelos murinos llevaron a la creación de cepas endogámicas de ratones que ayudaron a dilucidar el papel del gen *Prnp* del ratón en la susceptibilidad, los periodos de incubación y la transmisibilidad de los priones. Como ya hemos mencionado, el pase seriado de priones a través de estas líneas endogámicas permite la tipificación de cepas priónicas (H. Fraser & Dickinson, 1968; Bruce & Fraser, 1991).

II.2.4.2. Búsqueda de biomarcadores diagnósticos

Un biomarcador se define como una sustancia discriminante que puede ser medida objetivamente y que se utiliza como un indicador de procesos biológicos o patológicos, o de respuesta farmacológica a un tratamiento terapéutico (Huzarewich *et al.*, 2010). Desde el comienzo de la crisis alimentaria provocada por la EEB, se han realizado notables esfuerzos para desarrollar métodos sensibles de detección del agente causante de las EETs y buscar otros marcadores de la enfermedad, para así controlar la propagación de estas enfermedades tanto en humanos como en animales. Sin embargo, y hasta la fecha, la proteína PrP^{Sc} es el único componente conocido del agente causal, y su detección directa de manera *post-mortem* en los tejidos de los individuos enfermos se utiliza como el único marcador de la presencia y distribución de la infectividad (Aguzzi & Falsig, 2012).

En el caso del scrapie ovino, el diagnóstico mediante la observación de los signos clínicos previamente descritos, junto con la detección de PrP^{Sc} en tejido linfoide obtenido mediante biopsias del tercer párpado (Vargas *et al.*, 2006), tonsilas (van Keulen *et al.*, 1996) y/o mucosa rectal (Monleon *et al.*, 2005) son los únicos métodos de diagnóstico *in vivo*. Sin embargo, la sensibilidad de estos métodos de diagnóstico es inexacta. Esto se debe a que el cuadro clínico del scrapie es difuso, ya que no existen signos patognomónicos de la enfermedad, y a que la distribución del prion en los tejidos linfoides puede variar considerablemente en función del genotipo del animal y de la cepa priónica infectiva (van Keulen *et al.*, 1996; Andreoletti *et al.*, 2000; Monleon *et al.*, 2011). Asimismo, el uso de la PrP^{Sc} como biomarcador eficaz de diagnóstico *in vivo* durante la fase preclínica de la enfermedad no se considera un método fiable, ya que la presencia de la PrP^{Sc} es mínima en tejidos y fluidos corporales fácilmente accesibles como la sangre o la orina (Gough & Maddison, 2010). Además, aunque las pruebas convencionales previamente comentadas para el diagnóstico *post-mortem* se consideran sensibles y específicas, éstas pueden mostrar una discordancia significativa entre la cantidad detectable y la cantidad real de la proteína prion que genera la infección, ya que se han descubierto nuevas isoformas patológicas de la PrP^c que son sensibles a la PK y no son detectables por los métodos diagnósticos actuales (Gambetti *et al.*, 2008; Andreoletti *et al.*, 2012). Todo esto acentúa la necesidad de identificar biomarcadores distintos a la PrP^{Sc} como herramientas para el diagnóstico de las EETs, que puedan ser detectados durante la fase inicial de la enfermedad a partir de un tejido o fluido accesible, lo que aumentaría considerablemente las posibles estrategias de tratamiento.

Desde hace años, el campo de investigación de las EETs se ha centrado en intentar caracterizar los eventos y mecanismos moleculares implicados en la patogenia y en la neurodegeneración inducida por los priones. Las herramientas genómicas, como el uso de microarrays (Ness, 2006) o la secuenciación masiva del transcriptoma (Mortazavi *et al.*, 2008; Rosenkranz *et al.*, 2008; Wilhelm *et al.*, 2008), permiten comparar los niveles de expresión génica global entre muestras de individuos enfermos y sanos, o entre diferentes etapas de la enfermedad, para así poder determinar genes implicados en la patogénesis priónica que puedan servir como posibles biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad, o como dianas para su uso en estrategias terapéuticas (Huzarewich *et al.*, 2010). Los estudios de expresión genómica en muestras del SNC tanto de individuos afectados por la enfermedad natural, incluido el scrapie ovino, como de modelos murinos

adaptados a las EETs, han permitido identificar hasta el momento un gran número de genes diferencialmente transcritos, que señalan alteraciones generalizadas en varias vías de la función neuronal, como el ciclo celular, la muerte celular y la respuesta al estrés, contribuyendo de esta forma al conocimiento de las rutas moleculares que intervienen en la patogenia de la EETs (Dandoy-Dron *et al.*, 1998; Booth *et al.*, 2004; Xiang *et al.*, 2005; Cosseddu *et al.*, 2007; Filali *et al.*, 2011; Basu *et al.*, 2012; Filali *et al.*, 2012). Algunos de estos estudios transcriptómicos realizados en scrapie ovino han confirmado cambios de expresión génica descritos en modelos murinos de scrapie, en la ECJ, y en otras enfermedades neurodegenerativas como la EA, asociando estos cambios con alteraciones neuropatológicas (Filali *et al.*, 2011; Filali *et al.*, 2012).

Sin embargo, muy pocos de ellos se han confirmado como biomarcadores útiles para el diagnóstico de estas enfermedades, ya que se requieren estudios experimentales adicionales antes de utilizar estas moléculas como biomarcadores o dianas terapéuticas en ensayos clínicos (Huzarewich *et al.*, 2010). La confirmación de un biomarcador génico requiere un proceso de validación funcional convincente incluyendo estudios que añadan información y confianza a estos potenciales biomarcadores mediante cuantificación proteica, utilizando técnicas de inmunoensayo, como la IHQ, Western blot y ELISA, para determinar el nivel de proteínas codificadas por los genes que presentan niveles de regulación transcripcional diferenciales. Como ejemplos de genes validados a nivel funcional destaca el gen *SCRG1* (*scrapie responsive gene 1*), que se encuentra sobreexpresado en modelos experimentales de scrapie y EEB (Dandoy-Dron *et al.*, 1998; Dandoy-Dron *et al.*, 2000) y se ha visto relacionado tanto con el estrés y muerte neuronal como con el proceso de autofagia (Dron *et al.*, 2005), y los genes *CAPN6*, *GALA1*, *MTNR1B* y *MT2A*, recientemente confirmados como potenciales biomarcadores en scrapie ovino natural (Filali *et al.*, 2013). Algunos de los biomarcadores proteómicos que se han identificado en fluidos biológicos como el LCR, y que están siendo muy útiles en el diagnóstico de las EETs humanas, incluyen la proteína 14-3-3, tau y S-100 β (Green *et al.*, 2001; Otto *et al.*, 2002; Blennow *et al.*, 2005; Llorens *et al.*, 2018).

Durante los últimos años, los miRNAs han ganado atención como posibles biomarcadores diagnósticos obtenidos de manera mínimamente invasiva, ya que a menudo son secretados por los tejidos afectados a fluidos corporales como la sangre, suero, plasma o LCR, donde muestran gran estabilidad debido a la protección conferida

por chaperonas o vesículas como los exosomas (Mitchell *et al.*, 2008). En varias enfermedades neurodegenerativas se ha observado con frecuencia alteraciones en el metabolismo del RNA, incluyendo el de los miRNAs, ya que estas moléculas son fácilmente identificables mediante el uso de herramientas básicas de identificación molecular, como las técnicas de expresión genómica (Hruska-Plochan *et al.*, 2015). Sin embargo, muy pocos estudios han investigado si la modulación de los miRNAs se encuentra alterada en las EETs. Algunos de ellos, han descrito variaciones en los perfiles de expresión de miRNAs producidas entre la etapa preclínica y terminal de la infección priónica (Majer *et al.*, 2012; Boese *et al.*, 2016). En el SNC de ratones infectados con scrapie se encontraron alteraciones en 15 miRNAs distintos (Saba *et al.*, 2008; Saba *et al.*, 2012), algunos de ellos, como el miR-342-3p, mostraron una alteración similar en muestras cerebrales de modelos experimentales de EEB y de pacientes con eECJ (Montag *et al.*, 2009). Además, los exosomas liberados *in vitro* por células neuronales infectadas por priones muestran perfiles de miRNAs alterados cuando se comparan con exosomas de células no infectadas (Bellingham, Coleman, *et al.*, 2012). A día de hoy, se desconoce cómo la desregulación en los niveles de los miRNAs se relaciona con la patogénesis de las EETs.

Como se ha comentado anteriormente, además de miRNAs, los exosomas también transportan material celular dañado destinado a la degradación, por lo que pueden facilitar la diseminación de formas tóxicas de proteínas que pueden ser absorbidas por las células, como la α -sinucleína, la A β y la PrP^{Sc}, promoviendo de esta forma la formación de nuevos agregados de proteínas en la célula receptora y contribuyendo a la progresión de la enfermedad (Fevrier *et al.*, 2004; Bellingham, Guo, *et al.*, 2012; J. L. Guo & Lee, 2014; Kalani *et al.*, 2014). Aunque existen muy pocos estudios sobre la infectividad de los exosomas en las EETs, se asume que la PrP^{Sc} exosomal promueve la diseminación de la enfermedad tanto en el SNC como en el SLR, debido a la capacidad de estas vesículas para cruzar la barrera hematoencefálica (Hartmann *et al.*, 2017). Inicialmente, la asociación entre exosomas y PrP^{Sc} se observó en cultivos celulares infectados con priones (Fevrier *et al.*, 2004), y más tarde, se demostró un vínculo entre la liberación de partículas retrovirales, la presencia de PrP^{Sc}, y la infectividad priónica en exosomas (Alais *et al.*, 2012). Además, se ha descrito que la liberación de PrP^{Sc} de las células y la infectividad priónica se atenúan al inhibir la biogénesis del exosoma *in vitro*, y su estimulación, aumenta la liberación de exosomas infecciosos (Vilette *et al.*, 2015; B. B. Guo *et al.*,

2016). Recientemente se demostró que, tanto los exosomas aislados de estos experimentos *in vitro*, como los exosomas aislados de plasma de ratones infectados con priones, contienen infectividad, y son capaces de transmitir la enfermedad priónica *in vivo*, demostrando el papel de los exosomas de plasma como posibles portadores de PrP^{Sc} en la sangre (Cervenakova *et al.*, 2016; B. B. Guo *et al.*, 2016).

La búsqueda de nuevos biomarcadores, y la validación a nivel proteico de los potenciales biomarcadores génicos ya identificados, siguen siendo necesarios en las EETs, principalmente en hospedadores naturales de la enfermedad como el scrapie ovino, ya que la mayoría de estudios genómicos se han realizado en ratones modelo de EET. Dado que los exosomas se liberan al espacio extracelular, conteniendo tanto la PrP^{Sc} (Bellingham, Guo, *et al.*, 2012), como repertorios específicos de miRNAs que muestran un perfil de expresión alterado *in vitro* tras la infección priónica (Bellingham, Coleman, *et al.*, 2012), su estudio *in vivo* en fluidos biológicos fácilmente accesibles, como plasma o LCR, podría proporcionar nuevos biomarcadores asociados a estas enfermedades (Goetzl *et al.*, 2015). Las nuevas técnicas existentes permiten la detección de cantidades mínimas de PrP^{Sc} en exosomas de sangre (Berrone *et al.*, 2015; Properzi *et al.*, 2015), y actualmente, el análisis del LCR constituye una de las pocas pruebas auxiliares para establecer un diagnóstico *in vivo* en la enfermedad priónica humana (Glatzel *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2006). Debido a que la mayoría de los biomarcadores descritos hasta el momento se detectan en un estado avanzado de la enfermedad, el estudio de la infectividad de los exosomas y de las alteraciones en los perfiles de expresión de los miRNAs, en distintas etapas de la infección, permitiría identificar nuevas moléculas implicadas en la patogénesis de las EETs que puedan ser útiles como biomarcadores de diagnóstico preclínico.

II.2.5. NEUROTOXICIDAD Y ESTRÉS CELULAR EN LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS

Uno de los principales problemas de la etiopatogenia de las EETs es la causa de la degeneración neuronal con la eventual muerte de las mismas (J. R. Fraser, 2002; Liberski *et al.*, 2002). Está ampliamente aceptado que el evento patológico básico es la conversión de la forma normal de la proteína priónica en su isoforma mal plegada patológica. A este respecto, la mayoría de estudios se han centrado en descubrir los mecanismos neurotóxicos desencadenados por la PrP^{Sc}, aunque la verdadera vía

intracelular aún no se ha determinado. Dado que parece probable que algún evento extracelular desencadene la vía intracelular neurotóxica que conduce a la muerte celular, varios investigadores han intentado identificar moléculas de unión en la superficie de la célula que podrían iniciar el proceso intracelular, entre ellas la PrP^c (D. R. Brown, 2000). Entre los mecanismos que se han propuesto, se ha descrito que la unión del péptido PrP106-126 a la PrP^c provoca la inhibición directa de la actividad antioxidante de la misma, causando una marcada reducción en la resistencia de las neuronas al estrés oxidativo y una disminución en la actividad de otras enzimas antioxidantes como la Cu/Zn superóxido dismutasa (D. R. Brown *et al.*, 1997; Hegde *et al.*, 1998; D. R. Brown, 2000).

Sin embargo, aún no se ha determinado si la PrP^{Sc} causa que las neuronas mueran debido al efecto neurotóxico de la propia PrP^{Sc}, o a la pérdida de función de la PrP^c. El hecho de que la inactivación del gen *PRNP* en ratones y vacas no cause neurodegeneración (Steele, Lindquist, *et al.*, 2007), indica que la patogénesis de las enfermedades priónicas no se debe a la pérdida de la función de la PrP^c, sino a una ganancia de toxicidad tras su conversión en PrP^{Sc}. Curiosamente, la PrP^{Sc} extracelular mata solamente a las neuronas que expresan la PrP^c, lo que sugiere que la PrP^c desempeña un papel importante en el mecanismo involucrado haciendo que las células sean susceptibles a la neurotoxicidad (Bueler *et al.*, 1993; Brandner *et al.*, 1996). De forma similar, la desactivación de la expresión de la PrP^c neuronal en ratones infectados con priones, evita la enfermedad clínica y la pérdida neuronal, a pesar de la producción continua de PrP^{Sc} (Mallucci *et al.*, 2003). Además, ratones transgénicos que expresan una forma de PrP^c que carece del anclaje GPI y se secreta al espacio extracelular en lugar de unirse a la membrana, no desarrollan la típica patología priónica tras la infección con scrapie, a pesar de acumular grandes cantidades de PrP^{Sc} extracelular (Chesebro *et al.*, 2005; Chesebro *et al.*, 2010). Por lo tanto, la PrP^{Sc} no es directamente tóxica para las neuronas, sino que es la conversión de la PrP^c endógena la que causa la disfunción neuronal y la muerte.

La neurotoxicidad puede desencadenarse por el plegamiento incorrecto de la PrP^c en compartimentos celulares distintos, principalmente en la superficie celular o dentro de la propia célula, aunque también es probable que estos mecanismos coexistan y contribuyan de manera diferente a la patogénesis y a la variable presentación clínica de las distintas enfermedades priónicas (Chiesa, 2015). Existen varias evidencias que

sugieren que son las alteraciones en la estructura de la PrP^c de la superficie neuronal las que provocan los efectos tóxicos que conducen a la muerte de la célula, debido a una modificación en la permeabilidad en la membrana y a un desequilibrio de la homeostasis iónica (Baumann *et al.*, 2007; A. Li *et al.*, 2007; Khosravani *et al.*, 2008; Chiesa, 2015). Sin embargo, los datos disponibles actualmente sugieren que la disfunción y muerte neuronal pueden estar causadas por mecanismos que se originan inicialmente como una respuesta de supervivencia a la acumulación intracelular de la PrP^c mal plegada. Recientemente se ha propuesto que la alteración de las distintas vías celulares que mantienen la homeostasis proteica es una de las principales causas de toxicidad en estos trastornos, aunque la relación causal entre estas observaciones y la patogenia de la enfermedad sigue siendo una conjetura (Lindquist & Kelly, 2011; C. Hetz & Mollereau, 2014).

II.2.5.1. PrP mal plegada en el RE

Las múltiples vías específicas de estrés celular que se activan durante una enfermedad priónica se inician como respuesta a la acumulación de PrP^{Sc} en el RE, aunque la secuencia de las mismas no está clara debido al complejo cruzamiento entre las distintas vías de señalización y la poca probabilidad de que funcionen de manera lineal (Mays & Soto, 2016). Es poco probable que la PrP^{Sc} sea el factor que inicie el proceso ya que ésta se acumula de manera habitual en la membrana plasmática y en el compartimento endo-lisosomal, en lugar de en el RE (Caughey & Raymond, 1991; Vey *et al.*, 1996; Peters *et al.*, 2003; Sunyach *et al.*, 2003). Sin embargo, algunas formas de PrP mal plegadas que comparten similitudes con la isoforma infecciosa también parecen estar presentes tanto en el RE como en el citosol (Kristiansen *et al.*, 2005; Grenier *et al.*, 2006; Kristiansen *et al.*, 2007; Rane *et al.*, 2008). La progresiva acumulación de PrP^{Sc} hace que se generen subtipos de proteínas mal plegadas en el RE que presentan una conformación intermedia entre la PrP^c y la PrP^{Sc} (Chakrabarti *et al.*, 2009), y podrían, a su vez, tener un efecto estimulador en la formación de más PrP^{Sc} (Beranger *et al.*, 2002; C. Hetz *et al.*, 2007). Además, se estima que un 10% de la PrP^c se pliega incorrectamente de manera natural a medida que transita a través del RE (J. Ma & Lindquist, 2001; Yedidia *et al.*, 2001). Se han descrito tres subtipos intermedios de proteínas mal plegadas como resultado de una inadecuada traslocación desde la luz del RE: una completamente traslocada (cyPrP) y dos variantes transmembrana (^{Ntm}PrP y ^{Ctm}PrP) (Figura 6A) (S. J.

Kim & Hegde, 2002; Drisaldi *et al.*, 2003; Mironov *et al.*, 2003). Aunque estas formas se han observado en grandes cantidades en condiciones experimentales, su presencia y relevancia en situaciones naturales, así como su grado de contribución al avance de la enfermedad, son inciertos, si bien se especula que puedan ser el origen de ciertas formas familiares y/o esporádicas de enfermedades priónicas (Chiesa, 2015).

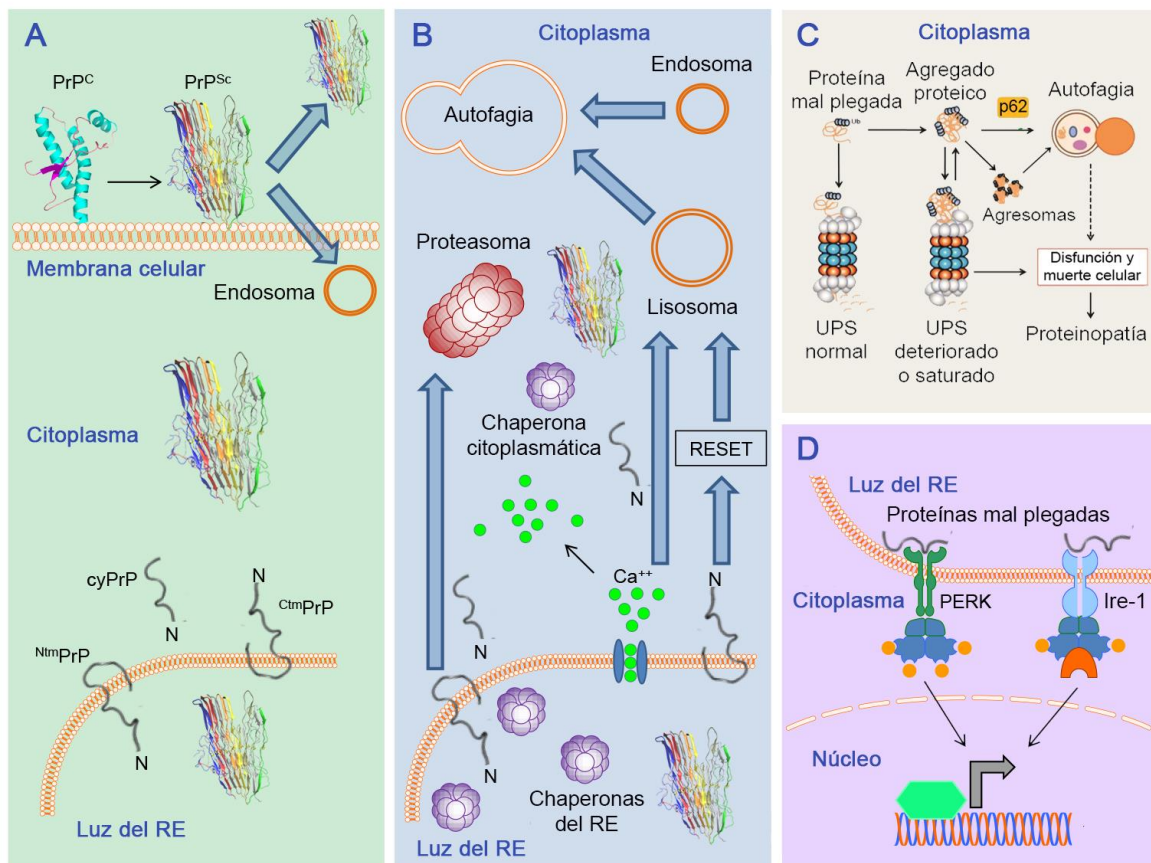


Figura 6: Vías de estrés celular activadas por la formación de PrP^{Sc}. (A) Las rutas se inician como respuesta a la conversión de PrP^c en PrP^{Sc} o por una traslocación ineficiente en el RE. Una vez generada, la PrP^{Sc} continúa propagándose hacia el interior de la célula por medio de endosomas. Algunas formas de PrP mal plegadas que comparten similitudes con la PrP^{Sc} también se encuentran tanto en el RE como en el citosol. (B) Los niveles de chaperonas se incrementan para corregir la abundancia de proteínas mal plegadas y el calcio del RE se agota. La célula responde a la continua acumulación de PrP^{Sc} transportándola para su degradación hacia el UPS. (C) Cuando se sobrepasa la capacidad degradativa del proteasoma, los agregados proteicos acumulados inducen la disfunción y muerte celular y, en consecuencia, la proteinopatía. En esta situación, se activa una degradación compensatoria por parte de la autofagia para suprimir la muerte celular inducida por el deterioro del UPS. (D) Las vías PERK e Ire-1 del UPR se activan para generar factores de transcripción y reducir la síntesis de proteínas. El estrés prolongado del RE y el fracaso al intentar recuperar la homeostasis, hacen que el UPR dirija finalmente a la célula a la disfunción y muerte neuronal. Adaptada de (Zheng *et al.*, 2009; Mays & Soto, 2016).

II.2.5.2. Mecanismos de degradación de proteínas

La retención de PrP en el RE induce el estrés de este orgánulo, lo cual marca el inicio de la activación de varias cascadas de señalización celulares cuya función principal es evitar la acumulación de cadenas proteicas deficientemente plegadas (C. Hetz & Mollereau, 2014). Dado que la luz del RE carece de maquinaria de degradación, la célula responde inicialmente a la continua acumulación de proteínas mal plegadas retrotranslocándolas al citosol como parte de la ruta de degradación asociada al retículo endoplasmático (*ER-associated protein degradation*; ERAD) para ser degradadas por el UPS (Figura 6B) (D. N. Hebert & Molinari, 2007).

Al igual que la autofagia, la alteración de la funcionalidad del UPS, mediante su inhibición o mediante deficiencias genéticas primarias, es suficiente para causar una proteinopatía neuronal (McNaught *et al.*, 2004; Bedford *et al.*, 2008; Tashiro *et al.*, 2012). Además, la actividad catalítica de este sistema también se ha visto implicada en la degradación específica de varias proteínas patológicas (Bennett *et al.*, 1999; Martin-Aparicio *et al.*, 2001; Webb *et al.*, 2003; Kabuta *et al.*, 2006; X. Li *et al.*, 2010; Bhat *et al.*, 2014), incluidas ciertas formas mutantes de la PrP a través del ERAD (Zanusso *et al.*, 1999; T. Jin *et al.*, 2000) y la PrP^{Sc} (Goold *et al.*, 2013). En modelos experimentales *in vitro*, la aplicación de inhibidores del proteasoma provoca un rápido incremento en la formación de agregomas y en los niveles de expresión de la PrP^{Sc}, pero no en los de la PrP^c, lo que indica que el blanco principal del UPS es la degradación de la propia proteína alterada (Kawaguchi *et al.*, 2003; Goold *et al.*, 2013). No obstante, esta proteína no parece estar ubiquitinada en un grado significativo, por lo que su estado como sustrato natural del proteasoma permanece abierto a debate (Cammarata & Tabaton, 1992; Kang *et al.*, 2004; G. G. Kovacs *et al.*, 2005).

Muchos estudios actuales han encontrado alteraciones del UPS en una amplia variedad de proteinopatías, incluidas las enfermedades priónicas, generalmente asociando la neurodegeneración con una función deteriorada de este sistema, aunque no está claro si la disminución de la actividad proteasómica es una causa o efecto de la enfermedad (McNaught *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2004; Olanow & McNaught, 2006). El grado de disfunción de este sistema y la acumulación de sustratos proteasómicos durante el transcurso de la enfermedad priónica *in vivo*, principalmente en su última etapa, es más fuerte en las regiones del encéfalo que presentan una mayor cantidad de depósitos de

PrP^{Sc} y se correlaciona con una disminución progresiva de la actividad catalítica del UPS (Kristiansen *et al.*, 2007; Deriziotis *et al.*, 2011; McKinnon *et al.*, 2016). Se cree que la infección con priones daña el UPS por la interacción directa entre la PrP^{Sc} y el proteasoma, lo que produce la inhibición específica de la actividad del núcleo catalítico (Kristiansen *et al.*, 2007; Deriziotis *et al.*, 2011). La degradación proteasómica puede estar restringida a proteínas mal plegadas solubles o formas oligoméricas pequeñas que puedan ser desplegadas para permitir su entrada al núcleo catalítico, mientras que para agregados más grandes o insolubles esta subunidad puede permanecer inaccesible (Qin *et al.*, 2003; Scotter *et al.*, 2014).

Cuando la acumulación de proteínas ubiquitinadas dañadas o mal plegadas sobrepasa la capacidad degradativa del proteasoma, o éste se encuentra inhibido, comienzan a depositarse agregados proteicos intracelularmente que inducen la disfunción y muerte celular y, en consecuencia, la proteinopatía (Figura 6C) (Bence *et al.*, 2001; Ogata *et al.*, 2006). En esta situación, se ha descrito la activación de una degradación compensatoria por parte de la principal vía alternativa de eliminación de proteínas celulares, la autofagia, la cual tiene la capacidad de captar agregados proteicos más grandes para facilitar su degradación en masa en los lisosomas y suprimir la muerte celular inducida por el deterioro del UPS (Ding *et al.*, 2007; Harada *et al.*, 2008; Korolchuk *et al.*, 2010; Araki & Nagata, 2011). Mientras que las proteínas de tipo *wild-type* parecen ser degradadas preferencialmente por el UPS, la autofagia tiene un mayor efecto en la degradación de las formas patológicas (Webb *et al.*, 2003; Shibata *et al.*, 2006). La degeneración causada por la reducción de la actividad proteasómica se incrementa cuando se reduce también la actividad autofágica, y ésta se mitiga significativamente tras la inducción de la autofagia (Pandey *et al.*, 2007). Además del UPS y la autofagia, recientemente se ha descrito una nueva vía de degradación presente en el RE denominada RESET, que es capaz de degradar ciertos subtipos mal plegados de la PrP transportándolos al aparato de Golgi, y después, tras un breve tránsito por la membrana plasmática, a los lisosomas, lo que sugiere que el proteasoma y la autofagia no son siempre las rutas de degradación predeterminadas durante el estrés del RE (Ashok & Hegde, 2009; Satpute-Krishnan *et al.*, 2014).

II.2.5.3. Homeostasis del calcio y chaperonas

La alteración en la proteostasis celular modifica a su vez la homeostasis del calcio del RE, produciéndose una liberación temprana del mismo desde el orgánulo hacia el citoplasma, y provoca un aumento drástico en los niveles de chaperonas y enzimas plegadoras para corregir la abundancia de proteínas mal plegadas del RE (Figura 6B) (C. Hetz *et al.*, 2003; Sitia & Braakman, 2003; Torres *et al.*, 2010). Una vez se agota el calcio del RE, el porcentaje de proteínas recién sintetizadas que se pliegan de manera incorrecta y se acumulan en la luz del RE aumenta, principalmente porque muchas chaperonas y enzimas plegadoras del RE requieren calcio para mantener una actividad óptima (C. Hetz & Mollereau, 2014). La participación de las chaperonas en las enfermedades priónicas se sugirió inicialmente al encontrar niveles más altos de Grp58, Grp78, Grp94, Hsp70 y PdiA1 en pacientes con ECJ (Shyu *et al.*, 2000; Yoo *et al.*, 2002; C. Hetz *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2015), en cultivos celulares (Shyu *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2010) y en varios modelos experimentales *in vivo* infectados con priones (Kenward *et al.*, 1994; C. Hetz *et al.*, 2005; S. B. Wang *et al.*, 2012). Un estudio previo de nuestro grupo de investigación reveló un incremento en la inmunotinción de Hsp70 y Hsp90 en las células de Purkinje en el modelo natural de scrapie, sugiriendo que estas proteínas ejercen alguna función relevante durante la enfermedad priónica (Serrano *et al.*, 2011). Además, se ha descrito que Hsp70 reduce aproximadamente un 40% la acumulación de la PrP insoluble y sensible a las proteasas en moscas transgénicas que expresan la PrP^c, así como la neurotoxicidad responsable de la degeneración espongiiforme en las neuronas y de la disfunción locomotora (Fernandez-Funez *et al.*, 2009).

II.2.5.4. Respuesta a proteínas desplegadas (UPR)

La acumulación de proteínas mal plegadas en la luz del RE, y la consecuente alteración de la homeostasis proteica, provoca que la célula active el sistema de represión traduccional de respuesta a proteínas desplegadas (*unfolded protein response*; UPR). La UPR es el principal mecanismo de protección durante el estrés del RE, cuyo objetivo fundamental consiste en activar varias cascadas de señalización para reducir la síntesis de proteínas, recuperar el equilibrio con los sistemas de degradación y generar factores de transcripción en un intento para restablecer el balance en la proteostasis y el funcionamiento normal de la célula (Schroder & Kaufman, 2005). Se han descrito tres vías de acción mecánicamente distintas en la UPR, cada una de ellas iniciándose con un

receptor de estrés distinto ubicado en la membrana del RE: Ire-1, PERK (*protein kinase (PKR)-like ER kinase*) y ATF6 (*activating transcription factor 6*) (Figura 6D) (Walter & Ron, 2011). Algunas de estas rutas han demostrado ser particularmente significativas en la patología priónica (J. A. Moreno *et al.*, 2012; C. Hetz & Mollereau, 2014). Concretamente, la inhibición *in vitro* de la ruta Ire-1 aumenta significativamente los agregados mal plegados de PrP, mientras que su sobreexpresión disminuye la acumulación de los mismos (Orsi *et al.*, 2006; C. Hetz *et al.*, 2007). Además, un estudio en ratones infectados con priones demostró la activación de la vía PERK en el hipocampo a medida que aumentan los niveles de PrP^{Sc} (J. A. Moreno *et al.*, 2012), aunque esto puede ser una respuesta específica de esta zona puesto que otros estudios sólo han detectado una activación débil o nula al analizar el encéfalo completo en diferentes modelos murinos en fase terminal (Unterberger *et al.*, 2006; C. Hetz *et al.*, 2008; Mays *et al.*, 2014).

II.2.5.5. Muerte neuronal y apoptosis

A pesar de que la UPR comienza como un proceso de supervivencia orientado a restaurar el equilibrio entre la síntesis y la degradación de proteínas, el estrés prolongado del RE y el fracaso al intentar recuperar la homeostasis, hacen que el UPR dirija finalmente a la célula a la disfunción y muerte neuronal por inducción de la apoptosis (Schroder & Kaufman, 2005; C. A. Hetz & Soto, 2006). El cambio de la UPR hacia programas pro-apoptóticos está mediado por la activación de la caspasa-12, la cual inicia la apoptosis induciendo la actividad de la caspasa-3 (Mehmet, 2000). Varias de las rutas mencionadas anteriormente, como la alteración de la homeostasis del calcio, o las vías Ire-1 y PERK de la UPR, pueden inducir la apoptosis a través de la activación de la cascada de caspasas (C. Hetz *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2013). Desafortunadamente, a pesar de los grandes esfuerzos de los investigadores durante los últimos años, el mecanismo apoptótico exacto que tiene lugar durante la enfermedad priónica y las rutas celulares que conducen a la pérdida neuronal no están del todo claras. Es más, la existencia de una relación directa entre los depósitos de PrP^{Sc} y la pérdida de las neuronas, sigue siendo una conjetura.

Las neuronas solo pueden degenerar, y finalmente morir, a través de un número limitado de rutas patológicas. La necrosis celular está causada por una agresión cerebral repentina que produce la destrucción de toda la célula, cuyos restos atraen a las células

inflamatorias. Debido a que el SNC afectado por una EET carece de respuesta inmunológica clásica (P. Brown, 1990), las neuronas deberían morir por mecanismos de MCP y no por necrosis, ya que en la MCP las células siguen una secuencia jerárquica controlada con elementos codificados genéticamente y no atraen ninguna respuesta inflamatoria. La apoptosis, o MCP de tipo I, en su significado original se refiere a un fenómeno morfológico caracterizado a nivel ultraestructural por la condensación de la cromatina, contracción celular, picnosis, formación de protuberancias en la membrana plasmática, y fragmentación del núcleo (Kerr *et al.*, 1972). La integridad de la membrana plasmática se mantiene hasta las últimas fases del proceso (Kroemer & Jaattela, 2005), y en la etapa final, la célula se rompe en pequeños fragmentos llamados cuerpos apoptóticos que son fagocitados por macrófagos o, en el caso de las neuronas, por células microgliales sin incitar ninguna respuesta inflamatoria (Kerr *et al.*, 1972). Este proceso de muerte celular, que tiene un curso de tiempo muy rápido y se completa en unas pocas horas, está regulado por una red altamente conservada de moléculas que incluye a la familia Bcl-2, caspasas, y Apaf-1 (Yuan *et al.*, 2003).

Al igual que en el resto de enfermedades neurodegenerativas, en las EETs, la apoptosis se ha convertido en el concepto más popular de muerte celular y se utiliza en un sentido más amplio del que originalmente se acuñó, convirtiéndose prácticamente en un sinónimo de muerte celular no necrótica o incluso de MCP. Utilizando la técnica TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), varios estudios han identificado neuronas en estado de apoptosis tanto en EETs naturales como en las inducidas experimentalmente (Dorandeu *et al.*, 1998; Jesionek-Kupnicka *et al.*, 2001; J. R. Fraser, 2002), y mediante la técnica ISEL (*in situ end labeling*) se demostró la presencia de células apoptóticas en ECJ natural y experimental (Ferrer, 1999; Gray *et al.*, 1999; Jesionek-Kupnicka *et al.*, 1999) y en la EEB (Theil *et al.*, 1999). La fragmentación característica del DNA también se observó mediante LSM (*laser scanning microscopy*) en scrapie natural (Fairbairn *et al.*, 1994). Además, varios estudios *in vitro* en líneas neuronales infectadas con PrP^{Sc} han descrito un incremento en el procesamiento de la caspasa-12, así como una activación progresiva de la caspasa-3 y la apoptosis (C. Hetz *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2010). De forma similar, en las últimas fases de varias enfermedades priónicas humanas y animales, se ha observado la activación de la caspasa-12 y pequeñas alteraciones en genes relacionados con la apoptosis (Park *et al.*, 2000; C. Hetz *et al.*, 2003; Lyahyai *et al.*, 2006).

Todos estos estudios sugieren colectivamente que las neuronas en estas enfermedades mueren debido a la apoptosis. Sin embargo, a pesar de estos hallazgos, los datos sobre el papel de la apoptosis en las EETs, o incluso sobre si las neuronas mueren por apoptosis, son contradictorios. Mientras que algunos investigadores han detectado fácilmente apoptosis en varios modelos de roedores infectados con scrapie (Giese *et al.*, 1995; Lucassen *et al.*, 1995; Kretzschmar *et al.*, 1997; A. Williams *et al.*, 1997; Giese & Kretzschmar, 2001; Jamieson *et al.*, 2001), otros no han encontrado evidencias claras de este proceso utilizando modelos de scrapie similares (Migheli *et al.*, 1994; Migheli *et al.*, 1995) o incluso en el modelo natural de la enfermedad (Lyahyai *et al.*, 2006; Lyahyai *et al.*, 2007). Además, en ratones que sobreexpresan la proteína anti-apoptótica Bcl-2, y en ratones knock-out para la caspasa-12 o la proteína pro-apoptótica Bax, no se han observado cambios significativos en cuanto al progreso de la enfermedad o replicación priónica (Chiesa *et al.*, 2005; Coulpier *et al.*, 2006; Steele, Hetz, *et al.*, 2007), lo cual indica que la ruta principal de muerte celular podría implicar una vía no apoptótica, o bien que la apoptosis es un proceso de etapa tardía que puede no ser muy importante para el inicio y progresión de la enfermedad priónica (Mays & Soto, 2016). Actualmente no existen evidencias claras y convincentes de apoptosis neuronal que cumpla los criterios de su definición clásica en la mayoría de enfermedades neurodegenerativas (Graeber & Moran, 2002), y del resto de tipos reconocidos de MCP, sólo la autofagia ha sido descrita en las EETs, aunque su papel en la patología de estas enfermedades no se ha esclarecido.

II.2.6. AUTOFAGIA EN LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS

Hasta hace una década, los datos sobre la autofagia en las EETs eran muy limitados y consistían en su mayoría en estudios ultraestructurales de microscopía electrónica. La aparición de vacuolas autofágicas en las neuronas durante una enfermedad priónica fue descrita por primera vez por Boellaard *et al.* en modelos experimentales de ECJ y scrapie en ratones y hámsters (Boellaard *et al.*, 1989; Boellaard *et al.*, 1991). Este descubrimiento se volvió a describir más tarde en cultivos de células neuronales infectadas con priones que exhiben varias características de neurodegeneración, en los que también se observó la presencia de cuerpos multi-vesiculares y vacuolas autofágicas (Schatzl *et al.*, 1997). Posteriormente se han observado vacuolas autofágicas en diferentes etapas de formación en el pericarion neuronal, neuritas y sinapsis en ECJ, GSS y scrapie inducido experimentalmente (Liberski *et al.*, 2004), y han sido identificadas en las

sinapsis de biopsias cerebrales de pacientes con varias formas de enfermedad priónica humana (Sikorska *et al.*, 2004). En consecuencia, la simple presencia de vacuolas autofágicas tanto *in vivo* como *in vitro* en las EETs está relativamente bien demostrada. Todos estos hallazgos sugieren un papel de la autofagia en las enfermedades priónicas, lo cual motivó a muchos investigadores a analizar en detalle si existe algún tipo de vínculo entre la autofagia y la infección por priones, sobre todo por el impacto que este proceso ha resultado tener en otras enfermedades neurodegenerativas (Bursch & Ellinger, 2005; Rubinsztein, 2006). Para ello, los estudios actuales se han centrado en el estudio de la actividad autofágica, y la evaluación del efecto de su manipulación genética y farmacológica sobre la enfermedad priónica.

II.2.6.1. Alteraciones de la autofagia en la enfermedad priónica

Además del aumento en el número y tamaño de las vacuolas autofágicas, endosomas tardíos y lisosomas (Boellaard *et al.*, 1991; Sikorska *et al.*, 2004; Liberski *et al.*, 2010), durante los últimos años también se han observado otro tipo de anomalías en este sistema degradativo en las EETs. Para evaluar el flujo autofágico, es necesario un análisis comparativo entre la acumulación de LC3-B y p62, los marcadores de autofagia más utilizados en la actualidad (Jeong & Park, 2015; Niklaus *et al.*, 2017). De esta manera, se han observado con frecuencia alteraciones en los niveles de expresión de estas proteínas en varios modelos infectados con priones tanto *in vivo* como *in vitro*, sugiriendo una activación del proceso autofágico para facilitar la eliminación de las proteínas agregadas, o una acumulación progresiva de autofagolisosomas con la capacidad de degradación alterada (Xu *et al.*, 2012; Homma *et al.*, 2014; Moon *et al.*, 2016; Thellung *et al.*, 2018). También, se ha observado una disminución de los niveles de expresión del mRNA de *beclin-1* y *Atg5* en el encéfalo de ratones infectados con scrapie, indicando una disfunción de la autofagia sin alteración en la formación de los autofagosomas (Mok *et al.*, 2007), y una disminución en la expresión proteica de ATG5 con presencia de vesículas autofágicas anormales en el encéfalo de modelos murinos de eECJ (Llorens *et al.*, 2017). Otra relación interesante entre la autofagia y las enfermedades priónicas se observó en estudios relacionados con la proteína Scrg1, cuya expresión a nivel ultraestructural se asoció con vacuolas autofágicas en las neuronas de ratones infectados con scrapie (Dron *et al.*, 2005).

II.2.6.2. Función de la PrP^c en la regulación de la autofagia

Varios estudios han demostrado la participación de la PrP^c en la modulación de la ruta autofágica. En las neuronas del hipocampo de ratones *Prnp*^{-/-} se observó un aumento de expresión del marcador LC3-II en comparación con las neuronas control de ratones tipo *wild-type*, y este incremento se contrarrestó mediante la reintroducción de la PrP^c en las células *Prnp*^{-/-}, por lo que se sugirió que esta proteína podría desempeñar un papel crucial en el control de la autofagia en células neuronales (Oh *et al.*, 2008). Aunque la deficiencia de la PrP^c no afecta el flujo de autofagia basal bajo condiciones de cultivo normales, las neuronas *Prnp*^{-/-} son más sensibles al estrés oxidativo debido a la alteración de la autofagia (Oh *et al.*, 2012; H. Y. Shin *et al.*, 2013). *In vivo*, la expresión de Doppel (Dpl), proteína homóloga de la PrP codificada por el gen *Prnd* (*doppel protein*), en el SNC de ratones *knock-out* para la proteína prion, da como resultado un incremento en los niveles proteicos de Scrg1, LC3-II y p62, ataxia tardía y efectos neurodegenerativos con acumulación de autofagosomas en las células de Purkinje (Sakaguchi *et al.*, 1996; R. C. Moore *et al.*, 1999; Rossi *et al.*, 2001; Heitz *et al.*, 2010). Además, la expresión de la PrP^c puede incrementar la actividad autofágica a través de la modulación de $\alpha 7$ nAChR (*alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor*) para proteger a las neuronas contra la toxicidad del péptido PrP106-126 (Jeong & Park, 2015).

II.2.6.3. Autofagia en la degradación de la PrP^{Sc}

Existen claras evidencias experimentales que indican que la autofagia está implicada en la degradación de los priones. Por un lado, mediante experimentos *in vitro* en cultivos de líneas celulares que propagan los priones de manera estable, como los cultivos de neuroblastomas, se ha descrito que los lisosomas desempeñan un papel activo en la degradación de los priones a través de la degradación directa de la PrP^{Sc} que se encuentra en la superficie celular (Jeffrey *et al.*, 2003; Goold *et al.*, 2013). De forma similar, varios estudios *in vivo* han demostrado que la PrP^{Sc} se colocaliza con marcadores lisosomales (Dearmond & Bajsarowicz, 2010) y que la mayor parte de la PrP^{Sc} intracelular se encuentra en el sistema endo-lisosomal (Goold *et al.*, 2015). Aunque se han propuesto otras vías no autofágicas de degradación de los priones a través de los lisosomas, como la vía endo-lisosomal que canaliza una significativa proporción de la PrP^{Sc} recién endocitada para su rápida degradación (Yamasaki *et al.*, 2014), o la vía RESET que degrada algunos mutantes genéticos de la PrP (Ashok & Hegde, 2009;

Satpute-Krishnan *et al.*, 2014), la autofagia parece ser la principal ruta de administración de la PrP^{Sc} a los lisosomas, al menos en células infectadas de manera crónica (Heiseke *et al.*, 2010; H. Yao *et al.*, 2013). Los diferentes mecanismos observados para la degradación de los priones probablemente sean debidos a los distintos tipos de células utilizadas y a las formas mal plegadas de la PrP estudiadas (PrP^{Sc} recién formada, PrP^{Sc} madura o isoformas mutantes de la PrP) (Goold *et al.*, 2015).

Además, la inducción de la autofagia por compuestos químicos tiene efectos beneficiosos y da como resultado la disminución de la carga celular de PrP^{Sc} tanto *in vivo* como *in vitro*, probablemente por un aumento en la degradación lisosómica que desplaza el equilibrio entre la propagación y degradación del prion hacia esta última, aunque se desconocen los mecanismos moleculares exactos. Al igual que los estudios previamente mencionados sobre las formas mutantes de la HTT o de las α -sinucleínas (Sarkar *et al.*, 2005; Sarkar *et al.*, 2007), en las EETs también se ha demostrado que tanto el litio como la trehalosa mejoran la eliminación de la PrP^{Sc} en cultivos de células de neuroblastoma infectadas con priones mediante la inducción de la autofagia (Aguib *et al.*, 2009; Heiseke *et al.*, 2009). El tratamiento con litio no sólo reduce la PrP^{Sc}, sino también los niveles de PrP^c, ya que esta proteína puede quedar al alcance de la maquinaria de degradación autofágica tras su incorporación intracelular (Heiseke *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta que la reducción de PrP^c disminuye la conversión de la proteína en su isoforma patológica limitando la cantidad de sustrato disponible para la conversión, la reducción de la PrP^c a través de la autofagia inducida por el tratamiento con litio puede contribuir indirectamente a la reducción de PrP^{Sc} (Marella *et al.*, 2002; Parkin *et al.*, 2004; Aguib *et al.*, 2008; Heiseke *et al.*, 2008). También la rapamicina puede reducir el nivel celular de la PrP^{Sc} en cultivos de neuroblastoma, lo que demuestra que ambas vías de inducción de autofagia, dependientes e independientes de mTOR, están implicadas en la degradación del prion (Heiseke *et al.*, 2009). El papel fisiológico de la autofagia en la degradación de la PrP^{Sc} se ha sugerido tanto por la mayor eliminación de esta proteína durante su inducción, como por la elevada acumulación de la misma durante la inhibición del proceso mediante el bloqueo farmacológico o el silenciamiento de genes (Ertmer *et al.*, 2004; Ertmer *et al.*, 2007; Aguib *et al.*, 2009; Heiseke *et al.*, 2010; Goold *et al.*, 2013).

II.2.6.4. Papel de la autofagia en las enfermedades priónicas

Actualmente no está claro cuál es la función biológica *per se* de la autofagia durante la infección priónica. Inicialmente se propuso que este proceso podría participar en la patología general de las EETs contribuyendo en la formación de cambios espongiiformes, una característica patológica distintiva de estas enfermedades (Liberski *et al.*, 2002; Liberski *et al.*, 2004; Liberski *et al.*, 2008). Actualmente, la histogénesis de las vacuolas típicas de las EETs se encuentra sin explicación, ya que la mayoría de los estudios ultraestructurales han sido incapaces de determinar los orgánulos subcelulares de los que se originan estas vacuolas, aunque se han propuesto la mitocondria y el RE (Jeffrey *et al.*, 1995). También se ha sugerido que las vacuolas pueden formarse de manera relativamente abrupta sin etapas de transición detectables (Liberski *et al.*, 2008). Para explicar esto, se ha especulado que la vacuolización de las EETs está de alguna manera relacionada con la destrucción del tejido por autofagia, lo cual implicaría que las vacuolas autofágicas deberían detectarse antes de las vacuolas espongiiformes. De hecho, en la fase terminal de scrapie en ovejas y en varias EETs humanas, se ha observado poca o ninguna actividad autofágica y gran vacuolización y, al contrario, en fases tempranas de la enfermedad priónica en modelos experimentales de roedores, se ha descrito tanto autofagia como vacuolización (Jeffrey *et al.*, 1992; Liberski *et al.*, 1992; Liberski & Mori, 1997; Liberski *et al.*, 2005; Liberski *et al.*, 2008). Por tanto, la acumulación excesiva de PrP^{Sc} podría provocar la fagocitosis del citoplasma neuronal, la sobrecarga de la maquinaria catabólica y, finalmente, la eliminación masiva de las neuronas dañadas a través de la autofagia (Jeffrey *et al.*, 1992).

En contraste con esta suposición de que la autofagia desempeña una función promotora de la degeneración neuronal en la enfermedad, es también probable que el aumento de vacuolas autofágicas observado en modelos de enfermedad priónica se deba a la activación de la maquinaria autofágica como mecanismo de defensa que refleja un intento de las neuronas por sobrevivir en el ambiente nocivo producido por la PrP^{Sc}, conduciendo incluso a la degradación de los priones (Heiseke *et al.*, 2010). En el tejido cerebral de ratones infectados con priones se han detectado niveles reducidos de marcadores lisosomales y autofágicos, sugiriendo que una disfunción endosomal y/o lisosomal en combinación con una autofagia reducida podría contribuir al desarrollo de la enfermedad priónica (Mok *et al.*, 2007). Por lo tanto, es razonable suponer que el

proceso básico de la autofagia pueda tener un papel fisiológico en las EETs y sea utilizado por la célula para controlar o contrarrestar la infección priónica (Heiseke *et al.*, 2010).

Aunque la inducción de la autofagia es beneficiosa tanto en células como en animales infectados con priones, la importancia de este mecanismo para controlar el procesamiento de la PrP^{Sc} no está del todo definida. Hay que tener en cuenta que este proceso también podría ser un factor positivo para la propagación de priones, ya que sigue sin estar claro si la autofagia aumentada puede tener efectos nocivos (Heiseke *et al.*, 2010). Un nivel moderado de autofagia basal podría ser beneficioso para generar semillas de PrP^{Sc} más pequeñas, las cuales se han descrito que son modelos más eficientes para la conversión de PrP^c en PrP^{Sc} que los agregados más grandes (Silveira *et al.*, 2005). Así que, aunque la autofagia inducida puede eliminar o reducir tanto los priones como las semillas de PrP^{Sc}, un nivel moderado de autofagia podría favorecer la producción de estas semillas durante ciertas etapas de la infección, promoviendo así la enfermedad priónica (Heiseke *et al.*, 2010). Por otro lado, también se ha sugerido que los agregomas de PrP^{Sc} pueden formar semillas para generar más PrP^{Sc} mediante un proceso de nucleación (E. Cohen & Taraboulos, 2003). Los agregomas activan la autofagia mediante la inducción de la formación de autofagosomas (Kopito, 2000; Garcia-Mata *et al.*, 2002), y a su vez son captados por vacuolas autofágicas que se fusionan con los lisosomas, donde el proceso de nucleación puede iniciarse o perpetuarse. Estos estudios indican que un cierto nivel de autofagia puede ser un modificador positivo de la infección priónica y de la susceptibilidad a la misma, aunque en la actualidad no está claro si los cambios que se producen en los niveles de autofagia son un requisito previo o consecuencia de la infección (Heiseke *et al.*, 2010). Por lo tanto, no se puede descartar que la autofagia posea una función doble que combine efectos pro- y anti-priónicos, pudiendo haber situaciones en las que sea incluso necesaria para la propagación de los priones, lo que recuerda a la aparente dualidad funcional que desempeña este proceso en la muerte celular (Mizushima *et al.*, 2008).

II.2.6.5. Autofagia y terapia en las enfermedades priónicas

Actualmente, no existen tratamientos terapéuticos o profilácticos efectivos para las enfermedades priónicas, ni se dispone de ningún fármaco terapéuticamente útil. Dada la compleja patogénesis de estas enfermedades, se han planteado una gran variedad de estrategias terapéuticas, algunas de ellas dirigidas a prevenir la conversión priónica para

reducir la síntesis de PrP^{Sc}. Por ejemplo, algunas propuestas consisten en disminuir la expresión de la PrP^c o su tráfico a la membrana plasmática para reducir su disponibilidad para la conversión priónica (Gilch *et al.*, 2001; Tilly *et al.*, 2003), utilizar chaperonas químicas que estabilicen la estructura de la PrP^c para evitar el plegamiento incorrecto (Cortez & Sim, 2014), o compuestos que eviten la interacción de la PrP^c con la PrP^{Sc} (Caughey & Race, 1992; Caughey & Raymond, 1993; Priola *et al.*, 2000). Sin embargo, es probable que la patogénesis de las enfermedades priónicas sea de origen multifactorial, con muchos elementos contribuyendo a la toxicidad (Aguzzi & Falsig, 2012). En muchos casos, la síntesis de PrP^{Sc} no se puede suprimir fácilmente debido a que a menudo están involucradas mutaciones genéticas en la misma (Zheng *et al.*, 2009). Los datos existentes indican que las neuronas no logran recuperar la homeostasis tras la exposición a la PrP^{Sc}, lo que inevitablemente conduce al daño celular y a un tipo de muerte que puede o no implicar a la apoptosis (Mays & Soto, 2016), por lo tanto, los tratamientos dirigidos a la causa tóxica básica, es decir, la acumulación de PrP^{Sc}, deberían ser eficaces para mejorar todos los aspectos de la toxicidad (Goold *et al.*, 2015).

De acuerdo con esta hipótesis, la estimulación de los sistemas degradativos de la célula reduce rápidamente los niveles de la PrP^{Sc}, mientras que un bloqueo en los mismos produce un significativo incremento (Ertmer *et al.*, 2004; Goold *et al.*, 2013). Existen dos poblaciones de PrP^{Sc} dentro de la célula infectada: una población en la membrana plasmática constituida por PrP^{Sc} recién formada, que es altamente lábil, se metaboliza rápidamente y es un sustrato para la degradación lisosómica no autofágica (Caughey & Raymond, 1991; Goold *et al.*, 2013), y una población internalizada que comprende la mayoría de la PrP^{Sc} celular total, la cual está más agregada, es relativamente estable y está sujeta a la degradación autofágica y proteasómica (Boellaard *et al.*, 1991; Caughey & Raymond, 1991; Heiseke *et al.*, 2010; Goold *et al.*, 2013; H. Yao *et al.*, 2013). Aunque el UPS se ha propuesto como una diana interesante para el tratamiento contra la infección priónica, a día de hoy permanece intratable, ya que el incremento de la función de este sistema podría acelerar la degradación de reguladores intracelulares importantes de vida corta y, por lo tanto, ser perjudicial para la célula (Seo *et al.*, 2007). Además, los reactivos capaces de estimular la actividad del UPS aún no se han caracterizado de manera completa, ni se ha probado su eficacia en modelos de enfermedad priónica (Goold *et al.*, 2015).

Por el contrario, la autofagia parece ser más susceptible a la manipulación. Aunque existen varias hipótesis, aún no se ha determinado por completo cómo la autofagia puede proteger contra la neurodegeneración. Como posibles mecanismos que expliquen la efectividad terapéutica de este sistema, se ha propuesto que la autofagia ayuda a eliminar la proteína tóxica básica que causa la enfermedad, elimina orgánulos dañados como la mitocondria, y atenúa la respuesta apoptótica a varias formas de estrés, haciendo que la célula sea resistente a la MCP (Ravikumar *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2007). A día de hoy, existen amplias evidencias experimentales de que la inducción de la actividad de la autofagia a través de la intervención farmacológica es capaz de reducir rápidamente los niveles de la PrP^{Sc} celular total, lo que indica que la estimulación de este sistema degradativo es suficiente para superar la aparente estabilidad de los niveles internos de la PrP^{Sc} (Ertmer *et al.*, 2004; Goold *et al.*, 2013). Algunos de los tratamientos que reducen la carga de PrP^{Sc} a través de la inducción de la autofagia en modelos celulares también han resultado ser efectivos *in vivo* al ser aplicados por vía intraperitoneal en ratones infectados con priones, tanto en términos de reducción de la proteína como de efectos beneficiosos clínicos (Aguib *et al.*, 2009; Heiseke *et al.*, 2009; H. Yao *et al.*, 2013). El tratamiento con imatinib, rapamicina o litio durante la fase temprana de la infección priónica, prolonga de manera significativa el periodo de incubación y la esperanza de vida y retrasa tanto la neuroinvasión de la PrP^{Sc} como el inicio de los signos clínicos a través de la inducción de la formación de autofagosomas y de la autofagia (Ertmer *et al.*, 2007; Yun *et al.*, 2007; Heiseke *et al.*, 2009; Cortes *et al.*, 2012). Desafortunadamente, la administración de algunos de estos fármacos en el momento en el que la neuroinvasión ya se ha producido, no provoca una degradación clara de la PrP^{Sc} en el SNC. Todas estas mejoras relativamente modestas pueden reflejar la dificultad para alcanzar las concentraciones farmacológicas necesarias *in vivo* probablemente debido a la escasa capacidad de estos fármacos para atravesar la barrera hematoencefálica, o a que sus concentraciones efectivas son particularmente elevadas (Goold *et al.*, 2015). En general, aunque son necesarios estudios adicionales y más complejos que incluyan también la combinación de medicamentos, es razonable suponer que la reducción de la carga de PrP^{Sc} mediante la estimulación de la autofagia podría representar una intervención terapéutica efectiva para el tratamiento de las enfermedades priónicas en el futuro.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que el potencial de esta estrategia terapéutica para el conjunto de las enfermedades neurodegenerativas puede depender en gran medida de complejos factores específicos de cada enfermedad. Por tanto, es necesario adquirir una comprensión más detallada de cómo está involucrada la maquinaria autofágica a nivel celular durante el curso patogénico ya que, a nivel de todo el organismo, el impacto de manipular la autofagia dependerá de la dinámica concreta de la enfermedad y de los cambios que produce en el organismo (Heiseke *et al.*, 2010). Además, no hay que olvidar la posible contribución patogénica de la activación de la autofagia, por lo que, en última instancia, el grado de intervención terapéutica dependerá de si esta ruta degradativa puede ser modulada de forma segura para que las células permanezcan viables y funcionales. Desafortunadamente, el análisis de la autofagia en las enfermedades priónicas se encuentra incompleto en la actualidad. Una mejor comprensión de la autofagia y sus consecuencias para la neurodegeneración, puede proporcionar nuevos conocimientos sobre los mecanismos patogénicos de la autofagia disfuncional que subyacen a las enfermedades neurodegenerativas comunes y, principalmente, puede beneficiar al desarrollo de estrategias terapéuticas innovadoras y efectivas para estas enfermedades basadas en la manipulación de este proceso. Por lo tanto, además de estudios *in vitro* más detallados, se requieren experimentos apropiados en modelos *in vivo* para esclarecer el impacto de la autofagia en la infección priónica y para validar si este proceso desempeña un papel general bajo el contexto de estas enfermedades.

III. ESTUDIOS

**Dysfunction of autophagy in the central nervous
system of sheep naturally infected
with classical scrapie**

Manuscrito enviado para su publicación

*Óscar López Pérez, Alicia Otero, Hicham Filali, David Sanz Rubio, Janne
Markus Toivonen, Pilar Zaragoza, Juan José Badiola,
Rosa Bolea, Inmaculada Martín Burriel*

Dysfunction of autophagy in the central nervous system of sheep naturally infected with classical scrapie

ABSTRACT

Autophagy is a dynamic cellular mechanism involved in protein and organelle turnover through lysosomal degradation. Autophagy regulation modulates the pathologies associated with many neurodegenerative diseases. Using sheep naturally infected with scrapie as a natural animal model of prion diseases, we investigated the autophagic activity in the central nervous system (CNS) during the clinical stage of the disease. We present a gene expression and protein distribution analysis of different autophagy-related markers and investigate their relationship with prion-associated lesions in several areas of the CNS. Gene expression of autophagy markers *ATG5* and *ATG9* was downregulated in some areas of scrapie brains. In contrast, *ATG5* protein accumulates in highly affected areas and positively correlates with prion deposition and scrapie-related lesions. The accumulation of this protein and p62, a marker of autophagy impairment, suggests that the autophagic activity is perturbed in the late phases of the disease. However, the increment of LC3 proteins and the mild expression of p62 in basal ganglia and cerebellum, primarily in Purkinje cells, suggests that autophagy machinery is still intact in less affected areas. We hypothesize that specific cell populations of the CNS may display neuroprotective mechanisms against prion-induced toxicity through the induction of PrP^{Sc} clearance by autophagy.

INTRODUCTION

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), or prion diseases, are a group of fatal neurodegenerative disorders that can affect humans and animals (Prusiner, 1998). TSEs include kuru, Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and its variant, Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) disease, and fatal familial insomnia (FFI) in humans, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle, and scrapie in sheep and goats (Poser, 2002). Scrapie was the first TSE known and can be considered a good natural animal model to study the neuropathological mechanisms of these diseases (Pattison & Jones, 1967).

Prion diseases are characterized by a rapidly progressing course that leads inevitably to death, usually within a few months. According to the protein-only hypothesis (Prusiner, 1982), TSEs are caused by the conversion of the normal mammalian cellular prion protein (PrP^c) into its pathological conformation, or scrapie-associated prion protein (PrP^{Sc}), which is abnormally folded, β -sheet enriched and partially protease resistant. Hence, prion diseases share profound similarities with other protein misfolding and neurodegenerative diseases like Alzheimer's (AD), Huntington's (HD) and Parkinson's (PD) disease (Aguzzi & Haass, 2003). The accumulation of PrP^{Sc} in the central nervous system (CNS) induces neuronal degeneration, vacuolation of the neuronal cell bodies (intraneuronal vacuolation) and neuropil (spongiosis), glial cell activation and neuronal loss by cellular death (Budka, 2003).

Although several mechanisms have been proposed to explain neuronal death in prion diseases, apoptosis and autophagy are the types of cell death considered most likely to be involved (Liberski *et al.*, 2004). Studies on the molecular mechanisms underlying neuronal apoptosis in brains of ovine naturally infected with scrapie have shown that, besides the upregulation of the pro-apoptotic protein BAX (BCL-2 Associated X, Apoptosis Regulator) and its correlation with neuropathological features of scrapie, this process appears to be blocked somehow, or it is present at extremely low levels (Lyahyai *et al.*, 2006; Lyahyai *et al.*, 2007). Apoptosis arrest could be a consequence of the activation of neuroprotective pathways that counteract massive cell death.

Autophagy is a fundamental cellular process involved in the turnover of long-lived proteins, protein complexes, cytoplasmic constituents and whole organelles through lysosomal degradation, in response to external and internal triggers. One of the primary roles of autophagy is to respond to nutrient starvation by producing amino acids (Mizushima, 2005). Besides this fundamental role, autophagy contributes to other physiological processes such as intracellular clearance, differentiation, organismal development and elimination of invading pathogens (Mizushima, 2005; Mizushima *et al.*, 2008). Paradoxically, despite these pro-survival functions, autophagy can also mediate a non-apoptotic cell death, also called autophagic cell death (Kroemer *et al.*, 2005). When properly regulated, autophagy supports normal cellular and developmental processes, whereas autophagic dysfunction is associated with several pathologies, including neurodegenerative disorders (Larsen & Sulzer, 2002). It is still difficult to decipher

whether active autophagy in the degenerating neurons plays a protective role, contributes to pathogenic neuronal death, or both.

Autophagy seems to be the main route of PrP^{Sc} degradation (Yao *et al.*, 2013) and autophagic vacuoles have been described in experimental models of prion diseases, in induced scrapie and in the natural disease in humans (Boellaard *et al.*, 1989; Boellaard *et al.*, 1991; Liberski *et al.*, 2004; Sikorska *et al.*, 2004). During the last decade, the role of autophagy in prion diseases has been investigated in induced murine models of prion diseases (Xu *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2015; Liberski *et al.*, 2017; Llorens *et al.*, 2017), and new treatments for prion diseases based on the activation of the autophagic flux have been tested in cell culture (Abdulrahman *et al.*, 2017; Jeong *et al.*, 2017; Lai *et al.*, 2018; Thellung *et al.*, 2018). However, the biological role of autophagy in the natural disease, or even the relationship of this process with prion-related pathology, are still poorly understood. Investigating this process in natural models such as ovine scrapie could possibly help in understanding the role of autophagy in human prion diseases, as studies on human brain samples are very few and generally suffer from small number of replicates (Xu *et al.*, 2012).

Autophagy requires activity of numerous proteins involved in distinct steps of this degradative route (Levine & Klionsky, 2004). Among these, ATGs (autophagy-related proteins), MAP1-LC3s (microtubule-associated protein 1 light chain 3 proteins, hereafter referred to as LC3) and p62/SQSTM1 (sequestosome 1) have been previously analysed in detail in different neurodegenerative diseases. The aim of this study was to analyse the autophagic activity in the CNS of sheep naturally infected with scrapie in a clinical stage. Through the combination of gene expression and immunohistochemical analysis of autophagy markers, the relationship between autophagy induction and prion pathology is presented, showing clear regional differences in autophagy regulation in response to the disease.

MATERIALS AND METHODS

Animals and sample collection

In this work, 12 female sheep (Rasa Aragonesa breed), including six controls and six animals naturally infected with scrapie, were used. Scrapie infected animals were

adults of age 56.30 ± 5.76 months, and displayed the ARQ/ARQ genotype for *PRNP* (prion protein) gene (homozygous for polymorphism at codons 136, 154 and 171), which is the most frequently observed genotype in scrapie animals from this breed (Acin *et al.*, 2004). These animals came from scrapie-infected flocks from several geographical regions and were diagnosed *in vivo* by the clinical signs associated with the disease. To confirm the diagnosis of scrapie post-mortem, we used immunohistochemistry (IHC) to detect PrP^{Sc} in the medulla oblongata with the L42 monoclonal antibody, as described in the “Histopathological and PrP^{Sc} detection studies” section below. Control animals ($n=6$) of the same genotype, breed, sex, and similar age (48.81 ± 16.93 months) were selected from flocks belonging to scrapie-free regions. To reveal any additional polymorphisms in the *PRNP* gene, we sequenced the coding region from the experimental sheep following the previously described methods (Serrano *et al.*, 2007). Table 1 shows detailed characteristics of the experimental animals. Protective polymorphism at codon 141 (Houston *et al.*, 2015) was observed in one control sheep. Variation in codon 143 displayed heterozygous and homozygous genotypes for the rare variant 143R in two control sheep. Finally, dimorphism at codon 176 was detected in other control sheep. Scrapie infected sheep did not display additional polymorphisms.

Table 1: Age and *PRNP* genotype of the animals used

Group	Animal ID	Age (months)	<i>PRNP</i> genotype
Control	S1 (-)	37.7	ARQ/ARQ
	S2 (-)	67.1	ARQ/ARQK ₁₇₆
	S3 (-)	54.9	ARQ/ARQ
	S4 (-)	56.47	ARQ/AF ₁₄₁ RQ
	S5 (-)	56.56	AR ₁₄₃ RQ/AR ₁₄₃ RQ
	S6 (-)	20.16	ARQ/AR ₁₄₃ RQ
Scrapie	S7 (+)	59.86	ARQ/ARQ
	S8 (+)	60.50	ARQ/ARQ
	S9 (+)	63.83	ARQ/ARQ
	S10 (+)	50.43	ARQ/ARQ
	S11 (+)	52.06	ARQ/ARQ
	S12 (+)	51.13	ARQ/ARQ

Animals were sacrificed by intravenous injection of sodium pentobarbital and exsanguination, with subsequent necropsy. Post-mortem examination of the animals did not reveal any additional pathologies. Sample collection followed the established safety guidelines. Immediately after extraction, the whole brain was divided into two sagittal

halves. One of these halves was fixed in 10% neutral-buffered formalin for histopathological and immunohistochemical analysis and the other one was immediately frozen on dry ice and maintained at -80°C temperature until RNA extraction for gene expression studies.

Histopathological and PrP^{Sc} detection studies

Brain slices (2-3 mm) were paraffin-embedded and intraneuronal vacuolation and neuropil spongiosis were evaluated in 4 µm sections stained with haematoxylin-eosin (HE) in eight brain areas: frontal cortex (Fc), basal ganglia (Bg), basal ganglia cortex (Bgc), thalamic cortex (Tc), thalamus (T), pons (P), cerebellum (Cbl) and medulla oblongata (Mo). In addition, five neuronal nuclei of the Mo were also studied: the hypoglossal motor nucleus (HMN), the dorsal nucleus of the vagus nerve (NVN), the lateral cuneate nucleus (LCN), the nucleus of the trigeminal nerve spinal tract (NTN) and the olivary nucleus (ON). IHC for PrP^{Sc} detection in the selected regions was performed as previously described (Monleon *et al.*, 2004) using the mouse monoclonal antibody L42 [1:500 dilution at room temperature (RT) for 30 minutes (min); R-Biopharm, Darmstadt, Germany] as the primary antibody.

Gene expression

To analyse the expression of *ATG5*, *BECN1*, *ATG9* and *LC3-B* genes by quantitative real-time PCR (qRT-PCR), total RNA was isolated from Fc, T, Cbl, and Mo using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Crawley, UK) according to the manufacturer's instructions. Tissue samples were homogenised using a TeSeE Precess 48 (Bio-Rad, CA, USA) and TURBO DNase (Ambion, Austin, TX, USA) was used to remove possible genomic DNA contamination. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 µg of total RNA using random hexamers with the Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Table 2 shows the specific primers for the genes of interest used for qRT-PCR. In order to improve the accuracy of normalization we used the geometric mean of the expression of three housekeeping genes (*GAPDH*, *G6PDH* and *RPL32*) in the same sample as normalization factor. These housekeeping genes are the three most stably expressed reference genes in sheep brain (Lyahyai *et al.*, 2010). Their use as internal

references in previous expression studies concerning scrapie infection and the primers and PCR conditions used for their amplification have been previously described (Lyahyai *et al.*, 2010).

Table 2: Primer sequences for each gene analysed. Final concentrations of primers in the real-time PCR reaction mix, size of the fragment amplified and GenBank accession number are also given. **F: forward and R: reverse**

Gene	Primer sequence	Concentration (nM)	Size (bp)	Accession number
ATG5	F: 5' AAGCAACTCTGGATGGGTTTACA 3'	300	95	AM086994.1
	R: 5' CCATTTTCTTCTGCAGGATATTCC 3'	300		
BECN1	F: 5' CTGGACACGAGCTTCAAGATTCT 3'	200	75	AM051355.1
	R: 5' GCTGGGCTGTGGCAAGTAAT 3'	200		
ATG9	F: 5' TCACCACCGTCACACTCCT 3'	200	129	JQ035663.1
	R: 5' TGGTCAGGCATGTAGTGGATG 3'	200		
LC3-B	F: 5' CCGAGAGCAGCATCCTACCA 3'	300	87	AY570553.1
	R: 5' AAACCTTTGTTTTATCCAGGACAGGAA 3'	300		

PCR amplifications were performed in a 7500 Fast Real-Time PCR System (PE Applied Biosystems) using SYBR® Green (PE Applied Biosystems) assays. All qRT-PCR reactions were run in triplicate in a total reaction volume of 10 µl using cDNA equivalent to 10-20 ng of total RNA as template. Universal amplification conditions were used, with an initial activation and cDNA denaturation step for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 3 seconds (s) at 95°C and 30 s at 60°C. To identify the presence of nonspecific PCR amplicons or high levels of primer dimers, we performed a dissociation curve protocol after each qRT-PCR reaction. The levels of gene expression were determined using the comparative Ct method. The Ct calculations were set automatically with the ABI-Prism 7500 software, version 2.0.1.

Immunohistochemical determination of autophagy markers

The autophagy markers were detected by IHC. Before this, the specificity of antibodies against ATG5, LC3-B, LC3-A and p62 was prior determined by Western blot. At least 0.5 g of the CNS tissues (Fc, T, Cbl and Mo) was homogenized each in 5 ml of Prionics® Check Western homogenization buffer (Prionics AG, Zurich, Switzerland) and centrifuged twice at 10000 x g for 10 min at 4°C. The supernatants were analysed by

Western blot. Briefly, 25 µg of total protein was subjected to 10% SDS/PAGE and transferred to PVDF membranes (GE Healthcare, UK). After blocking at 4°C overnight, the membranes were incubated for 1 hour (h) at RT with following primary antibodies diluted in blocking buffer: mouse monoclonal anti APG5 (C-1, sc-133158; Santa Cruz Biotechnology, 1:1000); mouse monoclonal anti MAP-LC3β (G-2, sc-271625; Santa Cruz Biotechnology, 1:8000); rabbit polyclonal anti MAP-LC3α (R-23, sc-134226; Santa Cruz Biotechnology, 1:1000), and rabbit polyclonal anti p62 (PW9860; Enzo Life Sciences, 1:1000). 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 APG5 and MAP-LC3β, or goat anti-rabbit IgG-HRP for MAP-LC3α and p62; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). After washing, Western blots were developed using the ECL Plus Western Blotting system (GE Healthcare, UK) and visualized with VersaDoc imaging system (Bio-Rad).

The expression and distribution of ATG5, LC3s and p62 proteins were studied by IHC in formalin-fixed, paraffin-embedded CNS tissue sections from the clinical scrapie sheep and control animals. The tissues were pre-treated using heat-induced epitope retrieval with Tris EDTA buffer (pH 9.0) in a PTLINK (Dako) at 96°C for 20 min. Sections were incubated at 4°C overnight for APG5 and MAP-LC3α (both 1:50 dilution), and 1 h at RT for MAP-LC3β and p62 (both 1:200 dilution). Omission of the primary antibody served as background control for nonspecific staining. The visualization system used was the enzyme-conjugated polymer EnVision (Dako EnVision anti-mouse for APG5 and MAP-LC3β; Dako EnVision anti-rabbit for MAP-LC3α and p62).

Data analysis

The tissue sections were examined with a ZEISS Axioskop 40 optical microscope. The extent of intraneuronal vacuolation, neuropil spongiosis, PrP^{Sc} deposition, as well as ATG5, LC3s and p62 immunolabelling was evaluated semi-quantitatively and scored on a scale ranging from 0 to 5 (0 = absence of lesions or immunolabelling, 5 = substantial lesions or immunolabelling throughout the region). Histopathological and immunohistochemical differences between the experimental groups were evaluated using non-parametric Mann Whitney U test.

Relative gene expression values were log transformed and data were analysed with the Student's *t*-test. Moreover, correlations between gene expression, protein immunolabelling and the different lesions were determined using Pearson correlation and the non-parametric Spearman's rank correlation coefficient (ρ). In all tests, the results were considered significant at $P < 0.05$. We used IBM® SPSS® statistics 22 software for all data analysis. Finally, to identify possible differences in LC3-B, LC3-A and p62 immunolabelling in Purkinje cells, stained and non-stained Purkinje cells were counted in five microscope areas (20× magnification) for each animal. Proportions were converted to arcsine values before applying the Student's *t*-test.

RESULTS

Scrapie-associated neuropathology corresponds to the classical form of the disease

Prior to the analysis of the autophagic activity, the clinical diagnosis of selected sheep was confirmed and the distribution of prion related histopathological lesions was determined (Figures 1-2). Despite the fact that high variability was observed for all lesions within the scrapie group, statistically significant differences ($P < 0.05$) were detected between scrapie animals and the control group in most cases. The evaluation of HE-stained sections revealed a significant and strong increase of spongiosis and neuronal vacuolation in T, P and Mo of the infected animals compared with controls (Figure 2A and 2C). PrP^{Sc} immunolabelling confirmed the diagnosis of scrapie in sheep that presented neurological symptoms. Intraneuronal and neuropil PrP^{Sc} deposition was detected only in the affected animals (Figure 1D-1F). PrP^{Sc} immunolabelling was significantly strong in T, P and Mo, moderate in Cbl and Fc, and weak in Bg, Bgc and Tc (Figure 2E). In Mo, the NVN displayed the highest scores for PrP^{Sc} deposition and for the other studied lesions (Figure 2B, 2D and 2F). As expected, scrapie-related lesions positively correlated with each other (Table 3). The observed lesion pattern corresponds to the one described for the classical form of scrapie (Wood *et al.*, 1997).

Table 3: Spearman correlation values between scrapie-related histopathological lesions: PrP^{Sc} deposition, spongiosis and intraneuronal vacuolation (*) $P < 0.001$**

Scrapie lesions	PrP ^{Sc} deposition	Spongiosis
Spongiosis	0.830***	---
Intraneuronal vacuolation	0.818***	0.817***

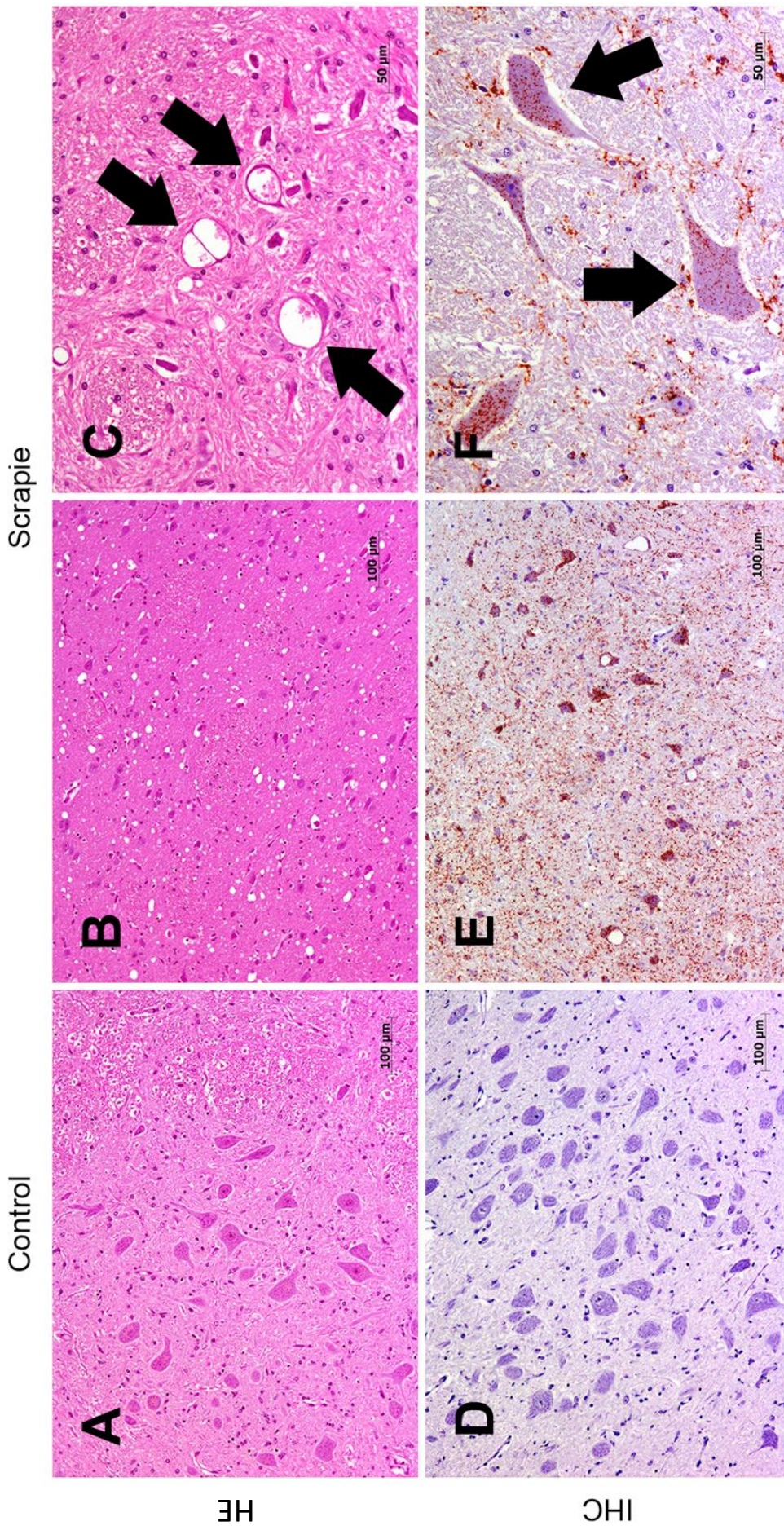


Figure 1: Histopathological (A-C) and immunohistochemical (D-F) features from different regions of animals studied. (A and F) Pons. (B) Thalamus. (C) Nucleus of the trigeminal nerve spinal tract. (D and E) Dorsal nucleus of the vagus nerve. Detection of neuropil spongiosis and intraneuronal vacuolation was as follows: (A) control group showed integrity of neuropil and neuronal perikaryon (HE) (100 µm); (B) vacuoles in neuropil (HE) (100 µm) and (C) neuronal perikaryon (arrows) (50 µm) in scrapie-infected sheep. Detection of PrP^{Sc} was as follows: (D) controls displayed no deposition (IHC) (100 µm); infected animal tissues showed (E) a multigranular staining in the neuropil (IHC) (100 µm) and (F) neuronal perikaryon (arrows) (IHC) (50 µm).

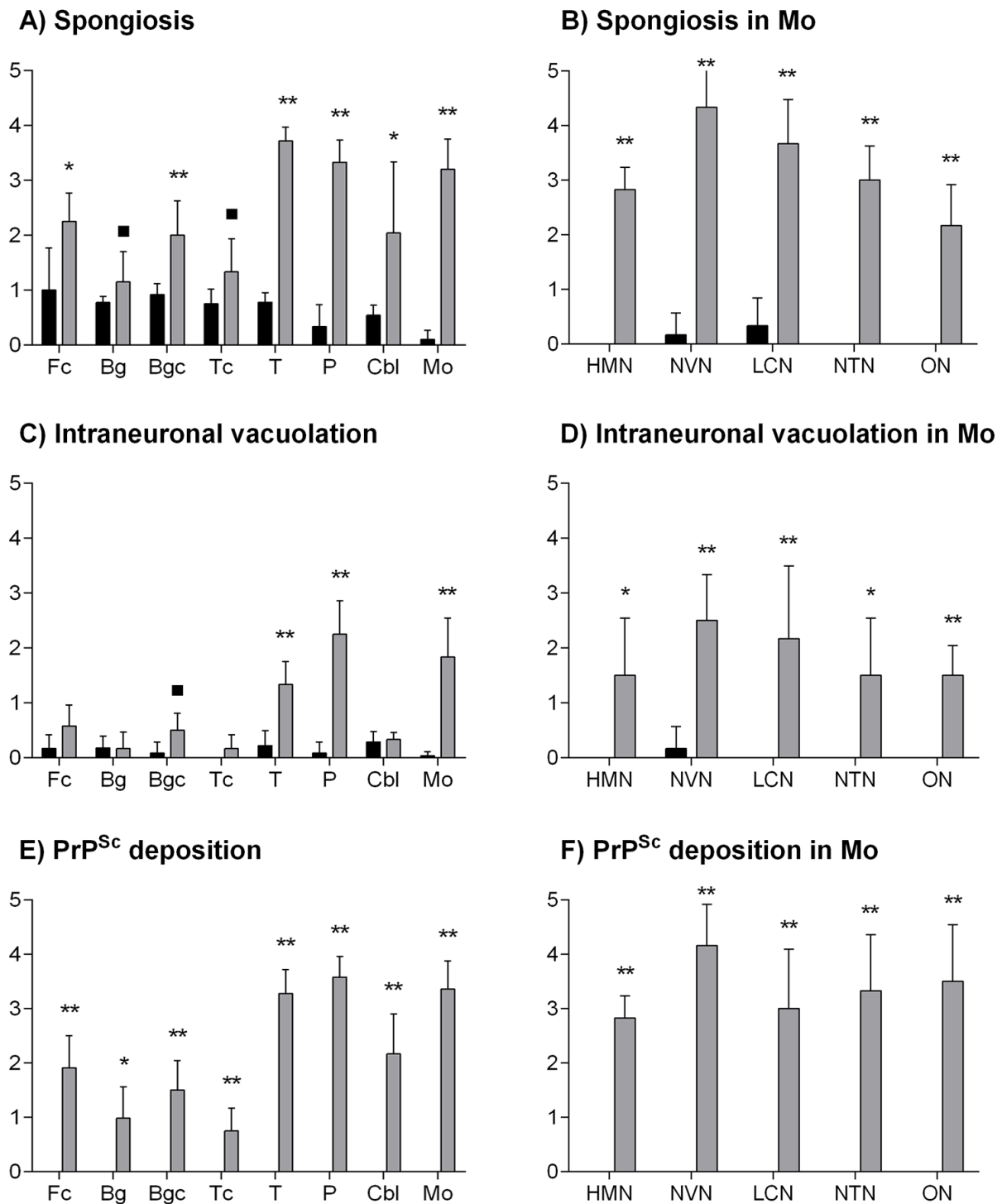


Figure 2: Semi-quantitative assessment values of spongiosis (A-B), intraneuronal vacuolation (C-D) and PrP^{Sc} deposition (E-F). Graphics show the average score of these lesions in frontal cortex (Fc), basal ganglia (Bg), basal ganglia cortex (Bgc), thalamic cortex (Tc), thalamus (T), pons (P), cerebellum (Cbl) and five neuronal nuclei of the medulla oblongata (Mo) [the hypoglossal motor nucleus (HMN), the dorsal nucleus of the vagus nerve (NVN), the lateral cuneate nucleus (LCN), the nucleus of the trigeminal nerve spinal tract (NTN), and the olivary nucleus (ON)] of control (black bars) and scrapie-infected sheep (grey bars). Scores range from 0 (negative) to 5 (lesion/staining present at maximum intensity). Significant differences were determined using the Mann Whitney U test (■P=0.05, *P<0.05 and **P<0.01).

mRNA expression of some autophagy markers is downregulated in scrapie brains

To investigate the regulation of the autophagy process in scrapie animals, expression of four genes (*ATG5*, *BECN1*, *ATG9* and *LC3-B*) involved in distinct steps of autophagy were quantified in Fc, T, Cbl and Mo of scrapie-infected sheep and healthy animals by qRT-PCR. As shown in Figure 3, gene expression profiles were different in each analysed area and generally few alterations were found. However, a significant downregulation was observed for *ATG5* ($P < 0.05$) in T and *ATG9* ($P < 0.01$) in Cbl of scrapie-infected animals.

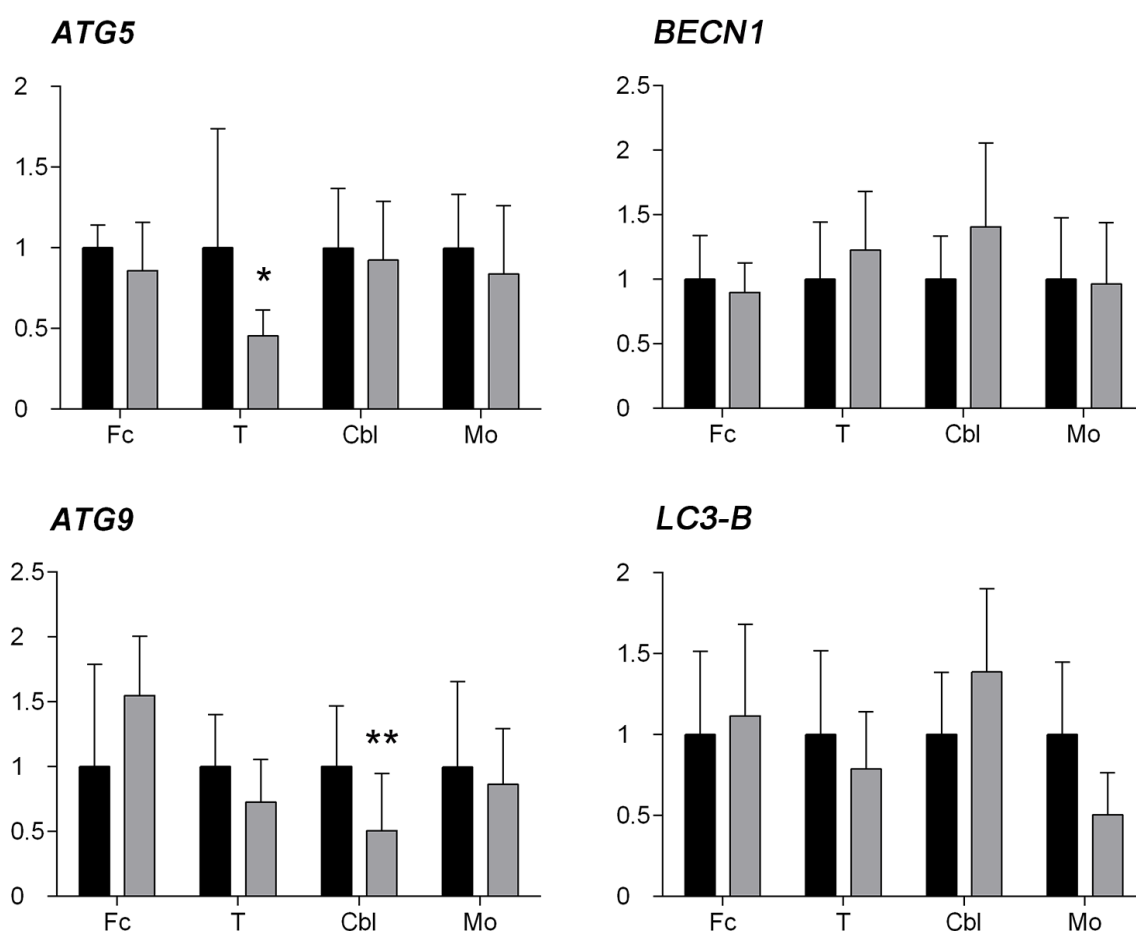


Figure 3: mRNA expression profiles of the *ATG5*, *BECN1*, *ATG9* and *LC3-B* autophagy-related genes. Relative expression levels in control (black bars) and scrapie-infected sheep (grey bars) in the frontal cortex (Fc), thalamus (T), cerebellum (Cbl) and medulla oblongata (Mo) are expressed as mean \pm standard deviation. Results were normalized using the geometric mean of the expression of three housekeeping genes (*GAPDH*, *G6PDH* and *RPL32*). The expression values were log transformed to analyse the differences between the two experimental groups using the Student's *t*-test (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$).

Expression levels of *ATG5* and *LC3-B* are positively correlated, but negatively correlated with prion deposition

To detect if the gene expression of autophagy markers was regulated in a coordinate manner, we calculated Pearson correlations between transcript levels using data from the four tissues analysed in the whole set of experimental animals. Expression of *ATG5* was positively correlated with the expression levels of *LC3-B* (Pearson $r=0.451$, $P<0.01$). This correlation was maintained (Pearson $r=0.454$, $P<0.05$) when analysing only scrapie animals. Although *LC3-B* mRNA levels were not significantly altered in any of the analysed areas, the observed correlation suggests that the two genes may be regulated in response to common stimuli. There was no significant correlation between the other two genes studied (data not shown).

To distinguish any relationship between the degree of lesion and the level of transcripts for autophagy markers, non-parametric Spearman's rank correlation coefficients were calculated between expression levels and the scores for PrP^{Sc} deposition, neuronal vacuolation and neuropil spongiosis in the four analysed areas using the total set of data. *ATG5* displayed a weak but statistically significant negative correlation with all three lesions (Table 4). The amount of transcripts from the other three genes did not correlate with any histopathological features. To test if the association observed between *ATG5* and scrapie lesions was due to a general downregulation of this gene in scrapie animals relative to healthy controls, we re-analysed the data only within scrapie animals. In this case, the negative correlations observed between *ATG5* expression and scrapie lesions were stronger (Table 4) suggesting that the association was dependent on the degree of the lesion itself. In scrapie animals, also *LC3-B* expression levels displayed a negative correlation with PrP^{Sc} deposition and the levels of *BECN1* messengers positively correlated with neuronal vacuolation. Except for the negative correlation observed between *ATG5* and prion deposition in T, correlation analysis between gene expression and the histopathological features in individual CNS areas were mostly related with gene expression changes observed between scrapie and control animals (Table 5) and significance was lost when scrapie sheep only were analysed. These results further support the association between the increased prion deposition and downregulation of autophagy related marker *ATG5* in mRNA level.

Table 4: Spearman correlation values between autophagy gene expression levels and histological features (spongiosis, intraneuronal vacuolation and PrP^{Sc} deposition) in the total set of animals and in scrapie infected sheep. Correlations were estimated using data from the four analysed tissues (frontal cortex, thalamus, cerebellum and medulla oblongata). No statistically significant correlation values are shown as N.S. (*P<0.05)

Gene	Total set of animals			Scrapie sheep		
	Spongiosis	Intraneuronal vacuolation	PrP ^{Sc}	Spongiosis	Intraneuronal vacuolation	PrP ^{Sc}
<i>ATG5</i>	-0.305*	-0.337*	-0.321*	-0.512*	-0.457*	-0.415*
<i>BECN1</i>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.481*	N.S.
<i>ATG9</i>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
<i>LC3-B</i>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-0.547*

Table 5: Spearman correlation values between gene expression levels and histological features in specific CNS areas (frontal cortex, thalamus, cerebellum and medulla oblongata). Correlations were estimated using data from each analysed tissue independently and from the total set of animals and in scrapie infected sheep. No statistically significant correlation values are shown as N.S. (°P=0.05, *P<0.05 and **P<0.01)

Gene		Total set of animals			Scrapie sheep		
		Spongiosis	Intraneuronal vacuolation	PrP ^{Sc}	Spongiosis	Intraneuronal vacuolation	PrP ^{Sc}
<i>ATG5</i>	Mo	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
	T	-0.561°	-0.693*	-0.739**	N.S.	N.S.	-0.833*
	Fc	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
	Cbl	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
<i>BECN1</i>	Mo	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
	T	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-0.833*
	Fc	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
	Cbl	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
<i>ATG9</i>	Mo	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
	T	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
	Fc	N.S.	N.S.	0.607*	N.S.	N.S.	N.S.
	Cbl	-0.719*	N.S.	-0.807**	N.S.	N.S.	N.S.
<i>LC3-B</i>	Mo	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
	T	-0.583*	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
	Fc	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
	Cbl	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Accumulation of ATG5 protein in highly affected areas of the CNS of scrapie sheep

To evaluate if the transcript-level alterations were also observed in ATG5 protein levels, distribution of this marker was determined by IHC in Fc, Bg, Bgc, Tc, T, P, Cbl and Mo in scrapie and control sheep. A distinctive band of ~32 kDa confirmed the specificity of the antibody used in Western blot analysis (Figure 4). In contrast to the transcript levels, ATG5 protein was significantly increased in the Mo of scrapie infected animals ($P=0.029$), and specifically in the NTN ($P=0.028$) (Figure 5A-B). Accordingly, ATG5 mRNA and protein expression displayed a significant negative correlation (Spearman $\rho=-0.420$, $P=0.003$). ATG5 immunostaining presented an intracytoplasmic and a punctiform pattern in the neuropil in several regions, such as the T, Cbl, P and Mo (Figure 6). In these areas, ATG5 protein was occasionally stained as a diffuse spot throughout the neuropil, and in granules within the cytoplasm of some neurons. These granules usually displayed a perineuronal arrangement.

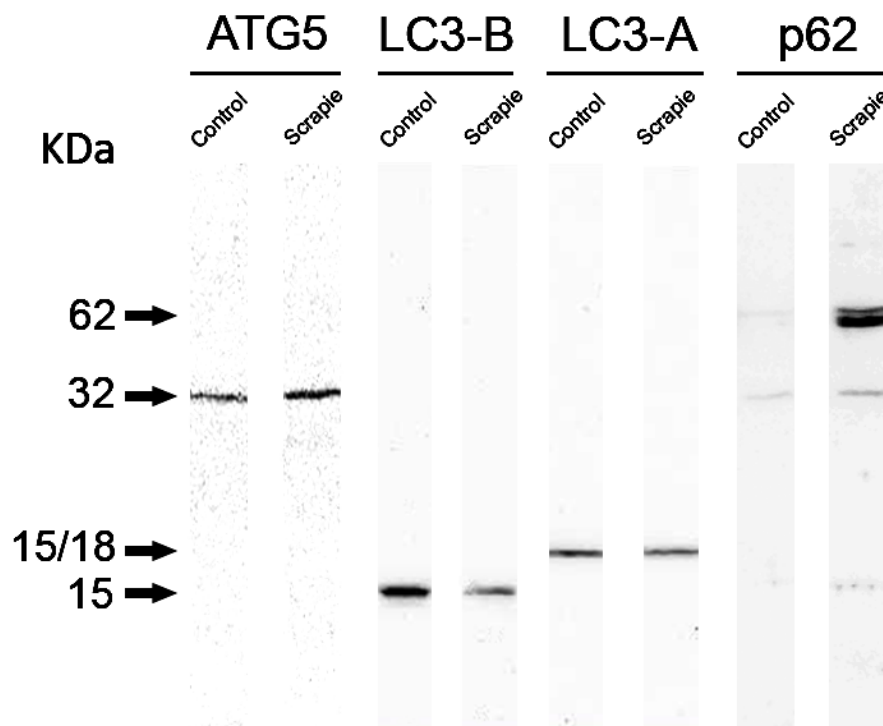


Figure 4: Specificity of antibodies. Membranes showing the specificity of antibodies against ATG5, LC3-B, LC3-A and p62 proteins in ovine thalamus detected by Western blot. Each protein was cropped and grouped from different parts of the same gel. Distinctive bands of ~32 kDa, ~15 kDa, ~15/18 kDa and ~62 kDa confirmed the specificity of the antibody used against ATG5, LC3-B, LC3-A and p62, respectively.

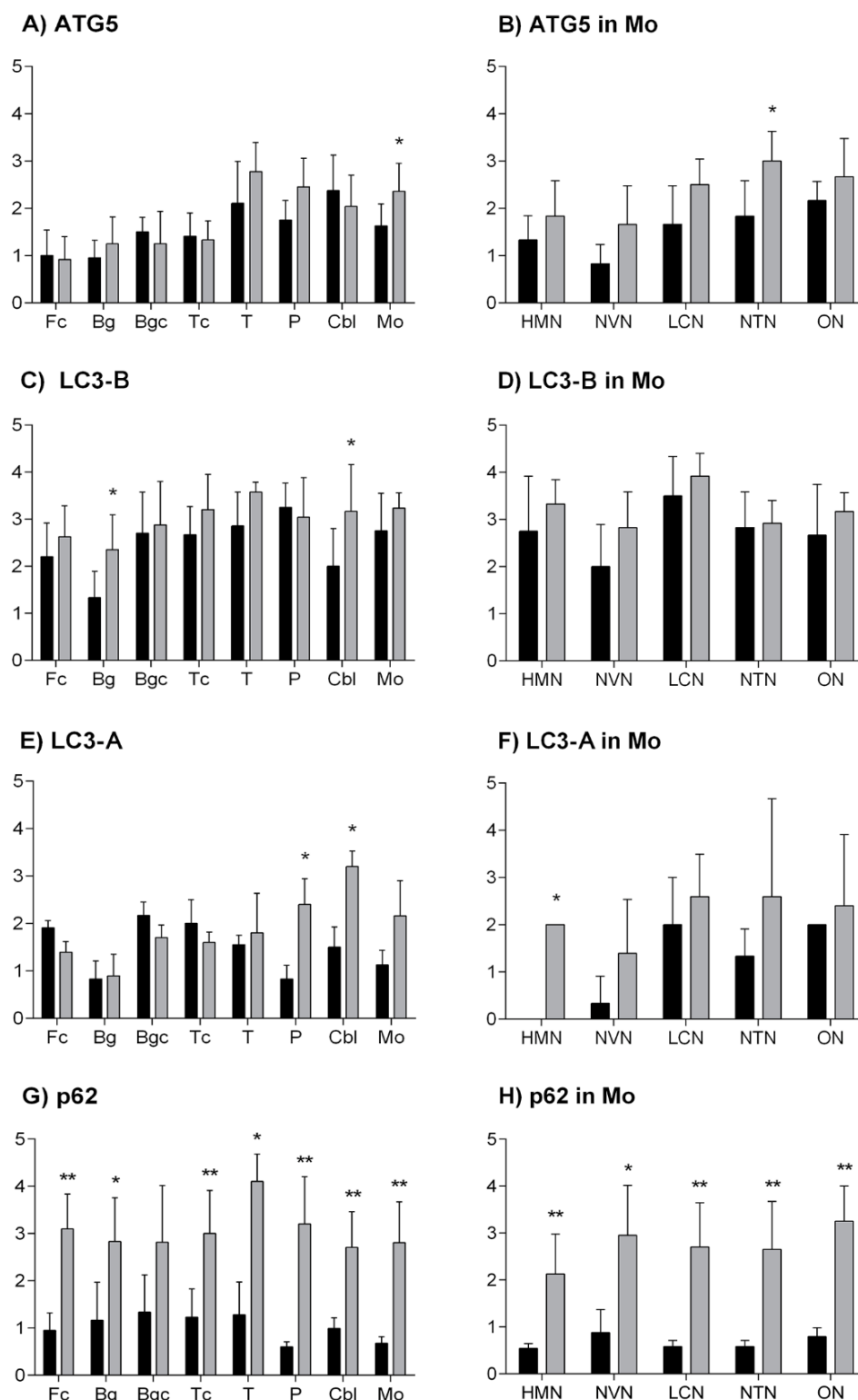


Figure 5: Semi-quantitative scoring of immunohistochemistry for autophagy-related proteins. Score values of ATG5 (A-B), LC3-B (C-D), LC3-A (E-F) and p62 (G-H) (from 0: negative, to 5: staining present at its maximum intensity) evaluated in frontal cortex (Fc), basal ganglia (Bg), basal ganglia cortex (Bgc), thalamic cortex (Tc), thalamus (T), pons (P), cerebellum (Cbl) and five neuronal nuclei of the medulla oblongata (Mo): the hypoglossal motor nucleus (HMN), the dorsal nucleus of the vagus nerve (NVN), the lateral cuneate nucleus (LCN), the nucleus of the trigeminal nerve spinal tract (NTN), and the olivary nucleus (ON). Black bars: control sheep, grey bars: scrapie-infected sheep. The differences between the two experimental groups were determined using the Mann Whitney U test (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$).

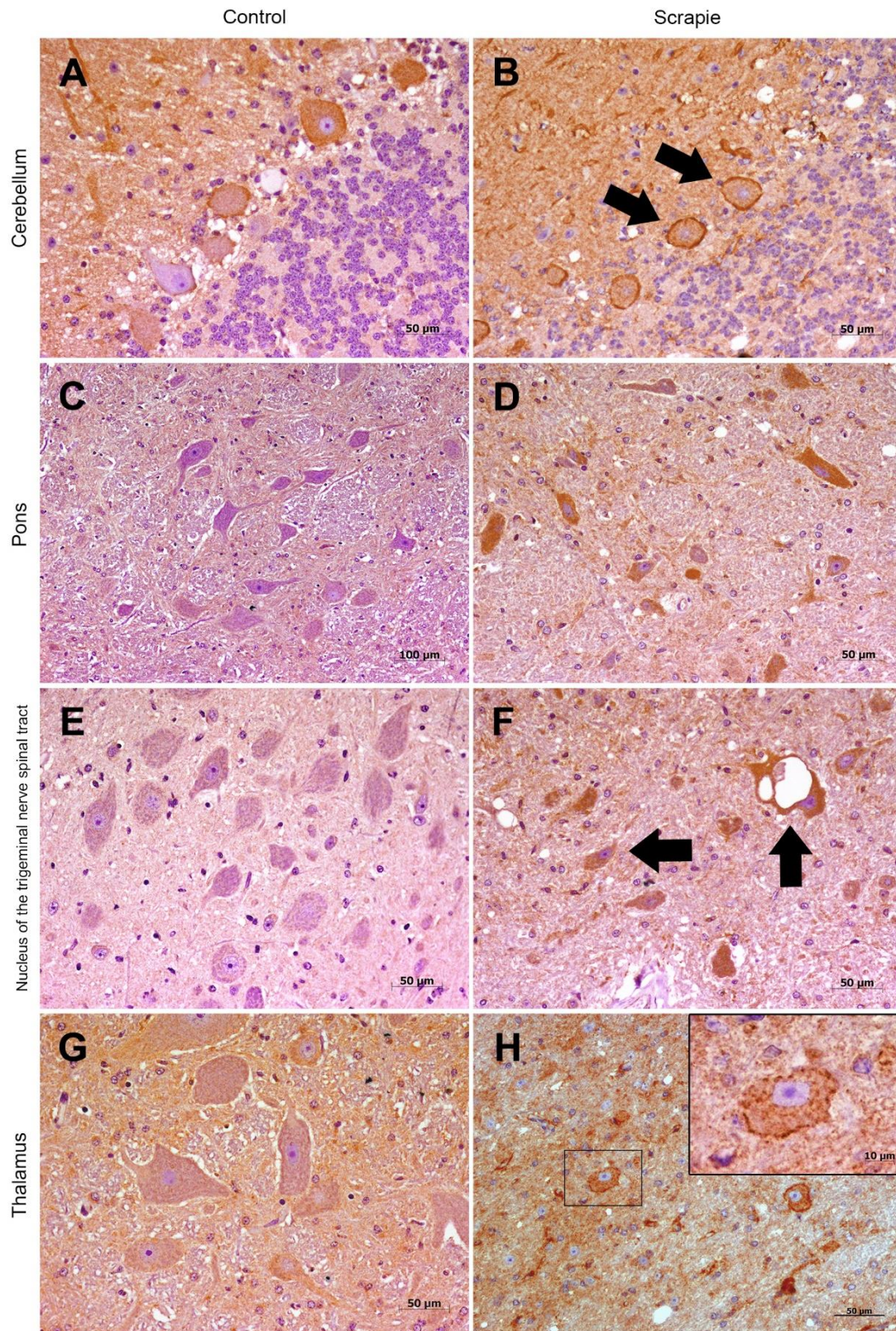


Figure 6: Immunostaining patterns of ATG5 protein in different CNS regions. (A) Strong immunostaining in cerebellum from control animals (50 μ m). (B) Similar immunostaining in cerebellum from scrapie sheep, note the perineuronal arrangement around Purkinje cells (arrows). No differences were observed between groups (50 μ m). (C) Lack of intraneuronal staining in pons from control sheep (100 μ m). (D) Intracytoplasmic immunolabelling of several neurons in pons of scrapie animals. Due to a high variability observed within these animals, this tissue did not show significant differences (50 μ m). (E) Absence of immunostaining in the nucleus of the trigeminal nerve spinal tract (NTN) from control group (50 μ m). (F) Diffuse punctiform immunostaining throughout the neuropil and intracytoplasmic immunolabelling of vacuolized and non-vacuolized neurons (arrows) in the NTN in scrapie sheep (50 μ m) (Legend continues on next page).

(Continued from previous page). In thalamus, moderate or weak staining was observed from both control (**G**) (50 μm) and scrapie sheep (**H**) (50 μm) with no significant differences between groups. Detail of a neuron (**H**) (10 μm): ATG5 was occasionally localized in granules within the cytoplasm of some neurons, which displayed a perineuronal arrangement.

LC3-B is highly expressed in areas with mild scrapie related lesions

IHC allows the determination of small changes that could go unnoticed in gene expression analysis where mRNAs come from the different cells present in a tissue. Then, although gene expression of *LC3-B* was not modified in scrapie tissues, we next analysed the protein distribution of LC3-B by IHC. Specificity of the antibody used was tested by Western blot that revealed a single ~15 kDa band (Figure 4). The semi-quantitative analysis of LC3-B showed statistically significant increase in Bg ($P=0.02$) and in Cbl ($P=0.04$) of scrapie-infected animals (Figure 5C-D). There were no significant alterations in the other tissues under study. As opposed to ATG5, LC3-B levels were not modified in the neuronal nuclei of the Mo of scrapie-infected animals and LC3-B protein levels did not correlate with those of its transcript (data not shown). Generally, LC3-B immunostaining consisted of a mild diffuse and punctiform neuropil staining (Figure 7). In addition, neuronal cytoplasm and nuclei were generally stained positively. Even neurons with unstained cytoplasm often displayed nuclear positive immunolabelling.

LC3-A is upregulated in specific neuronal populations of scrapie CNS

Although LC3-A was not analysed at the transcript level, we studied the distribution of this protein to analyse if different LC3s proteins react similarly in response to scrapie. As with the other markers, the specificity of antibody was confirmed by Western blot, displaying a band of ~15/18 kDa (Figure 4). In this case, LC3-A protein staining was more intense in P ($P=0.03$), Cbl ($P=0.032$) and HMN (expressed only in scrapie animals and not in controls) of scrapie animals (Figure 5E-F). These differences were mainly due to an increase in the immunostaining of specific neural populations. Whereas LC3-A staining was mainly observed in the neuropil in control animals, intense neuronal immunolabelling was detected in P, Cbl and the HMN of scrapie sheep (Figure 8). In these areas, both neurons and glial cells showing a strong intracytoplasmic immunolabelling and a diffuse punctiform immunostaining throughout the neuropil was observed. There were no significant differences in the remaining tissues between control and scrapie-infected animals.

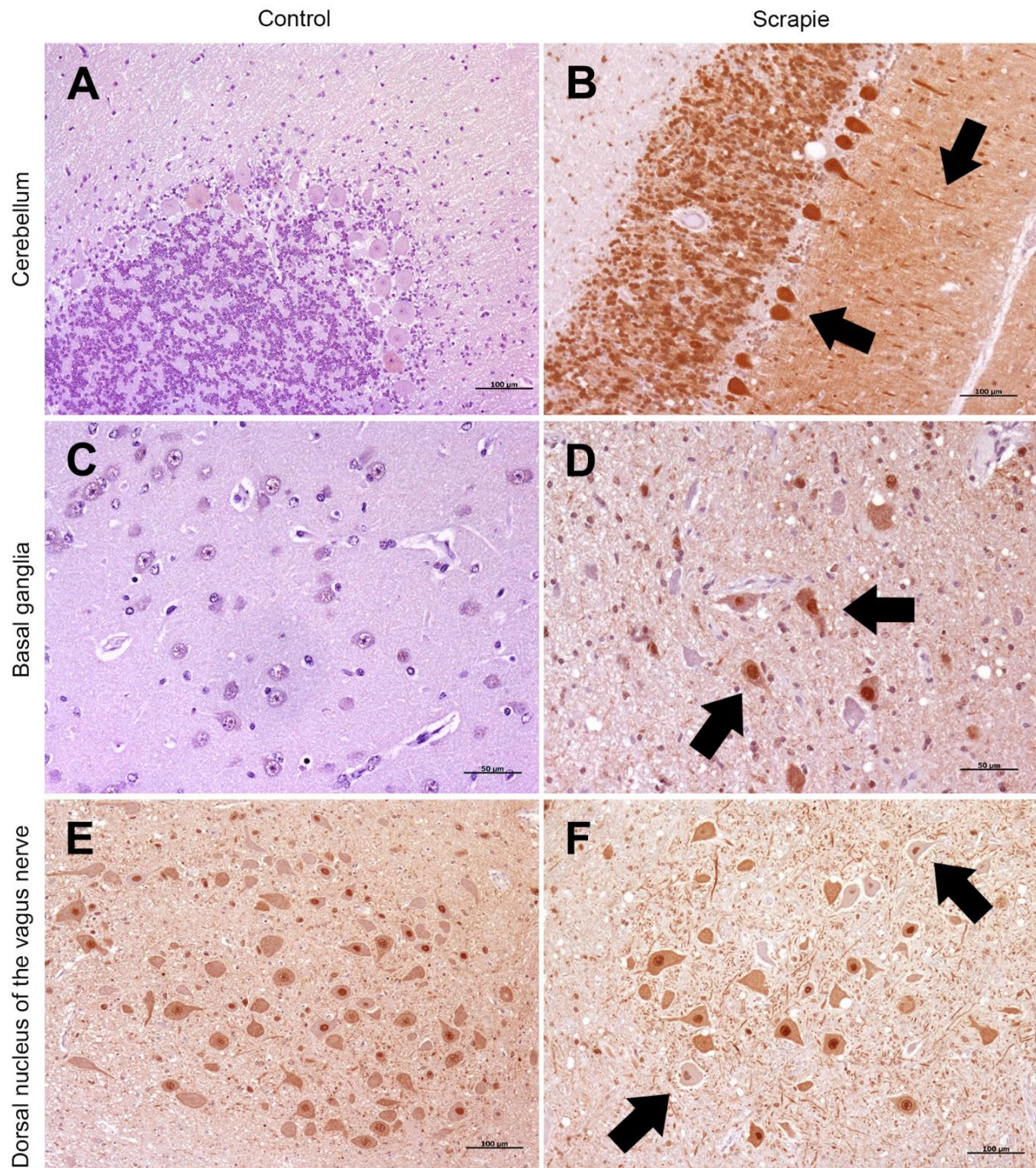


Figure 7: Immunostaining patterns of LC3-B protein in different CNS regions. (A) Weak immunostaining in the cerebellum of a non-infected control animal (100 µm). (B) Intense immunostaining in the cerebellum of a scrapie-infected sheep. In the cerebellar cortex, the Purkinje cells were strongly stained and their neurites were observed with intense immunolabelling (arrows) (100 µm). (C) Absent immunostaining in the basal ganglia from control group (50 µm). (D) Moderate immunostaining in the basal ganglia from scrapie animals. Unstained neurons were also observed. Note the nucleus was strongly stained (arrows) (50 µm). (E) Strong staining in the Dorsal nucleus of the vagus nerve (NVN) from control group (100 µm). (F) Similar immunostaining in the NVN from scrapie-infected sheep. The nucleus was also positive in neurons with unstained cytoplasm (arrows) (100 µm).

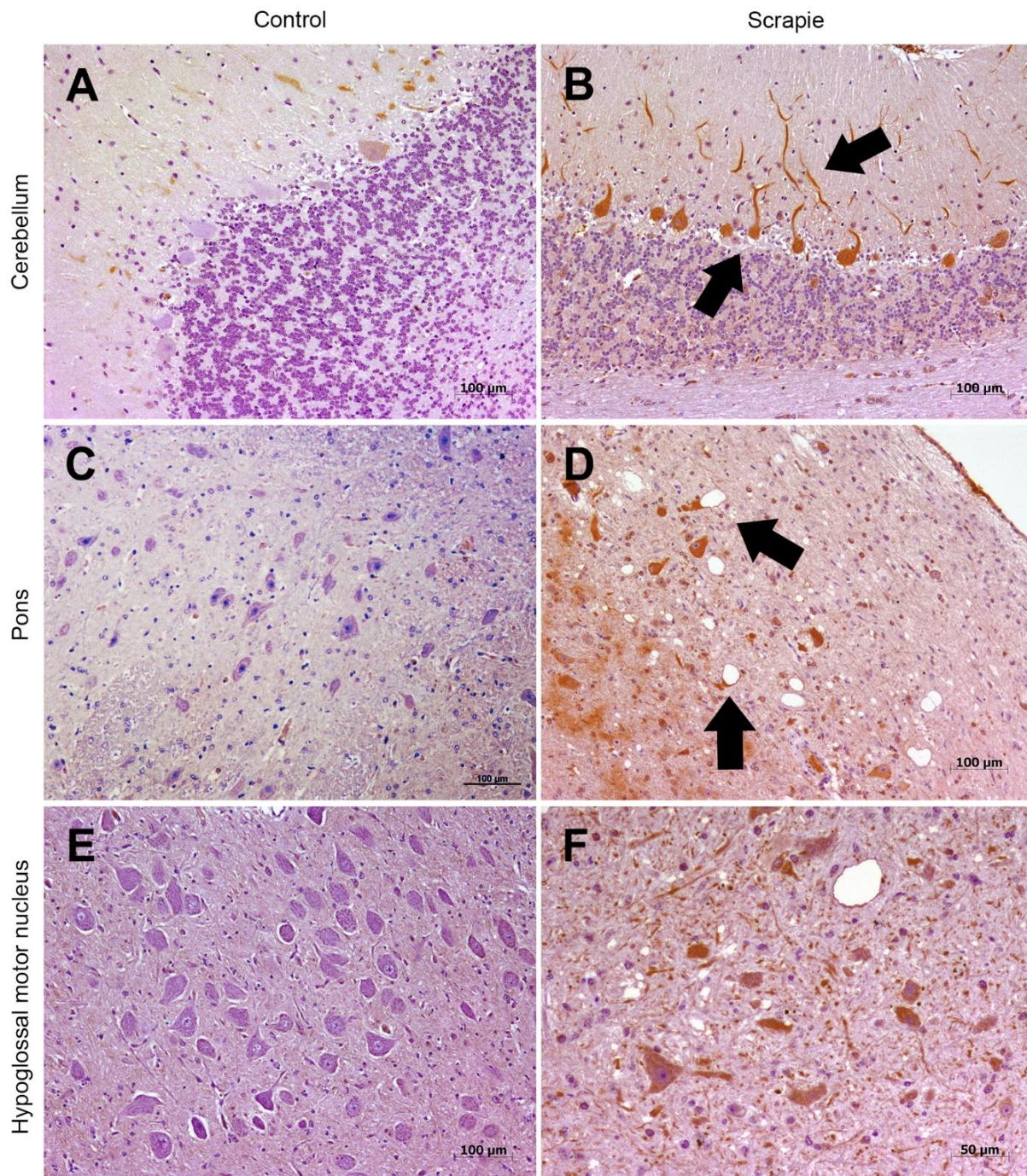


Figure 8: Immunostaining patterns of LC3-A protein in different CNS regions. (A) Moderate or weak immunostaining in the cerebellum from control animals (100 μm). (B) Intense immunostaining in the cerebellum from scrapie-infected sheep. In the molecular layer of the cerebellar cortex, a strong signal was observed in the Purkinje cells and their neurites (arrows) (100 μm). (C) Absent immunostaining in the pons from control group (100 μm). (D) In the pons of scrapie animals, some specific neural populations were strongly immunolabelled. Spotted and punctiform pattern was observed in the neuropil. Note the cytoplasmic immunostaining in vacuolized and non-vacuolized neurons (arrows) (100 μm). (E) Absent immunostaining in the hypoglossal motor nucleus (HMN) from control group (100 μm). (F) Diffuse punctiform immunostaining throughout the neuropil and intracytoplasmic immunolabelling of several neurons in the HMN in infected sheep (50 μm).

Generalized p62 accumulation in scrapie brains

Accumulation of p62 is commonly used to monitor autophagy impairment (Bjorkoy *et al.*, 2009). To investigate a possible arrest of autophagy in scrapie, we determined p62 by IHC. First, Western blot detected an expected band of ~62 kDa (Figure 4). Immunolabelling for p62 was remarkably intense in scrapie-infected animals, whereas little staining was detected in the control group. Scrapie sheep displayed significantly higher scores for p62 protein in all CNS areas analysed, although in Bgc this did not reach significance (Figure 5G). Moreover, all Mo nuclei showed significant increases of this protein in the scrapie group (Figure 5H). Staining for p62 (Figure 9) presented a strong and coarse granular pattern within the cytoplasm of cells, and occasionally in the neuropil, in Fc, Bg, Bgc and Tc. In the remaining tissues, p62 was characterised by a moderate punctiform pattern in the neuropil in healthy sheep, and by an intense granular immunolabelling of the neuropil and a uniform intracytoplasmic staining of both neurons and glial cells in scrapie animals.

ATG5 and LC3 distribution is associated with histological features of scrapie, and p62 with spongiform degeneration

Protein scores for ATG5, LC3-A and LC3-B displayed positive Spearman correlations (Table 6), confirming the association detected between *ATG5* and *LC3-B* gene expression data (see above). However, in contrast to the RNA expression, LC3 proteins positively correlated with prion deposition and neuropil spongiosis both in the total set of animals and in the scrapie group (Table 6), suggesting that these proteins accumulate as the lesions related to the disease become more evident. Besides that, p62 and LC3-B immunostaining correlated in the total set of animals (Spearman $\rho=0.440$, $P<0.001$) and the association was even stronger in scrapie sheep (Spearman $\rho=0.632$, $P<0.001$) (Table 6). As the intensity of immunostaining was not the same in the different tissues, this correlation suggests that the areas where p62 accumulates in a higher degree are the same as those where LC3-B is also strongly concentrated. Finally, p62 did not correlate with PrP^{Sc} deposition or neuronal vacuolation but displayed a relatively strong correlation with neuropil spongiosis in all animals (Spearman $\rho=0.756$, $P<0.001$) and weaker correlation within scrapie animals (Spearman $\rho=0.344$, $P<0.05$).

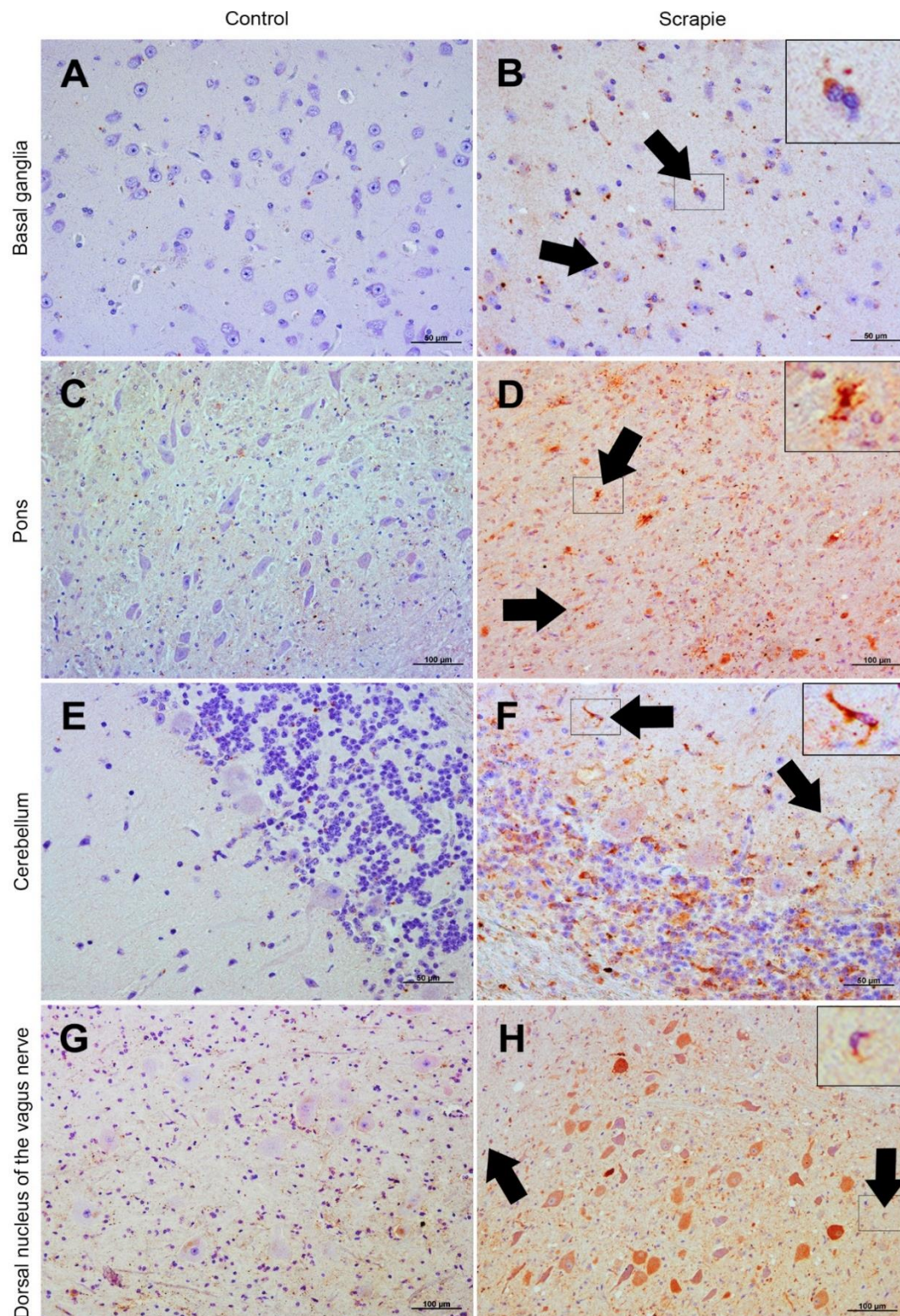


Figure 9: Immunostaining patterns of p62 protein in different CNS regions. (A) Weak granular pattern in the neuropil of basal ganglia of a non-infected control animal (50 μm). (B) Strong and coarse granular immunostaining in the neuropil and within the cytoplasm of cells in basal ganglia of a scrapie-infected sheep (50 μm). (C) Predominantly mild neuropil punctiform pattern in pons from control group sheep brain (100 μm). (D) Intense granular immunolabelling of the neuropil and intracytoplasmic staining of both neurons and glial cells in pons in scrapie-infected sheep (100 μm). (E) Weak punctiform staining in cerebellum in healthy sheep (50 μm). (F) Strong granular pattern and uniform intracytoplasmic staining of cells in cerebellum in scrapie-infected sheep (50 μm) (Legend continues on next page).

(Continued from previous page). (G) Moderate punctiform immunostaining of the neuropil in the dorsal nucleus of the vagus nerve (NVN) from control group (100 μ m). (H) Intense staining of the neuropil and cells in the NVN in scrapie animals (100 μ m). (B, D, F and H) An intense immunolabelling of cells whose morphology is compatible with glial cells (arrows and detail) was observed in scrapie-infected sheep.

Table 6: Spearman correlation values between histological features (spongiosis, intraneuronal vacuolation and PrP^{Sc}, ATG5, LC3-A, LC3-B and p62 immunostaining) in the total set of animals and in scrapie infected animals. Correlations were estimated using the full set of data obtained in all tissues. No statistically significant correlation values are shown as N.S. (*P<0.05, **P<0.01; *P<0.001)**

Autophagy markers	Spongiosis	Intraneuronal vacuolation	PrP ^{Sc}	ATG5	LC3-A	LC3-B	
ATG5	0.271**	0.446***	0.287**	-----	0.375**	0.422***	All animals
LC3-A	0.397*	0.315*	0.373**	0.375**	-----	0.330**	
LC3-B	0.332***	N.S.	0.389***	0.422***	0.330**	-----	
p62	0.756***	0.478***	0.780***	N.S.	N.S.	0.440***	
ATG5	0.651***	0.571***	0.577***	-----	0.487**	0.365*	Scrapie sheep
LC3-A	0.397*	N.S.	0.409**	0.487**	-----	0.381*	
LC3-B	0.429**	N.S.	0.332*	0.365*	0.381*	-----	
p62	0.344*	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.632***	

Autophagy markers in cerebellar Purkinje cells

Three out of the four autophagy markers analysed by IHC displayed a significantly higher scores in scrapie cerebella and this increment seemed to be mainly due to the differences observed in immunostaining of Purkinje cells. To verify these observations quantitatively, we determined the number of stained and unstained cells in 5 independent fields for each animal. For LC3-B (Figure 7) and LC3-A (Figure 8), the Purkinje cells were strongly stained, and their neurites were occasionally observed with intense cytoplasmic immunolabelling. Although the percentage of stained Purkinje cells for LC3-B appeared to be higher in scrapie animals (82.0% \pm 13.1) compared to controls (65.1 \pm 30.5), these differences were not statistically significant. However, LC3-A was statistically increased in scrapie sheep where 94.7% \pm 14.6% of the cells were positive for LC3-A compared with 68.8 \pm 31.2% in controls (P<0.01). Finally, Purkinje cells showed a moderate intraneuronal punctiform staining for p62 (Figure 9) and the number of stained cells was greatly increased (P<0.001) in scrapie animals (88.5 \pm 20.3%) compared with controls (21.2 \pm 14.5%). The graph of these results is shown in Figure 10.

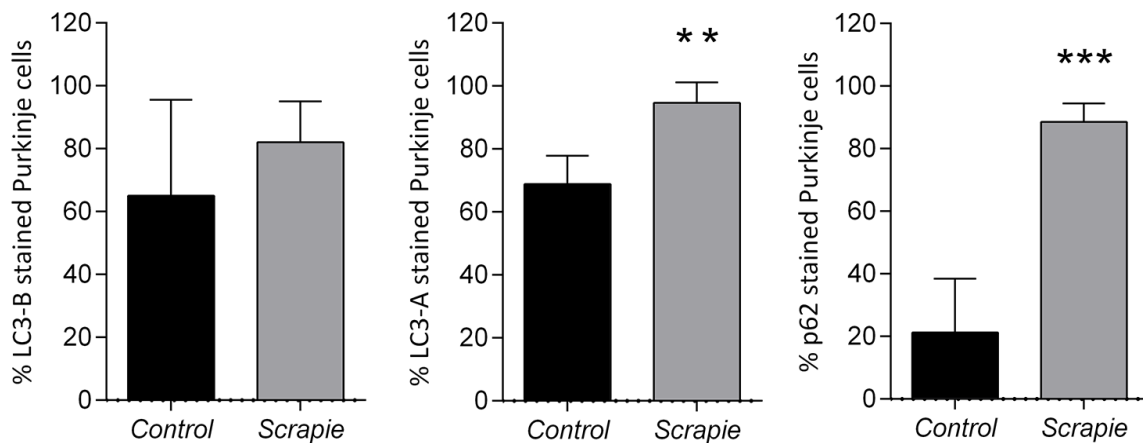


Figure 10: Percentage of LC3-B, LC3-A and p62 positively stained Purkinje cells. For LC3-B, no significant differences were observed between the control and scrapie-infected sheep. The increment was statistically significant for LC3-A ($P < 0.01$) and for p62 ($P < 0.001$).

DISCUSSION

Prion diseases are a group of neurodegenerative disorders characterized by accumulation of a proteinase resistant form of the prion protein (PrP^{Sc}) in the CNS, which leads to spongiform degeneration and ultimate neuronal death. This process may involve several cellular pathways, including apoptosis and autophagy (Liberski *et al.*, 2004). In previous studies assessing the molecular mechanisms of apoptosis in the CNS of sheep naturally infected with scrapie (Lyahyai *et al.*, 2006; Lyahyai *et al.*, 2007), the induction of apoptotic pathways in scrapie brains was described (Serrano *et al.*, 2009). However, there was no convincing evidence of a massive neuronal apoptosis, suggesting a possible activation of neuroprotective mechanisms. The aim of the present work was to analyse alterations in one of these mechanisms, autophagy, in scrapie-related neurodegeneration.

Basal levels of autophagy are important to maintain normal cellular homeostasis. However, unregulated degradation of the cytoplasmic components is likely to be deleterious. Although the CNS presents only low levels of autophagosomes under normal conditions, autophagy plays a critical role in the constitutive turnover of cytosolic contents and the removal of damaged proteins in specific neurons of the brain (Heiseke *et al.*, 2010). Defects in autophagy could impair the quality control of proteins, leading to the accumulation of toxic aggregates and subsequently, to neurodegeneration. In accordance, the presence of abnormal autophagic activity is frequently observed in neurodegenerative diseases such as AD, PD, HD and amyotrophic lateral sclerosis

(Anglade *et al.*, 1997; Heiseke *et al.*, 2010). Despite the increase in autophagosomes detected in degenerating neurons (Anglade *et al.*, 1997; Heiseke *et al.*, 2010), it is still not clear how the autophagic machinery is involved during the pathogenic course of these diseases.

Autophagic vacuoles associated with prion diseases have been described in experimental models such as mice and hamsters infected with prions (Boellaard *et al.*, 1989; Boellaard *et al.*, 1991; Liberski *et al.*, 2017). These vacuoles and multi-vesicular bodies also appear in prion-infected cultured neuronal cells (Schatzl *et al.*, 1997) and in brain biopsy materials of prion-infected patients (Liberski *et al.*, 2004; Sikorska *et al.*, 2004). Combining two different methodologies, qRT-PCR and IHC, we have investigated the dynamics of autophagy in scrapie-induced neuropathology through its relationship with scrapie lesions.

We carried out a first gene expression analysis of *ATG5*, *BECN1*, *ATG9* and *LC3-B* in naturally scrapie-infected sheep brains. *ATG5* and *ATG9* participate in the elongation (Mizushima *et al.*, 2001) and closing (Ferraro & Cecconi, 2007) of the pre-autophagosomal membrane, respectively, although neither of these proteins will be present in mature autophagosomes. *BECN1*, on the other hand, plays a central role in coordinating the cytoprotective function of autophagy, and regulates apoptosis and other cellular processes (Cao & Klionsky, 2007). Four different genes encode LC3s proteins (Rogov *et al.*, 2014), of which LC3-B protein has been most widely used for tracking autophagy. LC3 proteins are expressed in most cell types as the cytosolic protein form LC3-I that, upon induction of autophagy, is conjugated to phosphatidylethanolamine to form LC3-II, a lipidated form associated with autophagic membranes (Kirisako *et al.*, 1999). Because LC3-II is a structural component of mature autophagosomes, this protein is commonly used as a specific marker for autophagy (Mizushima & Yoshimori, 2007). Finally, p62/SQSTM1 is a cargo receptor that acts as a substrate during autophagic degradation, which causes this protein to be degraded by autophagosomes (Myeku & Figueiredo-Pereira, 2011). Therefore, the evaluation of p62 accumulation may be used to estimate autophagic impairment (Bjorkoy *et al.*, 2009).

Downregulation of autophagy genes *beclin-1* and *Atg5* was previously described in whole brain tissues of prion-infected wild-type mice (Mok *et al.*, 2007). Here, transcript

expression levels of genes *ATG5* and *ATG9* decreased significantly in thalamus and cerebellum, respectively, of scrapie-infected sheep, and *BECN1* expression displayed a negative correlation with prion deposition in scrapie thalamus. Since autophagy is involved in the turnover of proteins through lysosomal degradation, this process seems to be protective in various neurodegenerative processes, including prion diseases (Kroemer & Levine, 2008; Heiseke *et al.*, 2010). In this context, the downregulation of autophagy genes upon prion infection would suggest autophagy arrest, which would contribute to the accumulation of PrP^{Sc} aggregates and its consequent toxicity.

Immunohistochemical tools can be used to identify groups of cells or specific CNS regions where autophagy is altered. Contrary to the downregulation of *ATG5* protein described in brains from murine models of sporadic CJD (sCJD) (Llorens *et al.*, 2017), *ATG5* expression scores in natural scrapie correlated positively with the amount of PrP^{Sc} deposits. Moreover, in contrast to its reduced transcript levels, *ATG5* protein increased in one of the most affected areas of the CNS of scrapie-infected animals, the nucleus of the trigeminal nerve spinal tract of medulla oblongata. Occasionally, this protein also displayed a perineuronal arrangement within the neuronal cytoplasm. Although the subcellular localization of *ATG5* is still not clear, it binds membranes and is essential for autophagy and cytoplasm-to-vacuole transport (Romanov *et al.*, 2012). Therefore, the observed perineuronal localization of *ATG5* may indicate the induction of autophagosome formation in these neurons. However, the retrograde transport of autophagosomes and their maturation to lysosomes are impaired in other neurodegenerative diseases such as AD, which results in a massive accumulation of autophagic vacuoles within degenerating neurites (Son *et al.*, 2012). In this case, the combination of increased autophagy induction and defective clearance results in A β accumulation (Nixon, 2007). It is plausible that increased *ATG5* immunostaining observed here in highly affected areas in scrapie brains could reflect the induction and subsequent accumulation of non-functional autophagosomes in neurites, which may contribute to the development of prion disease. This accumulation could also explain the negative correlation observed between the levels of RNA and protein expression as increased autophagic proteins could lead to downregulation of their gene expression directly or indirectly through negative feedback.

LC3-B and LC3-A proteins differ somewhat in their distribution and immunohistochemical patterns in scrapie brains. Different subcellular distribution for LC3 proteins has been previously described in human cancer cell lines and it was suggested that autophagosomes are formed by only one of the LC3 proteins (Koukourakis *et al.*, 2015). Besides in the neuronal cytoplasm, LC3-B immunostaining was also positive in the nucleus, probably because of its abundant nuclear presence (Drake *et al.*, 2010). LC3 becomes selectively activated in the nucleus during starvation to be subsequently redistributed to cytoplasm, where it plays a central role in autophagy (Huang *et al.*, 2015). Although IHC does not allow the discrimination between LC3-I and LC3-II forms, a punctate pattern similar to the one observed in our work has been related with the presence of autophagosomes (Rosenfeldt *et al.*, 2012).

As we have discussed above, autophagy impairment has been proposed as a pathogenic mechanism in AD patients and murine models of sCJD where the expression of ATG proteins is reduced, while the level of LC3-II, the main autophagosomal marker, is increased (Boland *et al.*, 2008; Pickford *et al.*, 2008; Llorens *et al.*, 2017). In our study, immunostaining of LC3s proteins displayed a positive correlation with prion deposition and neuropil spongiosis. However, whereas LC3-A was significantly increased in both highly affected areas (medulla oblongata and pons) and cell populations with a lower degree of lesion (cerebellar Purkinje cells), LC3-B seemed to be slightly increased in most of the areas analysed in scrapie brains but was significantly upregulated only in two of the less affected areas, cerebellum and basal ganglia. Thus, the levels of these LC3s proteins as such do not reflect scrapie neuropathology in a simple manner but seem to respond differently, possibly depending on the disease stage.

The accumulation of p62 in cells and tissues from autophagy-deficient mice (Komatsu *et al.*, 2007) indicated that the degradation of p62 is dependent on autophagy. In prion research, some *in vitro* studies have proposed the enhancement of p62-activity as a possible therapeutic target for the induction of autophagy, because overexpression of p62 promotes degradation of PrP^{Sc} (Homma *et al.*, 2014). However, the accumulation of p62 is generally used as a marker for inhibition or defects in autophagic activity (Bjorkoy *et al.*, 2005). Contrary to p62 downregulation observed in hamsters infected with prions (Xu *et al.*, 2012), p62 accumulates in scrapie brains in almost all CNS areas analysed, which would indicate an impairment of autophagic activity in the CNS during the course

of the natural disease. In the same manner, the amino-terminally truncated prion protein PrP⁹⁰⁻²³¹ triggers autophagic process through the upregulation of both LC3-II and p62 *in vitro*, leading to progressive accumulation of autophagolysosomes with impaired resolution ability, resulting in prion accumulation and toxicity (Thellung *et al.*, 2018).

In scrapie brains, p62 was generally increased but its immunostaining did not correlate with PrP^{Sc} deposition, as it was upregulated in areas with different degrees of lesions. On one hand, upregulation of p62 and ATG5 in highly affected areas (medulla oblongata) would reflect an unsuccessful effort of the neurons for counteracting prion infection leading to autophagy impairment and the accumulation of non-functional autophagosomes. On the other hand, overexpression of LC3s and p62 proteins, but not ATG5, in minimally prion-affected areas of scrapie-infected animals (cerebellum and basal ganglia) suggests the activation of the autophagic machinery as a defence mechanism that protects against neurodegeneration and leads to prion clearance, as it has been proposed in murine models *in vivo* (Homma *et al.*, 2014).

Moreover, in Purkinje cells of scrapie animals there was an overrepresentation of LC3-A and p62 positive stained cells compared to controls. In these cells, ATG5 remained unchanged and p62 staining was lower than in highly affected areas. This could indicate successful induction of autophagy in these cells. These results are in accordance with previous studies that indicate a remarkably efficient autophagosome formation in Purkinje cells of hamsters inoculated with 263K scrapie agent (Xu *et al.*, 2012). A previous study revealed intense immunolabelling of chaperones Hsp70 and Hsp90 in Purkinje cells of natural scrapie sheep (Serrano *et al.*, 2011). Chaperones, like autophagy, are involved in the removing of altered proteins from the cell. Hence, both processes may be interwoven and involved in specific neuroprotective mechanisms in this cell type against the toxicity of PrP^{Sc}. However, we cannot rule out that the changes observed constitute an early mechanism in the response to prion toxicity as cerebellum is one of the tissues that is affected later in classical scrapie. The analysis of atypical scrapie cases where PrP^{Sc} immunolabelling is particularly prominent in the cerebellum (Simmons *et al.*, 2010) would contribute to clarify the role of autophagy in these cells.

To conclude, the presented gene expression and immunohistochemical study suggests a differential regulation of autophagic machinery in the different areas of the

CNS in scrapie infected sheep used as a natural model of prion diseases. The downregulation of autophagy related genes and the increment of ATG5 and p62 suggest an arrest of the autophagy machinery in highly affected areas that could be a consequence of an impairment of neuronal function and would facilitate prion replication. Conversely, specific areas and cell populations like basal ganglia and cerebellar Purkinje cells could still have the autophagy machinery intact and the overexpression of LC3-A and p62 would facilitate prion elimination and cell survival. The impairment of autophagy could be a late effect of the disease and it should be considered when designing possible treatments directed to induce autophagy.

Ethics approval: The Ethics Committee for Animal Experiments of the University of Zaragoza (Permit Number: PI38/15) approved all procedures. The care and use of experimental animals were performed in strict accordance with the national law (R.D. 53/2013).

REFERENCES

- Abdulrahman, B. A., Abdelaziz, D., Thapa, S., Lu, L., Jain, S., Gilch, S., . . . Schatzl, H. M. (2017). The celecoxib derivatives AR-12 and AR-14 induce autophagy and clear prion-infected cells from prions. *Sci Rep*, *7*(1), 17565. doi: 10.1038/s41598-017-17770-8
- Acin, C., Martin-Burriel, I., Monleon, E., Rodellar, C., Badiola, J. J., & Zaragoza, P. (2004). PrP polymorphisms in Spanish sheep affected with natural scrapie. *Vet Rec*, *155*(12), 370-372.
- Aguzzi, A., & Haass, C. (2003). Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease. *Science*, *302*(5646), 814-818. doi: 10.1126/science.1087348
- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M. T., Michel, P. P., Marquez, J., . . . Agid, Y. (1997). Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol*, *12*(1), 25-31.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., . . . Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, *171*(4), 603-614. doi: 10.1083/jcb.200507002
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Overvatn, A., Brech, A., & Johansen, T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*, *452*, 181-197. doi: 10.1016/S0076-6879(08)03612-4

- Boellaard, J. W., Schlote, W., & Tateishi, J. (1989). Neuronal autophagy in experimental Creutzfeldt-Jakob's disease. *Acta Neuropathol*, 78(4), 410-418.
- Boellaard, J. W., Kao, M., Schlote, W., & Diringer, H. (1991). Neuronal autophagy in experimental scrapie. *Acta Neuropathol*, 82(3), 225-228.
- Boland, B., Kumar, A., Lee, S., Platt, F. M., Wegiel, J., Yu, W. H., & Nixon, R. A. (2008). Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 28(27), 6926-6937. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0800-08.2008
- Budka, H. (2003). Neuropathology of prion diseases. *Br Med Bull*, 66, 121-130.
- Cao, Y., & Klionsky, D. J. (2007). Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Res*, 17(10), 839-849. doi: 10.1038/cr.2007.78
- Drake, K. R., Kang, M., & Kenworthy, A. K. (2010). Nucleocytoplasmic distribution and dynamics of the autophagosome marker EGFP-LC3. *PLoS One*, 5(3), e9806. doi: 10.1371/journal.pone.0009806
- Fan, X. Y., Tian, C., Wang, H., Xu, Y., Ren, K., Zhang, B. Y., . . . Dong, X. P. (2015). Activation of the AMPK-ULK1 pathway plays an important role in autophagy during prion infection. *Sci Rep*, 5, 14728. doi: 10.1038/srep14728
- Ferraro, E., & Cecconi, F. (2007). Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys*, 462(2), 210-219. doi: 10.1016/j.abb.2007.02.006
- Heiseke, A., Aguib, Y., & Schatzl, H. M. (2010). Autophagy, prion infection and their mutual interactions. *Curr Issues Mol Biol*, 12(2), 87-97.
- 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
- Houston, F., Goldmann, W., Foster, J., Gonzalez, L., Jeffrey, M., & Hunter, N. (2015). Comparative Susceptibility of Sheep of Different Origins, Breeds and PRNP Genotypes to Challenge with Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie. *PLoS One*, 10(11), e0143251. doi: 10.1371/journal.pone.0143251
- Huang, R., Xu, Y., Wan, W., Shou, X., Qian, J., You, Z., . . . Liu, W. (2015). Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation. *Mol Cell*, 57(3), 456-466. doi: 10.1016/j.molcel.2014.12.013
- Jeong, J. K., Lee, Y. J., Jeong, S. Y., Jeong, S., Lee, G. W., & Park, S. Y. (2017). Autophagic flux induced by graphene oxide has a neuroprotective effect against human prion protein fragments. *Int J Nanomedicine*, 12, 8143-8158. doi: 10.2147/IJN.S146398

- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., . . . Ohsumi, Y. (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol*, *147*(2), 435-446.
- Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y. S., Ueno, T., Hara, T., . . . Tanaka, K. (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, *131*(6), 1149-1163. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.035
- Koukourakis, M. I., Kalamida, D., Giatromanolaki, A., Zois, C. E., Sivridis, E., Pouliliou, S., . . . Harris, A. L. (2015). Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines. *PLoS One*, *10*(9), e0137675. doi: 10.1371/journal.pone.0137675
- Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., . . . Nomenclature Committee on Cell, D. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*, *12 Suppl 2*, 1463-1467. doi: 10.1038/sj.cdd.4401724
- Kroemer, G., & Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *9*(12), 1004-1010. doi: 10.1038/nrm2529
- Lai, M., Yao, H., Shah, S. Z. A., Wu, W., Wang, D., Zhao, Y., . . . Yang, L. (2018). The NLRP3-Caspase 1 Inflammasome Negatively Regulates Autophagy via TLR4-TRIF in Prion Peptide-Infected Microglia. *Front Aging Neurosci*, *10*, 116. doi: 10.3389/fnagi.2018.00116
- Larsen, K. E., & Sulzer, D. (2002). Autophagy in neurons: a review. *Histol Histopathol*, *17*(3), 897-908. doi: 10.14670/HH-17.897
- Levine, B., & Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, *6*(4), 463-477.
- 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., Gajos, A., & Bogucki, A. (2017). Robust autophagy in optic nerves of experimental Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Folia Neuropathol*, *55*(4), 289-294. doi: 10.5114/fn.2017.72386
- Lyahyai, J., Bolea, R., Serrano, C., Monleon, E., Moreno, C., Osta, R., . . . Martin-Burriel, I. (2006). Correlation between Bax overexpression and prion deposition in medulla oblongata from natural scrapie without evidence of apoptosis. *Acta Neuropathol*, *112*(4), 451-460. doi: 10.1007/s00401-006-0094-4

- Lyahyai, J., Bolea, R., Serrano, C., Vidal, E., Pumarola, M., Badiola, J. J., . . . Martin-Burriel, I. (2007). Differential expression and protein distribution of Bax in natural scrapie. *Brain Res*, *1180*, 111-120. doi: 10.1016/j.brainres.2007.08.085
- 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
- Llorens, F., Thune, K., Sikorska, B., Schmitz, M., Tahir, W., Fernandez-Borges, N., . . . Zerr, I. (2017). Altered Ca(2+) homeostasis induces Calpain-Cathepsin axis activation in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol Commun*, *5*(1), 35. doi: 10.1186/s40478-017-0431-y
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., . . . Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol*, *152*(4), 657-668.
- Mizushima, N. (2005). The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ*, *12 Suppl 2*, 1535-1541. doi: 10.1038/sj.cdd.4401728
- Mizushima, N., & Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, *3*(6), 542-545.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, *451*(7182), 1069-1075. doi: 10.1038/nature06639
- Mok, S. W., Riemer, C., Madela, K., Hsu, D. K., Liu, F. T., Gultner, S., . . . 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., 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
- Myeku, N., & Figueiredo-Pereira, M. E. (2011). Dynamics of the degradation of ubiquitinated proteins by proteasomes and autophagy: association with sequestosome 1/p62. *J Biol Chem*, *286*(25), 22426-22440. doi: 10.1074/jbc.M110.149252
- Nixon, R. A. (2007). Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci*, *120*(Pt 23), 4081-4091. doi: 10.1242/jcs.019265
- Pattison, I. H., & Jones, K. M. (1967). The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *Vet Rec*, *80*(1), 2-9.
- Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P. A., . . . Wyss-Coray, T. (2008). The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early

- Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest*, 118(6), 2190-2199. doi: 10.1172/JCI33585
- Poser, C. M. (2002). Notes on the history of the prion diseases. Part II. *Clin Neurol Neurosurg*, 104(2), 77-86.
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216(4542), 136-144.
- Prusiner, S. B. (1998). The prion diseases. *Brain Pathol*, 8(3), 499-513.
- Rogov, V., Dotsch, V., Johansen, T., & Kirkin, V. (2014). Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell*, 53(2), 167-178. doi: 10.1016/j.molcel.2013.12.014
- Romanov, J., Walczak, M., Ibricu, I., Schuchner, S., Ogris, E., Kraft, C., & Martens, S. (2012). Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO J*, 31(22), 4304-4317. doi: 10.1038/emboj.2012.278
- Rosenfeldt, M. T., Nixon, C., Liu, E., Mah, L. Y., & Ryan, K. M. (2012). Analysis of macroautophagy by immunohistochemistry. *Autophagy*, 8(6), 963-969. doi: 10.4161/auto.20186
- Schatzl, H. M., Laszlo, L., Holtzman, D. M., Tatzelt, J., DeArmond, S. J., Weiner, R. I., . . . Prusiner, S. B. (1997). A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J Virol*, 71(11), 8821-8831.
- Serrano, C., Martin-Burriel, I., Lyahyai, J., Monzon, M., El Hamidi, M., Acin, C., . . . Zaragoza, P. (2007). Polymorphisms of the PRNP gene in Moroccan sheep breeds. *Vet Rec*, 161(15), 524-525.
- Serrano, C., Lyahyai, J., Bolea, R., Varona, L., Monleon, E., Badiola, J. J., . . . Martin-Burriel, I. (2009). Distinct spatial activation of intrinsic and extrinsic apoptosis pathways in natural scrapie: association with prion-related lesions. *Vet Res*, 40(5), 42. doi: 10.1051/vetres/2009024
- Serrano, C., Bolea, R., Lyahyai, J., Filali, H., Varona, L., Marcos-Carcavilla, A., . . . Martin-Burriel, I. (2011). Changes in HSP gene and protein expression in natural scrapie with brain damage. *Vet Res*, 42, 13. doi: 10.1186/1297-9716-42-13
- Sikorska, B., Liberski, P. P., Giraud, P., Kopp, N., & Brown, P. (2004). Autophagy is a part of ultrastructural synaptic pathology in Creutzfeldt-Jakob disease: a brain biopsy study. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(12), 2563-2573. doi: 10.1016/j.biocel.2004.04.014
- Simmons, M. M., Konold, T., Thurston, L., Bellworthy, S. J., Chaplin, M. J., & Moore, S. J. (2010). The natural atypical scrapie phenotype is preserved on experimental transmission

- and sub-passage in PRNP homologous sheep. *BMC Vet Res*, 6, 14. doi: 10.1186/1746-6148-6-14
- Son, J. H., Shim, J. H., Kim, K. H., Ha, J. Y., & Han, J. Y. (2012). Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med*, 44(2), 89-98. doi: 10.3858/emm.2012.44.2.031
- Thellung, S., Scoti, B., Corsaro, A., Villa, V., Nizzari, M., Gagliani, M. C., . . . 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
- 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.
- Xu, Y., Tian, C., Wang, S. B., Xie, W. L., Guo, Y., Zhang, J., . . . Dong, X. P. (2012). 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 Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 45(6), 494-502. doi: 10.1093/abbs/gmt022

**Spatial distribution of autophagy markers in the
central nervous system of sheep experimentally
infected with atypical scrapie**

Manuscrito preliminar

*Óscar López Pérez, Rosa Bolea, Pilar Zaragoza, Juan José Badiola,
Inmaculada Martín Burriel*

Spatial distribution of autophagy markers in the central nervous system of sheep experimentally infected with atypical scrapie

ABSTRACT

Autophagy is a critical physiologic process contributing to the maintenance of cell homeostasis. Autophagy dysfunction has been directly linked to a growing number of neurodegenerative disorders, including prion diseases. However, the molecular mechanisms underlying autophagic failure and its connection with prion neuropathology, are still unknown. In a previous work aimed at studying autophagic activity in the classical form of natural scrapie, we described alterations of this process in highly-affected areas of the central nervous system (CNS), although specific neuronal populations such as Purkinje cells seemed to display an autophagy-related neuroprotective effect against prion toxicity. Using immunohistochemical analyses, we further investigated herein the role of autophagy in the CNS of sheep experimentally infected with atypical scrapie. While ATG5 protein showed a similar distribution in atypical scrapie to that observed in the classical form, expression of LC3-B and LC3-A did not change in any brain region. However, p62 was overexpressed in the most prion-affected areas, which suggests that autophagic activity is deteriorated in the CNS of atypical scrapie. On the other hand, those brain areas with a lower degree of lesion did not show differential regulation neither p62 nor LC3s, suggesting that autophagy is not perturbed since little prion toxicity affects these structures. Moreover, overexpression of p62 in damaged Purkinje cells, but not ATG5 or LC3s, implies that these cells are also susceptible to neurotoxicity and do not exhibit a general defensive mechanism based on autophagy. By comparing data from both clinical scrapie forms, we have demonstrated that autophagy impairment is highly dependent on the neuropathological lesion levels of the brain area analysed and may be implicated in prion neuropathology.

INTRODUCTION

Scrapie in sheep and goats is considered to be the prototype of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) and the most widely known (Pattison & Jones, 1967). It is well-established that the only biochemical marker of TSEs is the accumulation of an abnormal, partially protease-resistant isoform (PrP^{Sc}) of the normal cellular prion protein (PrP^C). An unrecognized type of scrapie with remarkably unusual

features, designated atypical or Nor98 scrapie, was reported for the first time in Norway in 1998 (Benestad *et al.*, 2003). Since its first discovery, atypical scrapie has been identified in small ruminants in most European countries as well in other territories (Benestad *et al.*, 2008), and currently represents a large percentage of the TSEs cases diagnosed in Europe. These atypical cases occurred in sheep older than five years, some of them carrying PrP genotypes reportedly to confer resistance to TSEs (Buschmann *et al.*, 2004; Arsac *et al.*, 2007). The distinction between classical and atypical scrapie is based on several properties, including the biochemical signature on Western blot and the neuroanatomical distribution of histopathological lesions and PrP^{Sc} deposits in the brain (Benestad *et al.*, 2003; Arsac *et al.*, 2007). Atypical scrapie has shown to be efficiently transmitted by experimental inoculation to sheep (Simmons *et al.*, 2007; Simmons *et al.*, 2010) and transgenic mice overexpressing the ovine VRQ PrP (Le Dur *et al.*, 2005), proving that the agent involved is truly infectious. However, more than a decade after its first description, the pathogenesis and epidemiology of atypical scrapie, as well as its underlying pathomolecular mechanisms, are not yet entirely understood.

Autophagy, an intracellular process involved in protein and organelle turnover by lysosome degradation, has been associated with several pathologies, including neurodegenerative diseases (Larsen & Sulzer, 2002). The presence of autophagic vacuoles has been described in experimental models of TSEs, in induced scrapie and in the natural disease in humans (Boellaard *et al.*, 1991; Schatzl *et al.*, 1997; Liberski *et al.*, 2004). Nevertheless, even though autophagy has been repeatedly proposed to provide a protective effect in neurons (Yao *et al.*, 2013), the precise connection of this process with TSEs neuropathology, or even whether autophagy is completely beneficial or pathogenic during neurodegeneration, is still unclear.

In a previous study we investigated the potential for neuronal autophagy to participate in the pathogenesis of classical scrapie in naturally affected sheep through the analysis of gene expression and protein distribution of autophagy-related markers. We described a possible inhibition of the autophagy machinery in highly-affected areas of the central nervous system (CNS) that could facilitate prion replication. This inhibition manifested as a downregulation of autophagy-related genes and an increment of ATG5 and p62 autophagy markers. In contrast, the correlation observed between autophagy markers and prion deposition, and the intense immunoreactivity displayed by

LC3s markers mainly in Purkinje cells, suggested the induction of this process as a defence mechanism in specific cell populations.

Considering that atypical scrapie differs from classical scrapie in its neuropathological and molecular phenotype, in the present study we further aimed at describing and comparing the autophagy markers distribution in the CNS of sheep infected with atypical scrapie, with those of classical scrapie previously analysed. Similarly, histopathological lesions as well as immunoreactivity for PrP^{Sc} deposits were evaluated to detect any correlations with autophagy-related proteins, which in the end is likely to contribute to the understanding of TSEs molecular mechanisms.

MATERIALS AND METHODS

Animals

A panel of 4 female sheep (Churra Tensina breed) experimentally infected with atypical scrapie, including 1 animal in the terminal stage of the disease, was used in this study. Atypical scrapie animals were adults of age 46.08±4.19 months displaying the AHQ/AHQ genotype for *PRNP* (prion protein) gene, which is the most frequently affected genotype in atypical scrapie animals (Benestad *et al.*, 2008). All animals were intracerebrally inoculated with an isolate of CNS material from a Spanish sheep naturally affected with atypical scrapie (AHQ/AHQ) elaborated and supplied by Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA) of Barcelona, Spain. The methodology used for inoculation is detailed elsewhere (Marín *et al.*, 2018).

Histopathological and PrP^{Sc} detection studies

Formalin-fixed samples of frontal cortex (Fc), basal ganglia (Bg), basal ganglia cortex (Bgc), thalamic cortex (Tc), thalamus (T), pons (P), cerebellum (Cbl) and medulla oblongata (Mo) were trimmed and processed according to standard procedures. For histopathology, 4-µm-thick tissue sections were deparaffinized and stained with haematoxylin and eosin (HE). Confirmatory immunohistochemistry (IHC) and PrP^{Sc} distribution profiling were performed in adjacent sections using mouse monoclonal antibody 8G8 [1:200 dilution at room temperature (RT) for 30 minutes (min); Cayman Chemical, Michigan, USA], as previously reported (Andreoletti *et al.*, 2011). Scrapie

negative and positive control tissue slides from confirmed cases were included in each IHC run.

Immunohistochemical determination of autophagy markers

For the autophagy-related proteins distribution analysis, the IHC protocol used was similar to that applied for classical scrapie, according to our previously described method. Briefly, after hydrated autoclaving to enhance antigen retrieval, the endogenous peroxidase activity was blocked with blocking reagent (Dako). Next, sections were incubated with one of the following primary antibodies: mouse monoclonal anti APG5, mouse monoclonal anti MAP-LC3 β , rabbit polyclonal anti MAP-LC3 α (Santa Cruz Biotechnology), and rabbit polyclonal anti p62 (Enzo Life Sciences), at a dilution of 1:50 at 4°C overnight for APG5 and MAP-LC3 α , and 1:200 dilution at RT for 1 hour (h) for MAP-LC3 β and p62. Successive steps were performed with the horseradish peroxidase polymer system and diaminobenzidine (DAB) visualization kit (Dako). To ensure specificity of the IHC reactions, a background control section for nonspecific staining was included for each protein, in which the primary antibody was omitted.

Data analysis

Spongiform changes (i.e. neuropil spongiosis and intraneuronal vacuolation), intensity of PrP^{Sc} staining, as well as ATG5, LC3-B, LC3-A and p62 immunolabelling, were examined and scored semi-quantitatively on a scale ranging from 0 (absent) to 5 (severe) in the eight aforementioned brain regions. In addition, four layers of the Cbl [molecular layer (MI), Purkinje layer (PI), granular layer (GI) and white matter (Wm)], and five neuronal nuclei of the Mo [the hypoglossal motor nucleus (HMN), the dorsal nucleus of the vagus nerve (NVN), the lateral cuneate nucleus (LCN), the nucleus of the trigeminal nerve spinal tract (NTN) and the olivary nucleus (ON)] were also analysed in order to obtain a more detailed description of these areas. Histopathological and immunohistochemical differences with classical scrapie data were evaluated using non-parametric Mann Whitney U test. Correlations between protein immunolabelling and the different neuropathological lesions in atypical scrapie were determined using the non-parametric Spearman's rank correlation coefficient (ρ , ρ). IBM® SPSS® statistics 22 software was used for all data analysis. The results were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Scrapie-associated neuropathology corresponds to the atypical form of the disease

Prior to the analysis of the autophagic markers, the diagnosis of selected sheep was confirmed and the distribution of prion-related histopathological features was determined. The pattern of atypical scrapie lesions was compared to that obtained in negative scrapie-free sheep used as controls in our previous work. The evaluation of HE-stained sections revealed a significant and strong increase of neuropil spongiosis in Fc, Bg, Bgc, Tc and Cbl of the scrapie-infected animals compared with controls. In contrast, this pathological lesion was much less prominent, but still significant, in T, P and Mo (Figure 1A). Intraneuronal vacuolation displayed a similar distribution pattern, with a little but significant increment in Fc, Bg, Bgc, Tc and Cbl. In this case, vacuolation was totally absent in T, P and Mo (Figure 1A).

IHC for PrP^{Sc} confirmed the diagnosis of scrapie, and positivity was detected in all animals studied. However, the intensity of PrP^{Sc} deposits was markedly different between the scrapie affected animals, showing one animal minimal scores in almost all CNS areas analysed, except for Cbl, another sheep displaying moderate PrP^{Sc} immunolabelling, and two of them showing severe staining intensity (data not shown). The neuropathological diversity in this disease is frequently observed among the affected individuals, not finding a clear correlation between this heterogeneity and factors such as the *PRNP* genotype (Nentwig *et al.*, 2007). Despite the high variability observed within the atypical scrapie group, statistically significant differences were detected in all brain regions and, again, the Fc, Bg, Bgc, Tc and Cbl, showed the highest scores for PrP^{Sc} deposition (Figure 1B). When analysing the cerebellar layers separately, we observed a significant and strong increment of spongiosis (Figure 1A) and PrP^{Sc} immunostaining (Figure 1B) in Ml, Gl and Wm, which did not show vacuolation. In contrast, the Purkinje layer displayed no PrP^{Sc} deposition (Figure 1B), but great intensity of spongiosis and vacuolation (Figure 1A), although the latter was highly variable within the animals. In Mo, minimal changes were observed in the different neuronal nuclei for the studied lesions (Figure 1A-1B). The observed neuropathological pattern corresponds to that described for the atypical form of scrapie (Benestad *et al.*, 2003; Nentwig *et al.*, 2007; Benestad *et al.*, 2008).

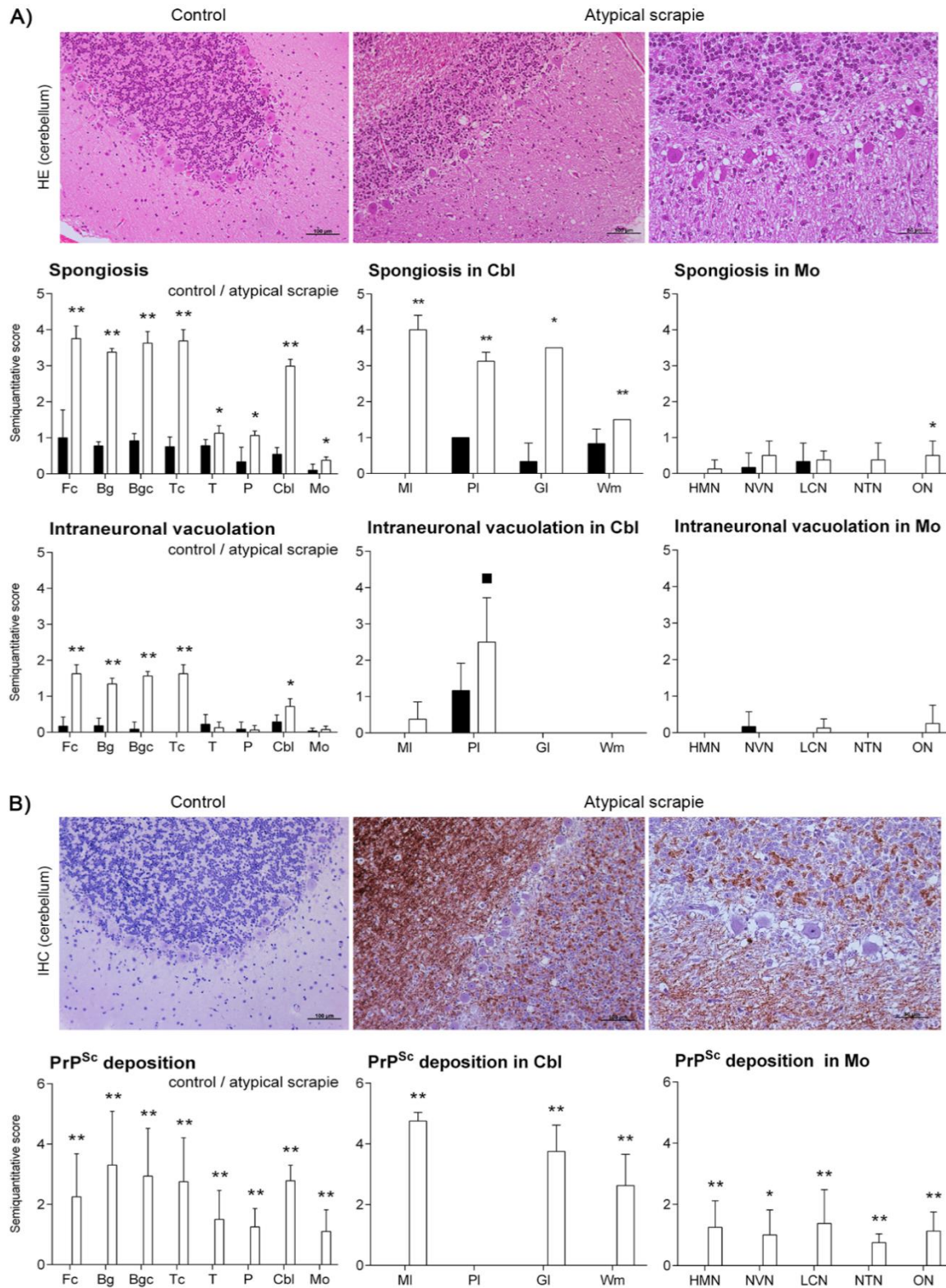


Figure 1: Neuropil spongiosis, intraneuronal vacuolation (A) and PrP^{Sc} deposition (B) in different CNS areas of atypical scrapie-infected sheep (white bars) and control animals (black bars). Figure shows representative images of haematoxylin and eosin staining (A), and PrP^{Sc} deposition (B) in cerebellum of control and atypical scrapie sheep (100 and 50 µm). Graphics show the semi-quantitative assessment values of these neuropathological features in frontal cortex (Fc), basal ganglia (Bg), basal ganglia cortex (Bgc), thalamic cortex (Tc), thalamus (T), pons (P), cerebellum (Cbl) and medulla oblongata (Mo), including four cerebellar layers [molecular layer (MI), Purkinje layer (PI), granular layer (GI) and white matter (Wm)], and five neuronal nuclei of the Mo [the hypoglossal motor nucleus (HMN), the dorsal nucleus of the vagus nerve (NVN), the lateral cuneate nucleus (LCN), the nucleus of the trigeminal nerve spinal tract (NTN) and the olivary nucleus (ON)]. Scores range from 0 (negative) to 5 (maximum intensity). Significant differences were determined using the Mann Whitney U test (■P<0.1, *P<0.05 and **P<0.01).

ATG5 is upregulated in Mo, p62 in highly-affected areas of the CNS, and both are associated with the neuropathological features of atypical scrapie

We next analysed the protein distribution of four autophagy markers (ATG5, LC3-B, LC3-A and p62) in the atypical scrapie brain tissues by IHC. The immunostaining patterns of these markers were identical to those previously described for classical scrapie. ATG5 presented a diffuse immunostaining throughout the neuropil and within the cytoplasm of neurons, which occasionally displayed a perineuronal arrangement. Both LC3-B and LC3-A immunolabelling consisted of an intense intraneuronal staining, and a mild diffuse punctiform neuropil staining. In addition, LC3-B displayed nuclear positive immunolabelling. Finally, p62 presented a coarse granular pattern in the neuropil and the cytoplasm of cells, and a uniform intraneuronal staining of Purkinje cells.

ATG5 protein was significantly increased in the Mo of atypical scrapie-infected animals compared to the control group ($P=0.033$), specifically in the NTN ($P=0.028$), but also in the HMN ($P=0.033$) and the NVN ($P=0.011$) (Figure 2 and Figure 3A). There were no significant differences in the remaining tissues under study. However, in Cbl of atypical scrapie sheep, we perceived that most of the Purkinje cells in poor condition did not show ATG5 staining, or it was of a lower degree, compared to those cells apparently healthy (Figure 3B), which led to a tendency to downregulation in this cerebellar area ($P=0.052$) (Figure 2). This finding was also observed for both LC3-B and LC3-A (Figure 3C), although these proteins did not show semi-quantitative differences neither in Cbl nor the rest of brain tissues (Figure 2). Finally, atypical scrapie sheep displayed significantly stronger scores for p62 in all highly-affected brain areas analysed, i.e. Fc ($P=0.015$), Bg ($P=0.031$), Bgc ($P=0.038$), Tc ($P=0.014$), and Cbl ($P=0.035$), including all cerebellar layers (Figure 2 and Figure 3D-3E). Unlike the other markers, p62 staining levels were similar within the Purkinje cell layer, regardless of their cellular integrity or shape (Figure 3E). Interestingly, the minimally prion-affected regions in these animals, i.e. T, P and Mo, showed no significant changes of p62 levels (Figure 2). ATG5 and p62 immunostaining scores correlated with all neuropathological features of the atypical scrapie group ($P<0.001$), but in the opposite way (negatively for ATG5 and positively for p62) (Table 1). LC3-A positively correlated with neuropil spongiosis and neuronal vacuolation, and LC3-B showed no significant correlations.

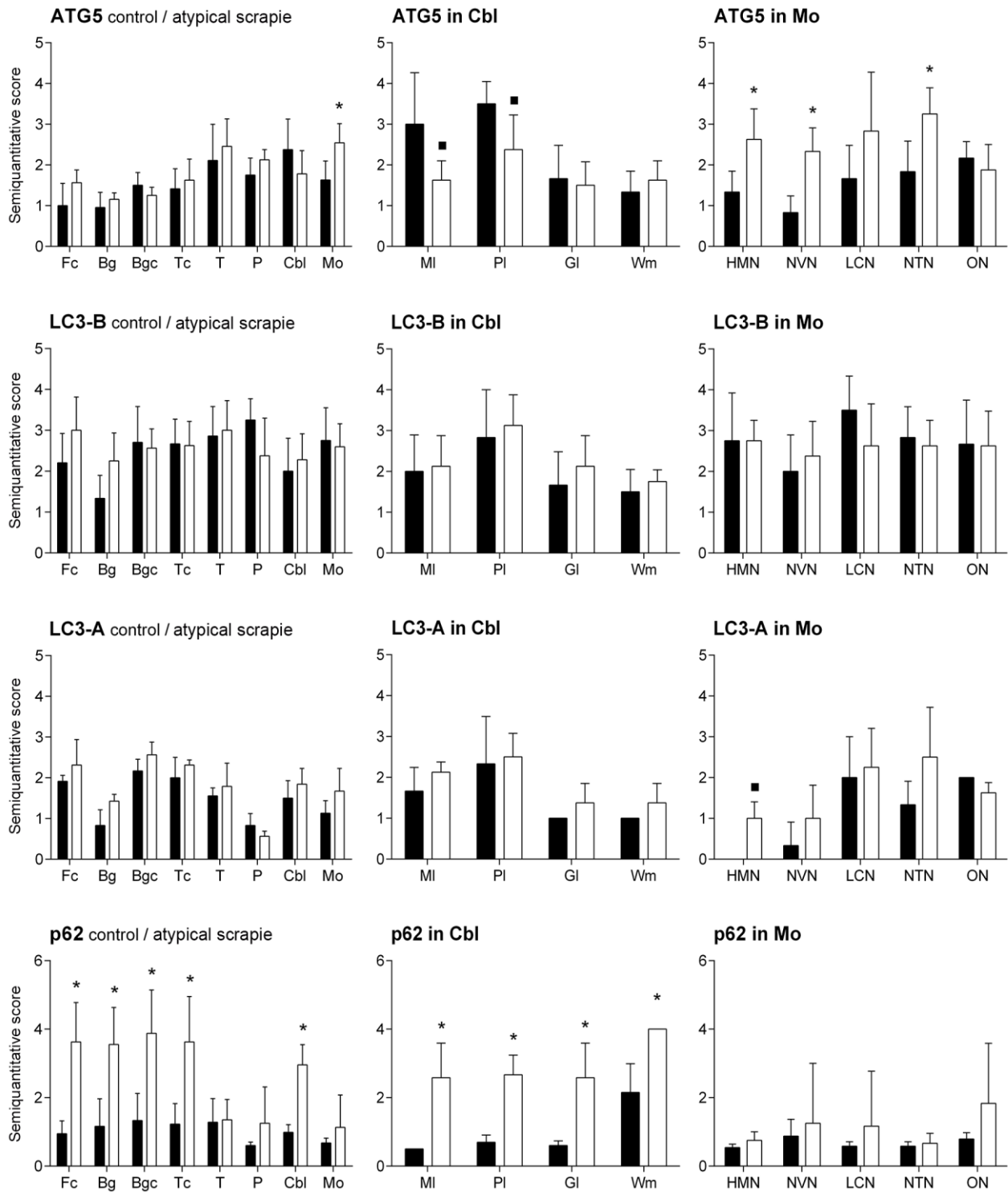


Figure 2: Semi-quantitative scoring of immunohistology for autophagy-related proteins in atypical scrapie-infected sheep (white bars) compared to control animals (black bars). Score values of ATG5, LC3-B, LC3-A and p62 (from 0: negative, to 5: staining present at its maximum intensity) evaluated in frontal cortex (Fc), basal ganglia (Bg), basal ganglia cortex (Bgc), thalamic cortex (Tc), thalamus (T), pons (P), four layers of cerebellum (Cbl) [molecular layer (MI), Purkinje layer (PI), granular layer (GI) and white matter (Wm)], and five neuronal nuclei of the medulla oblongata (Mo) [the hypoglossal motor nucleus (HMN), the dorsal nucleus of the vagus nerve (NVN), the lateral cuneate nucleus (LCN), the nucleus of the trigeminal nerve spinal tract (NTN) and the olivary nucleus (ON)]. The differences between the two experimental groups were determined using the Mann Whitney U test (■P<0.1 and *P<0.05).

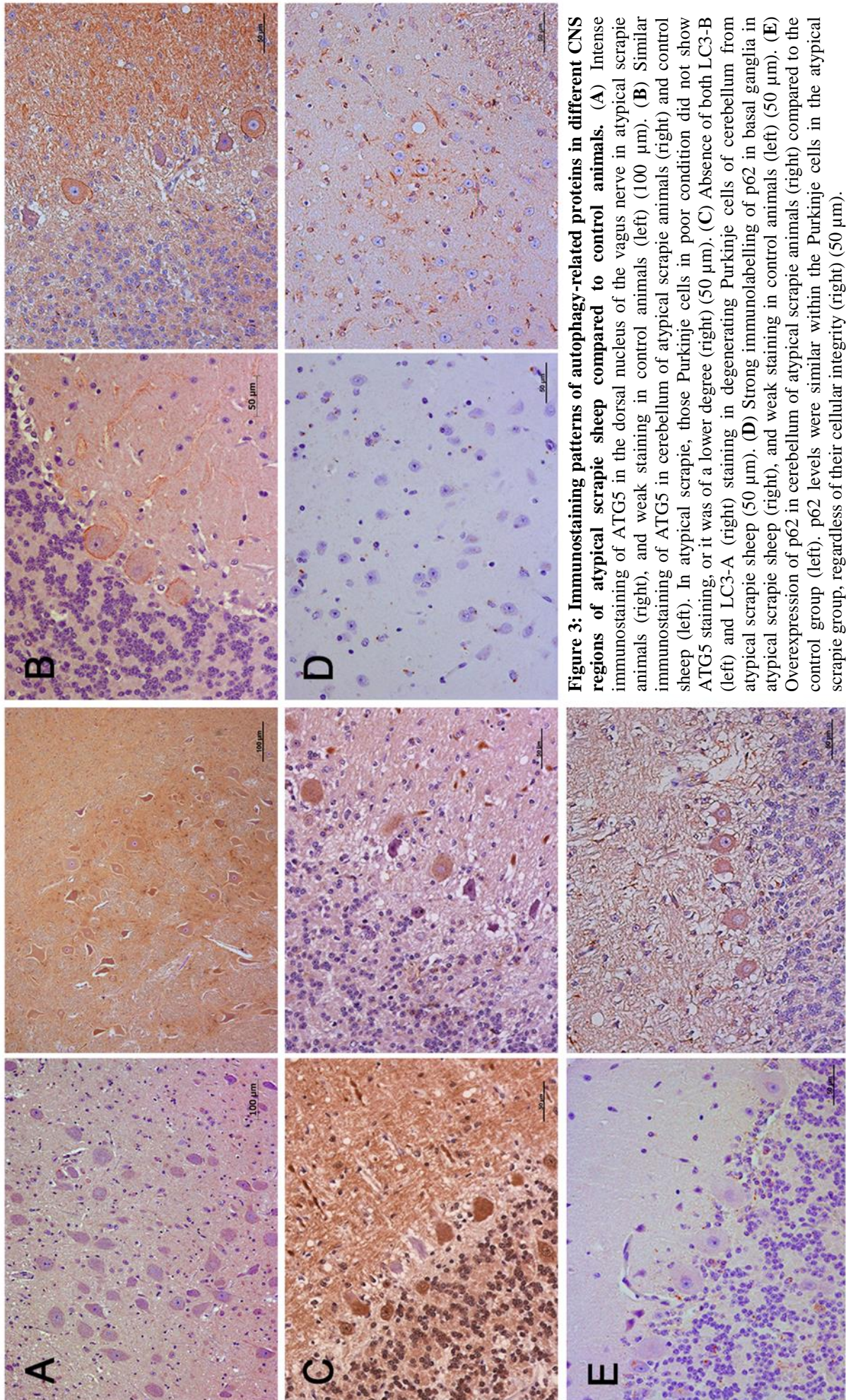


Figure 3: Immunostaining patterns of autophagy-related proteins in different CNS regions of atypical scrapie sheep compared to control animals. (A) Intense immunostaining of ATG5 in the dorsal nucleus of the vagus nerve in atypical scrapie animals (right), and weak staining in control animals (left) (100 μm). (B) Similar immunostaining of ATG5 in cerebellum of atypical scrapie animals (right) and control sheep (left). In atypical scrapie, those Purkinje cells in poor condition did not show ATG5 staining, or it was of a lower degree (right) (50 μm). (C) Absence of both LC3-B (left) and LC3-A (right) staining in degenerating Purkinje cells of cerebellum from atypical scrapie sheep (50 μm). (D) Strong immunolabelling of p62 in basal ganglia in atypical scrapie sheep (right), and weak staining in control animals (left) (50 μm). (E) Overexpression of p62 in cerebellum of atypical scrapie animals (right) compared to the control group (left). p62 levels were similar within the Purkinje cells in the atypical scrapie group, regardless of their cellular integrity (right) (50 μm).

Table 1: Spearman correlation values between autophagy markers scores and histological features (spongiosis, intraneuronal vacuolation and PrP^{Sc} deposition) in atypical scrapie infected sheep. Correlations were estimated using data from the eight analysed tissues. No statistically significant correlation values are shown as N.S. (*P<0.05, **P<0.01, *P<0.001)**

Autophagy markers	Scrapie lesions			Autophagy markers		
	Spongiosis	Intraneuronal vacuolation	PrP ^{Sc}	LC3-A	LC3-B	p62
ATG5	-0.469***	-0.358***	-0.240*	N.S.	0.449***	-0.390***
LC3-A	0.297**	0.388***	N.S.	---	0.317**	N.S.
LC3-B	N.S.	N.S.	N.S.	0.317**	---	N.S.
p62	0.635***	0.552***	0.670***	N.S.	N.S.	---

Differential expression of some autophagy markers in atypical/classical scrapie

In order to detect a possible differential regulation of autophagy markers in the two clinical forms of ovine scrapie, scores for the different proteins were compared with those determined in our previous work. ATG5 distribution in atypical scrapie resembled that observed in the classical form, hence no remarkable changes were detected when comparing ATG5 protein levels in both diseases (Figure 4). Likewise, immunohistochemical expression of LC3-B was similar in both scrapie forms. However, because the classical scrapie group showed an overexpression of this protein in Cbl, we observed a significant downregulation of LC3-B in this area in atypical scrapie sheep compared to the classical form (P=0.031), predominantly in the MI (P=0.047) (Figure 5A). In contrast, LC3-A displayed significant changes between the scrapie diseases in almost all CNS areas (Figure 4). This protein was upregulated in the cerebral cortex structures of the atypical scrapie animals, i.e. Fc (P=0.039), Bgc (P=0.007) (Figure 5B) and Tc (P=0.015), but downregulated in the HMN of Mo (P=0.007), P (P=0.007) (Figure 5C), and Cbl (P=0.007), including the MI (P=0.007), Pl (P=0.007) and Wm (P=0.047) (Figure 5D). Unlike atypical scrapie, p62 in classical scrapie was significantly overexpressed in all brain areas analysed. Accordingly, when comparing both sheep disorders, we detected a downregulation of this protein in atypical scrapie in some of those areas in which p62 was not overexpressed, i.e. T (P=0.028) (Figure 5E) and a tendency to decrease in Mo (P=0.071), including some of its neuronal nuclei (Figure 4). In addition, although p62 levels in Cbl were similar in both diseases, the intensity of Purkinje cells staining was moderately higher in atypical scrapie cases (P=0.011) (Figure 5F).

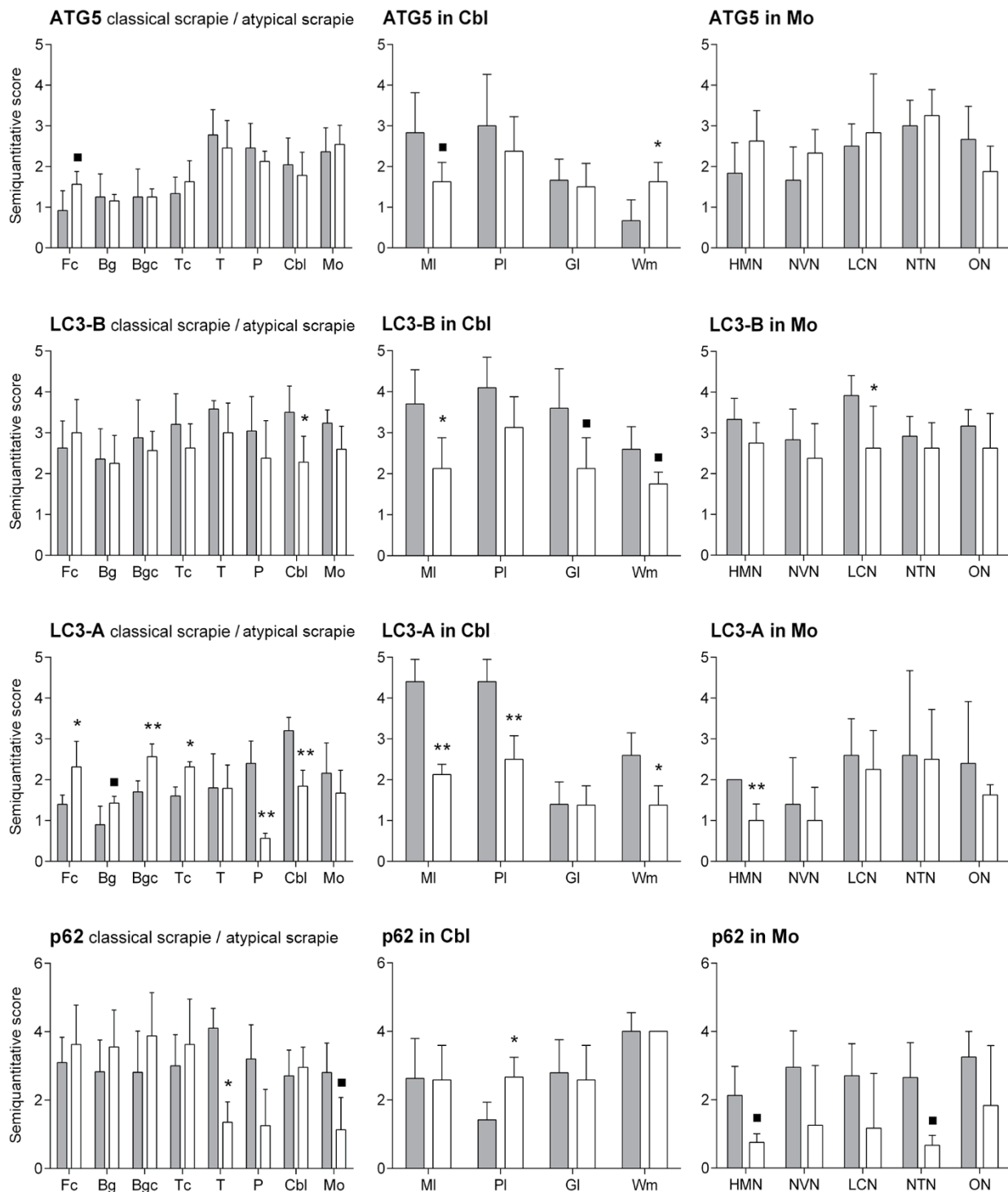


Figure 4: Semi-quantitative scoring of immunohistochemistry for autophagy-related proteins in atypical scrapie-infected sheep (white bars) compared to classical scrapie-infected sheep (grey bars). Score values of ATG5, LC3-B, LC3-A and p62 (from 0: negative, to 5: staining present at its maximum intensity) evaluated in frontal cortex (Fc), basal ganglia (Bg), basal ganglia cortex (Bgc), thalamic cortex (Tc), thalamus (T), pons (P), four layers of cerebellum (Cbl) [molecular layer (MI), Purkinje layer (PI), granular layer (GI) and white matter (Wm)], and five neuronal nuclei of the medulla oblongata (Mo) [the hypoglossal motor nucleus (HMN), the dorsal nucleus of the vagus nerve (NVN), the lateral cuneate nucleus (LCN), the nucleus of the trigeminal nerve spinal tract (NTN) and the olivary nucleus (ON)]. The differences between the two experimental groups were determined using the Mann Whitney U test (■P<0.1, *P<0.05 and **P<0.01).

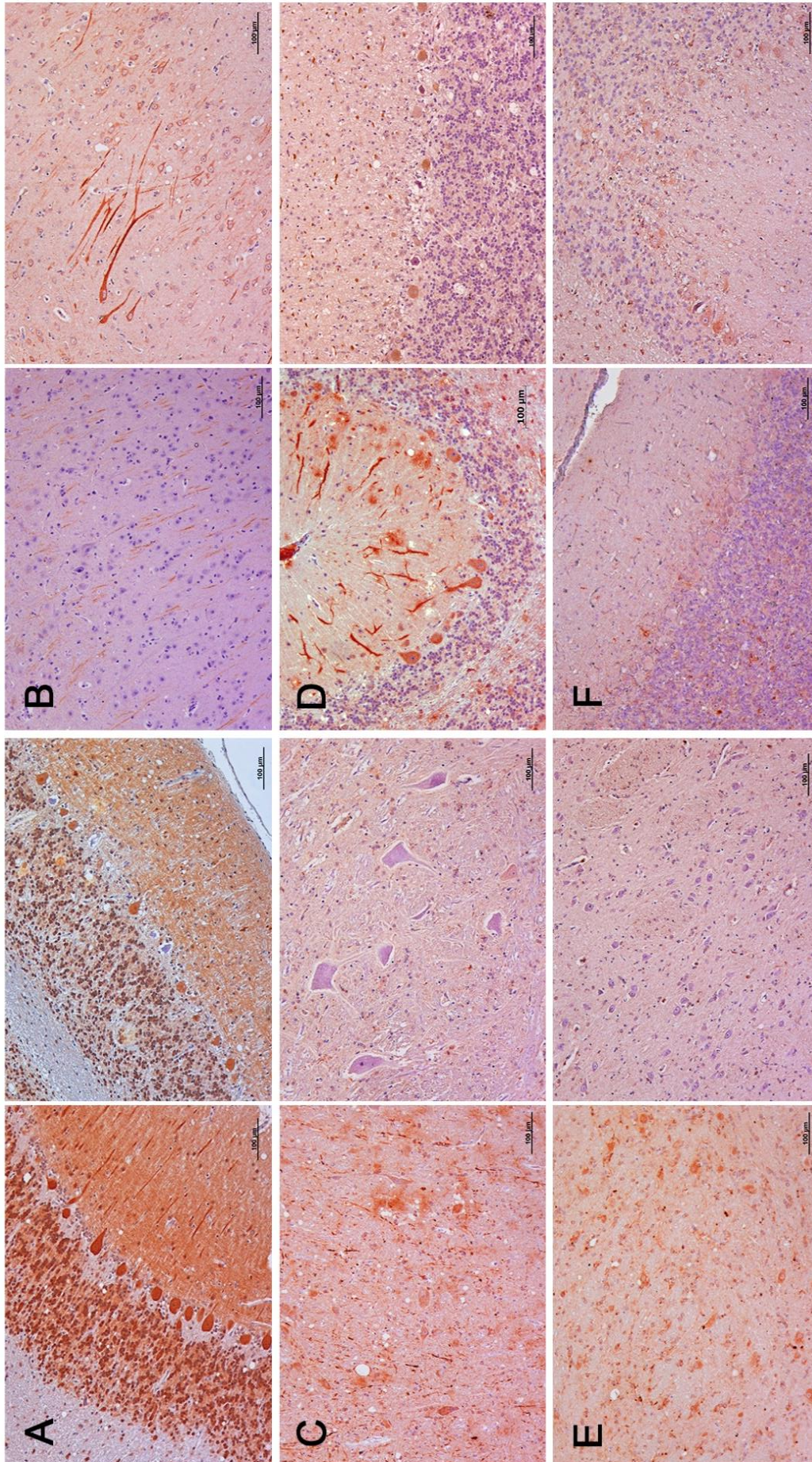


Figure 5: Immunostaining patterns of autophagy-related proteins in different CNS regions of atypical scrapie sheep compared to classical scrapie animals. (A) Downregulation of LC3-B in cerebellum of atypical scrapie sheep (right) compared to classical scrapie (left) (100 µm). (B) Overexpression of LC3-A in basal ganglia cortex of atypical scrapie (right) compared to classical scrapie (left) (100 µm). (C) Downregulation of LC3-A in pons of atypical scrapie animals (right) compared to the classical form of the disease (left) (100 µm). (D) Downregulation of LC3-A in cerebellum of atypical scrapie sheep (right) compared to classical scrapie sheep (left) (100 µm). (E) Upregulation of p62 in Purkinje cells of atypical scrapie sheep (right) compared to classical scrapie (left) (100 µm). (F) Downregulation of p62 in thalamus of atypical scrapie sheep (right) compared to classical scrapie (left) (100 µm).

DISCUSSION

The presence of abnormal or perturbed autophagic activity is frequently observed in several neurodegenerative diseases (Wong & Cuervo, 2010; Son *et al.*, 2012). However, the precise mechanism that underlies autophagic dysfunction in these disorders is poorly understood. During the last decade, the role of autophagy in prion neuropathology has been investigated both *in vivo* and *in vitro* (Xu *et al.*, 2012; Homma *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2015; Moon *et al.*, 2016; Liberski *et al.*, 2017; Llorens *et al.*, 2017; Thellung *et al.*, 2018). Experimental evidence shows that autophagy is a host defence response to infection that plays a protective role in prion diseases by degrading the pathological PrP^{Sc} accumulated within neurons, and autophagy dysfunction in affected neurons may contribute to the formation of spongiform changes (Yao *et al.*, 2013). Then, autophagic levels control the processing of the PrP^{Sc} and would contribute to the final outcome of the histopathological characteristics of each brain area. To date, few studies have focused on analysing the relationship of this intracellular process with prion-related neuropathological lesions.

Using a combination of gene expression and protein distribution analyses, we previously described a possible impairment of autophagy in some of the most highly-affected brain regions of sheep naturally affected with classical scrapie, whereas other areas could still have their autophagic machinery intact, suggesting a combination of anti-prion and prion-promoting effects throughout the brain during the course of the disease. As autophagy levels seem to be highly dependent on the brain area analysed and its specific neurodegenerative features, in the present work we further investigated the role of this degradative pathway in the CNS of sheep experimentally infected with atypical scrapie, because this clinical form of the disease differs from the classical one, among other properties, in the neuroanatomical distribution of the histopathological lesions and PrP^{Sc} deposits in the brain (Benestad *et al.*, 2003; Benestad *et al.*, 2008).

Here, we have described that ATG5 (autophagy-related 5), a protein that plays a crucial role in phagophore expansion and autophagosome development (Romanov *et al.*, 2012), shows a similar immunohistochemical distribution in atypical scrapie to that observed in the classical form, including an upregulation in Mo. This brain area displays a low degree of lesion in the atypical disorder. However, it is one of the most neuropathologically affected tissues in the classical form of the disease. Although

ATG5 is required for autophagosome development, this ATG protein is not present in the mature vesicle after its complete formation, consequently, this early marker is not involved in the subsequent steps of autophagic machinery, which includes trafficking of autophagosome, docking and fusion with lysosomes, and eventual degradation and recycling. Indeed, low mRNA levels of *ATG5* were observed in scrapie-infected brain tissue with no changes in autophagosome formation (Mok *et al.*, 2007), which suggests that this protein may be important for the initiation of the process, but may not reflect the resulting degradative event, i.e. successful autophagy with subsequent clearance of PrP^{Sc}, or degradative failure of autophagosome with accumulation of the pathological protein.

MAP1-LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3), or LC3, has three different isoforms: LC3-A, LC3-B and LC3-C, which show similarities as well as differences (Mann & Hammarback, 1994). Among them, LC3-B is considered to be a popular marker of autophagy. The cytosolic protein LC3-I is covalently linked with phosphatidylethanolamine and converted to LC3-II, which is present in the autophagosome membrane during the autophagy cycle (Barth *et al.*, 2010). Therefore, LC3s proteins are considered to be a hallmark for autophagy and are widely used for monitoring this process (Mizushima & Yoshimori, 2007). Sequestosome 1 (SQSTM1), or p62 protein, is a cargo receptor that is subjected to autophagic clearance via autophagosome degradation (Pankiv *et al.*, 2007; Myeku & Figueiredo-Pereira, 2011), and it is increased under inhibition of autophagy (Bjorkoy *et al.*, 2005; Yue, 2007). Therefore, the accumulation of p62 is commonly used as a marker to detect impairment or defects in autophagic activity (Bjorkoy *et al.*, 2005; Bjorkoy *et al.*, 2009). The comparative evaluation of LC3 and p62 accumulation is required to verify an autophagic response (Jeong & Park, 2015).

In this study, the expression of both LC3 isoforms did not show significant changes in any brain area of atypical scrapie animals when comparing to the control group. Thus, we need to assume that the amount of autophagosomes in atypical scrapie sheep is the same as that in healthy animals, which implies autophagosomes are forming and degrading in the lysosomes with the same effectiveness as that in the control group and their levels in the disease remain stable. It has been proposed that the retrograde transport of autophagosomes and their maturation to lysosomes may be impaired in

Alzheimer's disease, which results in a massive accumulation of these vesicles within degenerating neurites (Nixon, 2007; Boland *et al.*, 2008). This is not likely to be occurring in our situation, since atypical scrapie animals seem to display similar levels of autophagosomes to those observed in the control group, suggesting that clearance of autophagosomes is not defective in this disease.

p62 protein was significantly overexpressed in Fc, Bg, Bgc, Tc and Cbl of atypical scrapie affected animals and their immunostaining scores positively correlated with all neuropathological features, whereas it showed no changes in T, P and Mo. In this clinical form of the disease, the cerebral and cerebellar cortex are the most prion-affected areas, and the neuropathological lesions at the level of the brainstem are less intense than those observed in classical scrapie cases (Benestad *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2008). The increase of p62 was also predominant in highly-affected areas of classical scrapie sheep, although this protein did not correlate with prion deposition but with spongiform degeneration. A similar upregulation of p62 was recently described in neuron cells treated with PrP90-231, suggesting that the peptide stimulates autophagy but leads progressively to the accumulation of autophagolysosomes with impaired degradative capacity (Thellung *et al.*, 2018). In contrast, they also described an upregulation for LC3-II due to the increase of autophagic vacuoles. This discrepancy may indicate that the pathogenic mechanism underlying dysfunctional autophagy in the experiments is different, probably due to the experimental models employed.

Accumulation of p62 in all highly-affected brain areas would indicate that autophagic activity is deteriorated in the CNS of atypical scrapie, which suggests that, even with the same levels of autophagosomes as the control group, those of the healthy ones are more functional and effective than those of scrapie animals, since they can successfully ameliorate p62 levels. If this scenario is correct, autophagosomes with damaged resolution ability would contribute to prion accumulation and neurotoxicity in these brain areas. Autophagy dysfunction could be consequence of either prion toxicity, or the conversion of PrP^c into PrP^{Sc}, as deficiency of PrP^c contributes to autophagic neuronal cell death via impaired autophagic flux (Shin *et al.*, 2014). On the other hand, those areas with a lower degree of lesion, i.e. T, P and Mo, did not show differences of neither p62 nor LC3 expression levels compared to the control group, suggesting either the autophagosomes of these areas work in a manner as efficient as those of the healthy

animals, which could even lead to the degradation of the PrP^{Sc}, or the autophagic machinery has not been perturbed or overwhelmed since little prion toxicity affects these areas. Accordingly, the amount of p62 was lower in T and Mo in atypical scrapie compared to the classical form, and LC3-A was decreased in P, indicating that the degradative autophagic mechanism in these areas is more efficient in the atypical disorder. A primary defect in the ability of autophagosomes to recognize cytosolic cargo was identified in cellular and mouse models of Huntington's disease (Martinez-Vicente *et al.*, 2010). Autophagosomes formed at normal rates and were adequately eliminated by lysosomes, but they failed to efficiently trap cytosolic cargo in their lumen, leading to the accumulation of the mutant huntingtin protein in cells, which resembles our specific scenario. The inefficient engulfment of PrP^{Sc} by non-functional autophagosomes could be responsible for the accumulation of this protein in highly-affected CNS areas in atypical scrapie.

Overexpression of LC3-A and p62 proteins in almost all Purkinje cells in classical scrapie, suggested an activation of autophagy as a defence mechanism against neurodegeneration, since these cells are minimally affected in this scrapie form. Interestingly, we detected a discernible absence of ATG5, LC3-B and LC3-A staining in a great amount of apparently degenerating Purkinje cells of Cbl from atypical scrapie sheep, while healthy cells in the same tissue remained stained. Moreover, we could not appreciate staining differences of p62 in Purkinje cells, which displayed similar p62 staining levels whether or not they were damaged, and a significant overexpression compared to healthy animals. Overexpression of p62 in damaged cells, but not LC3 or ATG5, suggests that autophagy may be perturbed during the neurodegenerative process, which could lead to the pathological phenotype in these cells. Indeed, when comparing immunostaining scores of both diseases we observed a LC3-A downregulation and p62 upregulation in Purkinje cells of atypical scrapie sheep, which suggests that autophagic machinery is in worse functional condition in the atypical form in this brain area. This finding implies that Purkinje cells in atypical scrapie do not display a neuroprotective mechanism based on autophagy induction and they are also susceptible to neurotoxicity. PrP^{Sc} deposits were not detected in Purkinje cells, although they showed robust spongiform changes. So far, intraneuronal staining pattern of PrP^{Sc} has not been described in atypical scrapie (Benestad *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2008), which implies that neurotoxicity in this disease may be triggered by mechanisms yet to be discovered.

Our results suggest that autophagy dysfunction certainly does occur in both classical and atypical scrapie. By comparing both clinical forms, we have demonstrated that autophagy malfunction is a prominent feature of highly-affected brain areas, suggesting that this process is involved in prion-induced toxicity. It is very likely that autophagy may be implicated in TSEs neuropathology and, even though this process may be activated, there are substantial signs indicating an impairment or failure in the degradative event, which could contribute to the pathogenesis of the disease. In addition, although specific neuronal populations in classical scrapie such as cerebellar Purkinje cells have been proposed to display neuroprotective mechanisms against prion-related toxicity (Serrano *et al.*, 2011), we have demonstrated herein that these cells do not exhibit a general defensive mechanism, or at least such protective factor is strain-dependent. More research will be necessary to confirm the particular role of autophagy under prion infection, involving different animal models and clinical stages, which will improve understanding of pathogenic mechanisms of dysfunctional autophagy, and help develop therapeutic strategies for prion diseases.

Ethics approval: The Ethics Committee for Animal Experiments of the University of Zaragoza (Permit Number: PI13/10) approved all procedures. The care and use of experimental animals were performed in strict accordance with the national law (R.D. 53/2013).

REFERENCES

- Andreoletti, O., Orge, L., Benestad, S. L., Beringue, V., Litaise, C., Simon, S., . . . Lacroux, C. (2011). Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. *PLoS Pathog*, 7(2), e1001285. doi: 10.1371/journal.ppat.1001285
- Arsac, J. N., Andreoletti, O., Bilheude, J. M., Lacroux, C., Benestad, S. L., & Baron, T. (2007). Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway. *Emerg Infect Dis*, 13(1), 58-65. doi: 10.3201/eid1301.060393
- Barth, S., Glick, D., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol*, 221(2), 117-124. doi: 10.1002/path.2694
- 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.

- Benestad, S. L., Arzac, J. N., Goldmann, W., & Noremark, M. (2008). Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet Res*, *39*(4), 19. doi: 10.1051/vetres:2007056
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., . . . Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, *171*(4), 603-614. doi: 10.1083/jcb.200507002
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Overvatn, A., Brech, A., & Johansen, T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*, *452*, 181-197. doi: 10.1016/S0076-6879(08)03612-4
- Boellaard, J. W., Kao, M., Schlote, W., & Diringer, H. (1991). Neuronal autophagy in experimental scrapie. *Acta Neuropathol*, *82*(3), 225-228.
- Boland, B., Kumar, A., Lee, S., Platt, F. M., Wegiel, J., Yu, W. H., & Nixon, R. A. (2008). Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, *28*(27), 6926-6937. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0800-08.2008
- Buschmann, A., Biacabe, A. G., Ziegler, U., Bencsik, A., Madec, J. Y., Erhardt, G., . . . Groschup, M. H. (2004). Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J Virol Methods*, *117*(1), 27-36. doi: 10.1016/j.jviromet.2003.11.017
- Fan, X. Y., Tian, C., Wang, H., Xu, Y., Ren, K., Zhang, B. Y., . . . Dong, X. P. (2015). Activation of the AMPK-ULK1 pathway plays an important role in autophagy during prion infection. *Sci Rep*, *5*, 14728. doi: 10.1038/srep14728
- 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
- Jeong, J. K., & Park, S. Y. (2015). Neuroprotective effect of cellular prion protein (PrPC) is related with activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor (alpha7nAChR)-mediated autophagy flux. *Oncotarget*, *6*(28), 24660-24674. doi: 10.18632/oncotarget.4953
- 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., Beringue, V., Andreoletti, O., Reine, F., Lai, T. L., Baron, T., . . . Laude, H. (2005). A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(44), 16031-16036. doi: 10.1073/pnas.0502296102

- 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., Gajos, A., & Bogucki, A. (2017). Robust autophagy in optic nerves of experimental Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Folia Neuropathol*, *55*(4), 289-294. doi: 10.5114/fn.2017.72386
- Llorens, F., Thune, K., Sikorska, B., Schmitz, M., Tahir, W., Fernandez-Borges, N., . . . Zerr, I. (2017). Altered Ca(2+) homeostasis induces Calpain-Cathepsin axis activation in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol Commun*, *5*(1), 35. doi: 10.1186/s40478-017-0431-y
- Mann, S. S., & Hammarback, J. A. (1994). Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J Biol Chem*, *269*(15), 11492-11497.
- Marín, B., Bolea, R., Garza, M. C., Hedman, C., Vidal, E., Barrio, T., . . . Monleon, E. (2018). *Study of the presence of infectivity in placenta from experimental Atypical scrapie infected sheep*. Paper presented at the PRION 2018, Santiago de Compostela.
- Martinez-Vicente, M., Tallozy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., . . . Cuervo, A. M. (2010). Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci*, *13*(5), 567-576. doi: 10.1038/nn.2528
- Mizushima, N., & Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, *3*(6), 542-545.
- Mok, S. W., Riemer, C., Madela, K., Hsu, D. K., Liu, F. T., Gultner, S., . . . 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
- Moon, J. H., Lee, J. H., Nazim, U. M., Lee, Y. J., Seol, J. W., Eo, S. K., . . . 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
- Moore, S. J., Simmons, M., Chaplin, M., & Spiropoulos, J. (2008). Neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in naturally occurring atypical scrapie cases in Great Britain. *Acta Neuropathol*, *116*(5), 547-559. doi: 10.1007/s00401-008-0433-8
- Myeku, N., & Figueiredo-Pereira, M. E. (2011). Dynamics of the degradation of ubiquitinated proteins by proteasomes and autophagy: association with sequestosome 1/p62. *J Biol Chem*, *286*(25), 22426-22440. doi: 10.1074/jbc.M110.149252
- Nentwig, A., Oevermann, A., Heim, D., Botteron, C., Zellweger, K., Drogemuller, C., . . . Seuberlich, T. (2007). Diversity in neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in atypical scrapie. *PLoS Pathog*, *3*(6), e82. doi: 10.1371/journal.ppat.0030082

- Nixon, R. A. (2007). Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci*, 120(Pt 23), 4081-4091. doi: 10.1242/jcs.019265
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., . . . Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, 282(33), 24131-24145. doi: 10.1074/jbc.M702824200
- Pattison, I. H., & Jones, K. M. (1967). The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *Vet Rec*, 80(1), 2-9.
- Romanov, J., Walczak, M., Ibiricu, I., Schuchner, S., Ogris, E., Kraft, C., & Martens, S. (2012). Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO J*, 31(22), 4304-4317. doi: 10.1038/emboj.2012.278
- Schatzl, H. M., Laszlo, L., Holtzman, D. M., Tatzelt, J., DeArmond, S. J., Weiner, R. I., . . . Prusiner, S. B. (1997). A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J Virol*, 71(11), 8821-8831.
- Serrano, C., Bolea, R., Lyahyai, J., Filali, H., Varona, L., Marcos-Carcavilla, A., . . . Martin-Burriel, I. (2011). Changes in HSP gene and protein expression in natural scrapie with brain damage. *Vet Res*, 42, 13. doi: 10.1186/1297-9716-42-13
- Shin, H. Y., Park, J. H., Carp, R. I., Choi, E. K., & Kim, Y. S. (2014). Deficiency of prion protein induces impaired autophagic flux in neurons. *Front Aging Neurosci*, 6, 207. doi: 10.3389/fnagi.2014.00207
- Simmons, M. M., Konold, T., Simmons, H. A., Spencer, Y. I., Lockey, R., Spiropoulos, J., . . . Clifford, D. (2007). Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. *BMC Vet Res*, 3, 20. doi: 10.1186/1746-6148-3-20
- Simmons, M. M., Konold, T., Thurston, L., Bellworthy, S. J., Chaplin, M. J., & Moore, S. J. (2010). The natural atypical scrapie phenotype is preserved on experimental transmission and sub-passage in PRNP homologous sheep. *BMC Vet Res*, 6, 14. doi: 10.1186/1746-6148-6-14
- Son, J. H., Shim, J. H., Kim, K. H., Ha, J. Y., & Han, J. Y. (2012). Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med*, 44(2), 89-98. doi: 10.3858/emm.2012.44.2.031
- Thellung, S., Scoti, B., Corsaro, A., Villa, V., Nizzari, M., Gagliani, M. C., . . . 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
- Wong, E., & Cuervo, A. M. (2010). Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*, 13(7), 805-811. doi: 10.1038/nn.2575

- Xu, Y., Tian, C., Wang, S. B., Xie, W. L., Guo, Y., Zhang, J., . . . Dong, X. P. (2012). 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 Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 45(6), 494-502. doi: 10.1093/abbs/gmt022
- Yue, Z. (2007). Regulation of neuronal autophagy in axon: implication of autophagy in axonal function and dysfunction/degeneration. *Autophagy*, 3(2), 139-141.

**Impairment of autophagy in scrapie-infected
transgenic mice at clinical stage**

Manuscrito preliminar

*Óscar López Pérez, Janne Markus Toivonen, Alicia Otero, Laura Salinas,
Miriam de la Torre, Pilar Zaragoza, Juan José Badiola, Rosario Osta,
Rosa Bolea, Inmaculada Martín Burriel*

Impairment of autophagy in scrapie-infected transgenic mice at clinical stage

ABSTRACT

Dysfunction of autophagy, a conserved eukaryotic pathway for the elimination of cellular stressors, seems to play a crucial role in the etiology or progress of many neurodegenerative diseases. However, the precise relationship, if any, of autophagy with prion neuropathology, or even the stages of the disease at which autophagy malfunction occurs, are still poorly understood. Using classical and atypical scrapie sheep models, we previously described a different regulation of autophagy depending of the brain area analysed and its neuropathological lesion levels. In the present work, we further investigate how this process is involved during the course of the disease in transgenic mice (Tg338) overexpressing the ovine VRQ prion protein allele, inoculated with mouse-adapted classical scrapie, in order to evaluate the use of this model to gain insight on the natural disease. Upregulation of p62 and downregulation of LC3-B protein and *Atg5*, *Fbxw7* and *Gas5* transcripts in some highly-affected brain areas of scrapie-infected Tg338 mice at clinical stage, but not at preclinical phase, suggests that disturbance of autophagic machinery seems to be part of the pathological process during the late stage of prion infection. Since cellular prion protein itself seems to play a role in modulating autophagic activity, by comparing the results between Tg338 mice inoculated with healthy brain material and uninfected wild-type mice, we have identified an upregulation of autophagy in specific areas related with PrP^c overexpression. Besides local dysregulation, our data argue that Tg338 mice may be considered a reliable *in vivo* model for studying prion infection and autophagy side by side.

INTRODUCTION

Prion diseases, also known as transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), are fatal infectious neurodegenerative disorders that affect both humans and animals (Prusiner, 1982). They include the various forms of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle, and scrapie in sheep and goats, which is one of the first identified TSE (Hadlow & Eklund, 1968). These diseases are caused by a unique agent produced by misfolding of the physiological cellular prion protein (PrP^c), which is converted into a protease-resistant isoform, named PrP “scrapie”

(PrP^{Sc}) (Prusiner, 1982). The misfolded protein accumulates into the central nervous system (CNS), which is believed to be the main pathogenic event responsible for the pathological changes produced in TSE patients, including spongiform degeneration, vacuolization, glial activation and neuronal loss (Wells & McGill, 1992; Wood *et al.*, 1997). Prion diseases share common neurodegenerative features with other protein misfolding diseases like Alzheimer's (AD), Huntington's (HD) and Parkinson's (PD) diseases (Bucciantini *et al.*, 2002; Soto, 2003). However, the underlying pathomolecular mechanisms of this heterogeneous group of diseases are only incompletely understood.

Autophagy is one of the most relevant protein homeostasis system, which is involved in the degradation of damaged organelles and altered proteins from the cell via the lysosomal pathway (Rubinsztein, 2006). In autophagy, a double-membraned vacuole called autophagosome engulfs the cytoplasmic cargo and eventually fuses with lysosomes to form autophagolysosomes, where the luminal content is digested by hydrolytic enzymes and recycled in the cytoplasm (Jahreiss *et al.*, 2008). Autophagic activity requires multiple proteins, such as MAP1-LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3), or LC3, which is converted from the free cytosolic form, LC3-I, to the autophagosome-bound membrane form, LC3-II, during autophagosome formation (Rubinsztein *et al.*, 2009). This protein is tightly associated to the autophagosomal membrane and is therefore considered a reliable marker of autophagy (Mizushima & Yoshimori, 2007). p62, also known as sequestosome 1 (SQSTM1), is an important cargo receptor located throughout the cell and involved in selective autophagy. p62 acts as a substrate during autophagic degradation binding ubiquitinated proteins and delivering cargoes to autophagy via the LC3-interacting region (LIR) (Myeku & Figueiredo-Pereira, 2011), which causes p62 to be specifically degraded by autophagy (Komatsu *et al.*, 2007). This protein accumulates when autophagy is inhibited, and decreased levels can be observed when autophagy is induced (Wang *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2007; Nakai *et al.*, 2007; Bjorkoy *et al.*, 2009). Consequently, the evaluation of p62 accumulation has become a useful assay to estimate defects in autophagic degradation (Bjorkoy *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2007; Mizushima & Yoshimori, 2007).

Originally defined as a type of programmed cell death, autophagy is implicated in a wide range of homeostatic, developmental and physiological events, mainly in the response to nutritional deprivation by recycling cytoplasmic material and promoting

survival cell (Kaur & Debnath, 2015). Conversely, dysfunction of the autophagic-lysosomal pathway has been associated with the progression of several pathologies, including neurodegenerative diseases, suggesting a crucial role in clearing neurons from misfolded protein aggregations (Levine & Kroemer, 2008). Indeed, there is substantial evidence that autophagy is dysregulated in pathologies like AD, HD, PD, and TSEs (Suzuki & Terry, 1967; Nixon *et al.*, 2005; Mok *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; Nixon, 2013), contributing to the accumulation of protein aggregates and neuronal death. Since drug-induced stimulation of autophagy flux has been shown to produce anti-prion effects (Gilch & Schatzl, 2003; Gilch *et al.*, 2008; Aguib *et al.*, 2009; Heiseke *et al.*, 2009; Krammer *et al.*, 2009; Forloni *et al.*, 2013; Bolognesi & Legname, 2015; Goold *et al.*, 2015; Halliday & Mallucci, 2015), autophagy is now emerging as a neuronal defensive response in controlling prion infection, facilitating clearance of aggregation-prone proteins and conferring a neuroprotective effect against prion-mediated neurotoxicity.

In induced scrapie, in the natural human prion disease, and in other experimental models of TSE, the presence of autophagic vacuoles is well demonstrated (Boellaard *et al.*, 1989; Boellaard *et al.*, 1991; Schatzl *et al.*, 1997; Liberski *et al.*, 2004; Sikorska *et al.*, 2004). Nevertheless, the precise relationship, if any, of autophagy with TSE neuropathology, or even the stages of the disease at which autophagy is active, are still poorly understood. Using sheep naturally affected with classical scrapie as a natural TSE animal model and sheep experimentally infected with atypical scrapie, we described a different regulation of autophagy depending on the brain area analysed. Whereas the downregulation of *ATG5* and *ATG9* transcripts in classical scrapie and the accumulation of p62, but not LC3, in highly-affected brain areas of both clinical forms suggested a dysfunction of the autophagy machinery, the upregulation of LC3 proteins and p62 in specific cell populations indicated that autophagy was still active in less lesioned areas.

Cellular prion protein seems to play a role in autophagy (Shin *et al.*, 2013). Although deficiency of PrP does not affect basal autophagy flux under normal culture conditions, *Prnp*^{-/-} neurons are more sensitive to oxidative stress due to impairment of autophagy (Oh *et al.*, 2012). *In vivo*, large deletions of *Prnp* gene in transgenic mice have neurodegenerative effects in Purkinje cells through accumulation of autophagosomes and autophagy degeneration (Heitz *et al.*, 2010). Transgenic mice used in studies of TSEs often overexpress transgenic PrP^C of the species under study (such as human or sheep) as

the appropriate wild-type PrP^c template is required to propagate *in vivo* the prion toxicity present in the PrP^{Sc} containing inoculate used for infection. Whether this PrP^c overexpression alone is sufficient to alter autophagic activity without PrP^{Sc} infection (i.e. using inoculate from healthy donor) has never been investigated.

Since very few research works have analysed autophagy in murine models, the aim of the present study was to validate Tg338 mice, which overexpress the ovine VRQ allele for the *PRNP* gene (Laude *et al.*, 2002), as a reliable model to mimic autophagy changes observed in the natural model and to be used in the future to test potential treatments based on regulation of autophagy. First, to determine possible similarities or differences between Tg338 and the natural model, we investigated autophagy regulation through the immunohistochemical determination of LC3-B and p62 in Tg338 mice infected with ovine scrapie and analysed the relationship between autophagy markers and scrapie-related lesions. Second, as the use of murine models may facilitate studies of disease-associated molecular mechanisms, we investigated the participation of selected mRNAs and non-coding RNAs involved in autophagy machinery in mesencephalon (Mes) and cervical spinal cord (SC) of Tg338 mice at different stages of the disease. Finally, to identify possible dysregulation of autophagy in Tg338 mice related with PrP^c overexpression, we compared autophagy levels of LC3-B and p62 between Tg338 controls inoculated with brain material from healthy donors and wild-type mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals and sample processing

Mouse bioassay was performed in Tg338 mice, a transgenic murine model that express in the brain the VRQ allele of the ovine *PRNP* gene at levels 8- to 10-fold higher than those detected in sheep brains (Laude *et al.*, 2002). All inocula were prepared manually in sterile saline as 10% brain homogenates and were cultivated in blood agar plates to test the absence of bacterial contamination. Intracerebral inoculations were performed under gaseous anesthesia using 50- μ l syringes and 25-gauge hypodermic needles inserted into the right parietal lobe, delivering 20 μ l of the brain homogenate to each animal. Two groups of 6 mice each of 49-53 days of age were inoculated using the same Tg338-adapted classical scrapie source. This inoculum was prepared as a pool of SC from clinically-infected Tg338 mice previously inoculated with CNS material from a

naturally-affected ARQ/ARQ sheep. One of these groups was inoculated with a delay of 55 days with respect to the first one, in order to study the brain accumulation and distribution of autophagy markers in the preclinical and clinical stages of the prion disease. Two other groups of 6 mice each were intracerebrally inoculated at equivalent times with an inoculum obtained from CNS of non-inoculated Tg338 mice. They were selected as age-matched controls for the preclinical and clinical groups of mice. To reduce post-inoculation pain, a subcutaneous injection of buprenorphine (0.3 mg/kg) was administered to each mouse before recovery to consciousness. The experimental groups are listed in Table 1.

Table 1: Tg338 and wild-type mice used for the gene expression and protein distribution analysis of autophagy markers in the central nervous system. Table includes days at inoculation (Inoculation age), days post-inoculation (Survival time) and days at euthanasia (Age)

ID	Experimental group	Inoculum	Inoculation age	Survival time	Age
7110	Tg338 clinical scrapie	Tg338-adapted scrapie	49	158	207
8136	Tg338 clinical scrapie	Tg338-adapted scrapie	49	162	211
7389	Tg338 clinical scrapie	Tg338-adapted scrapie	49	191	240
8247	Tg338 clinical scrapie	Tg338-adapted scrapie	49	162	211
6141	Tg338 clinical scrapie	Tg338-adapted scrapie	49	191	240
8700	Tg338 clinical scrapie	Tg338-adapted scrapie	49	156	205
6766	Tg338 clinical control	Mock	49	191	240
7585	Tg338 clinical control	Mock	49	191	240
6946	Tg338 clinical control	Mock	49	191	240
7109	Tg338 clinical control	Mock	49	191	240
8343	Tg338 clinical control	Mock	49	191	240
7490	Tg338 clinical control	Mock	49	191	240
6500	Tg338 preclinical scrapie	Tg338-adapted scrapie	53	136	189
7239	Tg338 preclinical scrapie	Tg338-adapted scrapie	53	136	189
2519	Tg338 preclinical scrapie	Tg338-adapted scrapie	53	136	189
8702	Tg338 preclinical scrapie	Tg338-adapted scrapie	53	136	189
2942	Tg338 preclinical scrapie	Tg338-adapted scrapie	53	136	189
7234	Tg338 preclinical scrapie	Tg338-adapted scrapie	53	136	189
3214	Tg338 preclinical control	Mock	53	136	189
6931	Tg338 preclinical control	Mock	53	136	189
8642	Tg338 preclinical control	Mock	53	136	189
1625	Tg338 preclinical control	Mock	53	136	189
4024	Tg338 preclinical control	Mock	53	136	189
9893	Tg338 preclinical control	Mock	53	136	189
1566	Wild-type clinical control	-	-	-	234
1574	Wild-type clinical control	-	-	-	232
1576	Wild-type clinical control	-	-	-	232
1582	Wild-type clinical control	-	-	-	231
1583	Wild-type clinical control	-	-	-	231
1524	Wild-type preclinical control	-	-	-	186
1527	Wild-type preclinical control	-	-	-	186
1552	Wild-type preclinical control	-	-	-	185
1560	Wild-type preclinical control	-	-	-	181

After inoculation, mice were housed in filtered cages and their clinical status was monitored three times a week. Mice of the clinical group were culled when progression of the disease was evident, upon detection of clinical signs of terminal murine prion disease, i.e. blepharitis, severe locomotor disorders and poor body condition. Mice from the preclinical and control groups were euthanized when the last mouse from the clinical group succumbed to disease. After euthanasia, brains were harvested and divided sagittally. One hemisphere was immediately frozen in dry ice and conserved at -80°C and the other one was fixed by immersion in 10% formalin for up to 48 h. From each mouse a section of Mes and a caudal section of the brain, including SC, were preserved in RNAlater for gene expression study.

In addition, two groups of C57BL/6 x SJL wild-type mice were used as controls to determine the protein distribution of LC3-B and p62 in a model not overexpressing PrP^c. Animals were euthanized at equivalent times for the preclinical (n=4, aged ~184 days) or clinical (n=5, aged ~232 days) stages of the disease to serve as age-matched controls. Brain samples were collected and processed identically to that described for the brain samples from Tg338 mice.

Neuropathological evaluation

Tg338 brains fixed in formalin were embedded in paraffin wax, cut into 4- μ m-thick sections and mounted on glass slides for morphological evaluation using haematoxylin and eosin (HE). Analysis of PrP^{Sc} deposition was performed using the paraffin-embedded tissue (PET) blot method as described (Schulz-Schaeffer *et al.*, 2000). Briefly, paraffin-embedded sections (4 μ m) were collected onto nitrocellulose membranes (0.45- μ m pore size; Bio-Rad) and digested with 250 μ g/ml of proteinase K (PK) for 2 hours (h) at 56°C. Membrane-attached proteins were denatured with 3M guanidine thiocyanate (Sigma-Aldrich) and PrP^{Sc} was detected using Sha31 mouse monoclonal antibody (1:8000 dilution for 1 h; SPI-Bio). Sections were then incubated with an alkaline phosphatase-coupled goat anti-mouse antibody (1:500 dilution for 1 h; Dako) and enzymatic activity was visualized using NBT/BCIP chromogen (Sigma-Aldrich).

Immunohistochemical analysis of autophagy markers

Paraffin-embedded CNS tissue sections from Tg338 and wild-type mice were studied by immunohistochemistry (IHC) to evaluate the brain expression and distribution of LC3-B and p62 autophagy-related proteins. After deparaffination and rehydration, sections were pre-treated by heat-induced epitope retrieval for 20 minutes (min) at 96°C in a PTLINK (Dako), using Tris EDTA buffer (pH 9.0). Endogenous peroxidase activity was then blocked and samples were incubated for 1 h at room temperature (RT) with primary antibodies: mouse monoclonal anti MAP-LC3 β (1:200 dilution; G-2, sc-271625; Santa Cruz Biotechnology) or rabbit polyclonal anti p62 (1:200 dilution; PW9860; Enzo Life Sciences). Omission of the primary antibody served as a background control for nonspecific binding of the secondary antibody. Subsequently, the enzyme-conjugated polymer EnVision (Dako EnVision anti-mouse for MAP-LC3 β ; Dako EnVision anti-rabbit for p62) was used as the visualization system followed by an incubation with diaminobenzidine (DAB) chromogen (Dako).

Gene expression quantification

Six genes, described to be involved in autophagy machinery, were selected for the analysis of their expression profile in Mes and SC of Tg338 mice: *Atg5* (autophagy-related 5), *Lc3* (microtubule-associated light chain 3), *E2f1* (E2F transcription factor 1), *Fbxw7* (F-box and WD repeat domain-containing 7), *p62* (sequestosome 1) and *Gas5* (growth arrest-specific 5). Table 2 shows TaqMan assays (Thermo Fisher Scientific) used for the amplification of the genes of interest. Total RNA was isolated from RNA later-conserved Mes and SC, using the Direct-Zol™ RNA kit (Zymo Research). Retrotranscription was performed from 200 ng of total RNA using qScript™ cDNA Supermix (Quanta Biosciences™), according to the manufacturer's instructions. Resulting complementary DNA (cDNA) was diluted 1:5 in water, and gene expression was quantified by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) using the TaqMan universal PCR master mix assays (Thermo Fisher Scientific) in a StepOne Plus (Applied Biosystems). All reactions were run in triplicate and universal amplification conditions were used. Expression levels of autophagy-related genes were normalized with *Sdha* housekeeping gene (Table 2).

Table 2: Thermo Fisher Scientific assays for the amplification of candidate genes. “Assay name” is as described by the provider of the assays (Thermo Fisher Scientific). “Gene detected” depicts the symbol of the gene analysed

Assay name	Gene detected
Mm01187303_m1	<i>Atg5</i>
Mm00458724_m1	<i>Lc3</i>
Mm00432939_m1	<i>E2f1</i>
Mm00504452_m1	<i>Fbxw7</i>
Mm00448091_m1	<i>p62</i>
Mm00657322_m1	<i>Gas5</i>
Mm01352366_m1	<i>Sdha</i>

Data analysis

Histopathological lesions (i.e. spongiform changes), and LC3-B and p62 immunolabelling, were evaluated in each brain section under a Zeiss Axioskop 40 optical microscope, whereas the intensity and distribution of PrP^{Sc} deposition were analysed with a Zeiss Stemi DV4 stereomicroscope. A semi-quantitative approach was used to obtain comparable data from the different lesions and protein markers in a total of 9 different brain regions described by Fraser and Dickinson (Fraser & Dickinson, 1968): frontal cortex (Fc), septal area (Sa), thalamic cortex (Tc), hippocampus (Hc), thalamus (T), hypothalamus (Ht), mesencephalon (Mes), cerebellum (Cbl), and medulla oblongata (Mo). Each area was investigated globally as a region for the scoring, except for Cbl, whose layers were analysed separately, including molecular layer (MI), Purkinje layer (PI), granular layer (GI), white matter (Wm) and deep cerebellar nuclei (DCN), in order to obtain a more detailed description. Brain regions studied were scored blindly and separately for the degree of spongiosis, PrP^{Sc} deposition and autophagy proteins on a scale ranging from 0 (absence of spongiosis or immunolabelling) to 5 (maximum intensity of neuropathological lesions or immunolabelling).

Significant differences of spongiform changes, PrP^{Sc} deposition profiles and LC3-B and p62 protein distribution between the experimental mouse groups were evaluated using the non-parametric Mann Whitney U test. Relative gene expression quantification was determined using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and results were analysed with the Student's *t*-test. Previously, normal distribution of data was confirmed using the Shapiro-Wilk test. Correlations between autophagy proteins immunostaining and histopathological lesions were determined using the non-parametric Spearman's rank correlation coefficient (ρ),

ρ). We used IBM® SPSS® statistics 22 software for all data analysis, and GraphPad Prism version 6.0 to perform the graphs. In all tests, the results were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Detection of clinical signs of terminal murine prion disease in Tg338 mice inoculated with ovine scrapie

The mouse-adapted classical scrapie inoculum used in the present study transmitted with 100% attack rate in the group of Tg338 mice intended for autophagy evaluation in the clinical stage of the disease (clinical group). These mice were euthanized with terminal clinical signs compatible with TSE at 170 ± 7 days post-inoculation (dpi) and aged 219 ± 7 days (Table 1). Early clinical signs included mild dorsal kyphosis, tail rigidity and poor hair coat. Subsequently, mice developed clinical signs of terminal disease including severe ataxia, blepharitis, weight loss and hunched stance. In contrast, mice inoculated with a delay of 55 days were euthanized at 136 dpi without showing clinical signs (preclinical group). Similarly, control mice inoculated with healthy Tg338 brain material and euthanized after 136 (age-matched controls for preclinical mice) or 191 dpi (age-matched controls for clinical mice) did not display signs of disease.

Histopathological profiles and PrP^{Sc} deposition patterns in scrapie-inoculated Tg338 mice are similar to those described in classical scrapie sheep

Clinical Tg338 mice displayed consistent similarities in neuropathological lesion profiles and PrP^{Sc} deposition patterns in PET blots to those observed in classical scrapie sheep (Figure 1). All clinical mice showed a significant increment of spongiform changes in all brain areas evaluated compared to their control group, except for Cbl (Figure 1A). In these animals, the most severe spongiform lesions were observed in T, Ht, Mes and Mo, while lesions were moderate in Hc and cerebral cortex and minimal in Cbl. Preclinical and control groups displayed minimal spongiform lesion scores. In addition, clinically-affected mice also showed significant differences in T, Ht, Mes and Mo compared to the preclinical group. No significant changes were detected when comparing mice at preclinical stage to their age-matched control group, neither between control groups.

All Tg338 mice that had developed clinical signs were positive for PrP^{Sc} accumulation in the brain (see representative PET blot in Figure 1B). In this group of animals PrP^{Sc} deposition was especially remarkable in Mes, Ht and Mo. However, this latter brain area showed high variability in PrP^{Sc} deposition intensity between clinical animals, leading to a high deviation in the semi-quantitative scoring. Minimal presence of PrP^{Sc} deposition was detected in Fc, Sa, Ht, Mes and Cbl in mice at preclinical stage.

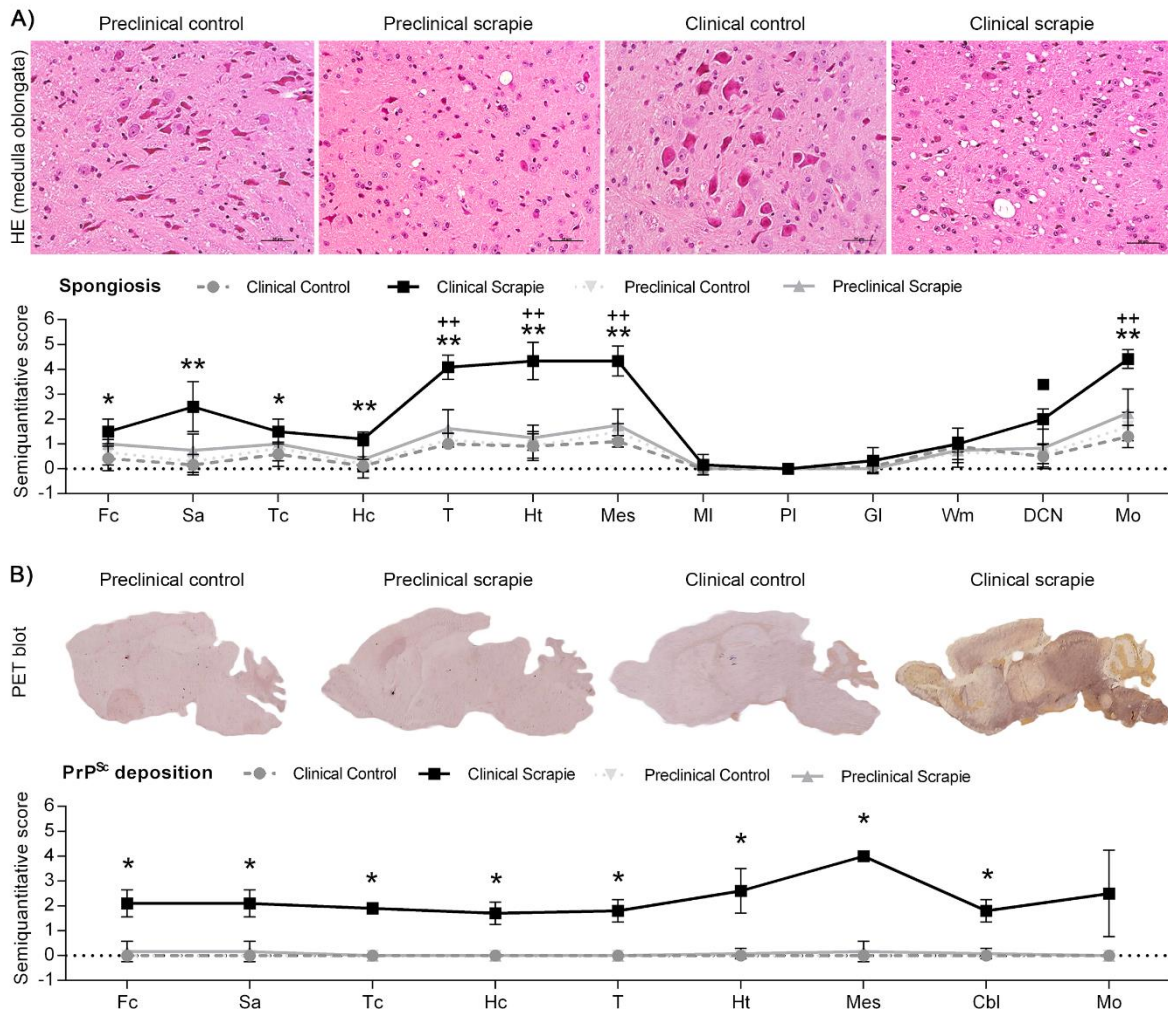


Figure 1: Spongiform changes (A) and PrP^{Sc} deposition (B) in different CNS areas of Tg338 scrapie-infected mice. Figure shows representative images of haematoxylin and eosin staining in medulla oblongata (50 μ m) (A), and PET blot method in sagittally divided brain (B). Graphics show the semi-quantitative assessment values of these lesions in frontal cortex (Fc), septal area (Sa), thalamic cortex (Tc), hippocampus (Hc), thalamus (T), hypothalamus (Ht), mesencephalon (Mes), cerebellum (Cbl) [which includes molecular layer (MI), Purkinje layer (PI), granular layer (GI), white matter (Wm) and deep cerebellar nuclei (DCN)], and medulla oblongata (Mo). Scores range from 0 (negative) to 5 (lesion/staining present at maximum intensity). Significant differences were determined using the Mann Whitney U test (\blacksquare P<0.1, *P<0.05 and **P<0.01 when comparing the clinical group with their control group, and ++P<0.01 when comparing to the preclinical group).

LC3-B protein is downregulated and p62 is upregulated in some highly-affected brain areas of scrapie-infected Tg338 mice at clinical stage

Immunohistochemical determination of LC3-B and p62 in Tg338 mice revealed differential regulation of autophagic activity in mice inoculated with ovine scrapie. Clinical infected mice obtained the lowest scores for LC3-B in all CNS areas analysed (Figure 2A), being this downregulation statistically significant in T ($P=0.047$), Ht ($P=0.028$), Mes ($P=0.028$), Pl ($P=0.015$) and Mo ($P=0.023$) comparing to their controls (Figure 2B). Moreover, the three first areas forenamed and DCN also showed a significant decrease ($P=0.038$, 0.033 , 0.023 and 0.028 , respectively) in clinical animals with respect to scrapie inoculated mice at preclinical stage of the disease (Figure 2B). Preclinical scrapie mice displayed similar LC3-B scores than their age-matched controls (data not shown). In preclinical mice and the clinical control group, LC3-B immunohistochemical pattern was characterised by an intense and uniform intraneuronal immunolabelling affecting numerous cells, and by an abundant punctiform diffuse staining in the neuropil. However, the clinical mice group displayed a lower number of immunopositive cells and a slight neuropil immunolabelling (Figure 2C).

In contrast to LC3-B, p62 immunostaining was clearly stronger in brains from clinically-affected Tg338 mice (Figure 3A). These animals showed the highest accumulation of this protein in all CNS areas analysed, this increment being statistically significant in Ht ($P=0.019$), MI ($P=0.019$) and Pl ($P=0.038$) when comparing to the preclinical mice, and in Ht ($P=0.045$) when comparing to their control group (Figure 3B). In addition, a tendency to upregulation was detected in Tc, Pl and Wm in clinical mice with respect to the control group. As aforementioned for LC3-B, no significant differences were detected between preclinical mice and their control group, neither between control groups (data not shown). Both neuronal and glial cells displayed a strong intracellular p62 immunolabelling in the clinical scrapie group, which also presented a remarkable granular staining of the neuropil. Although presenting the same pattern, both the number of stained cells and the intensity of immunolabelling were lower in the preclinical and the control group (Figure 3C).

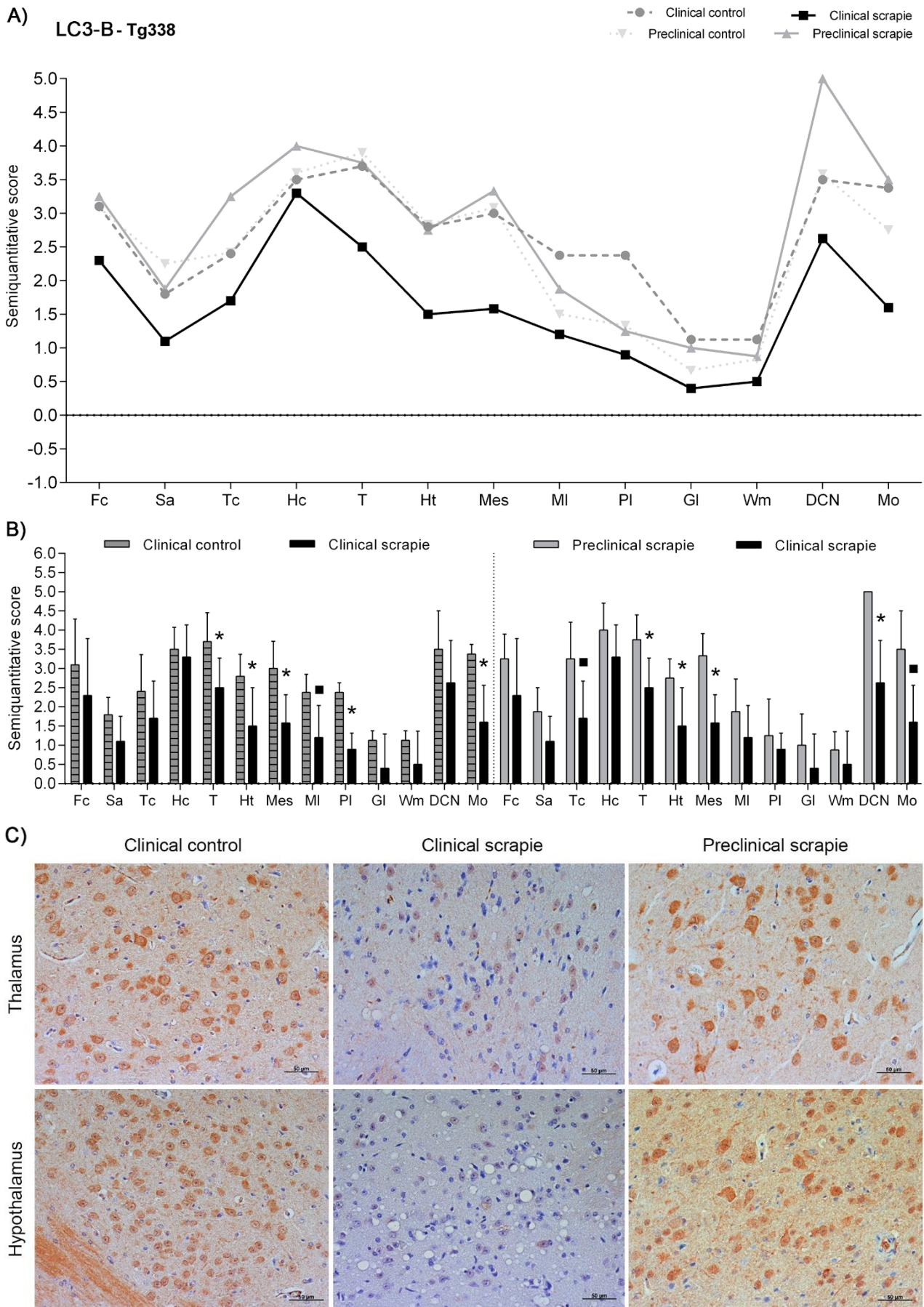


Figure 2 (Figure continues on next page).

(Continued from previous page).

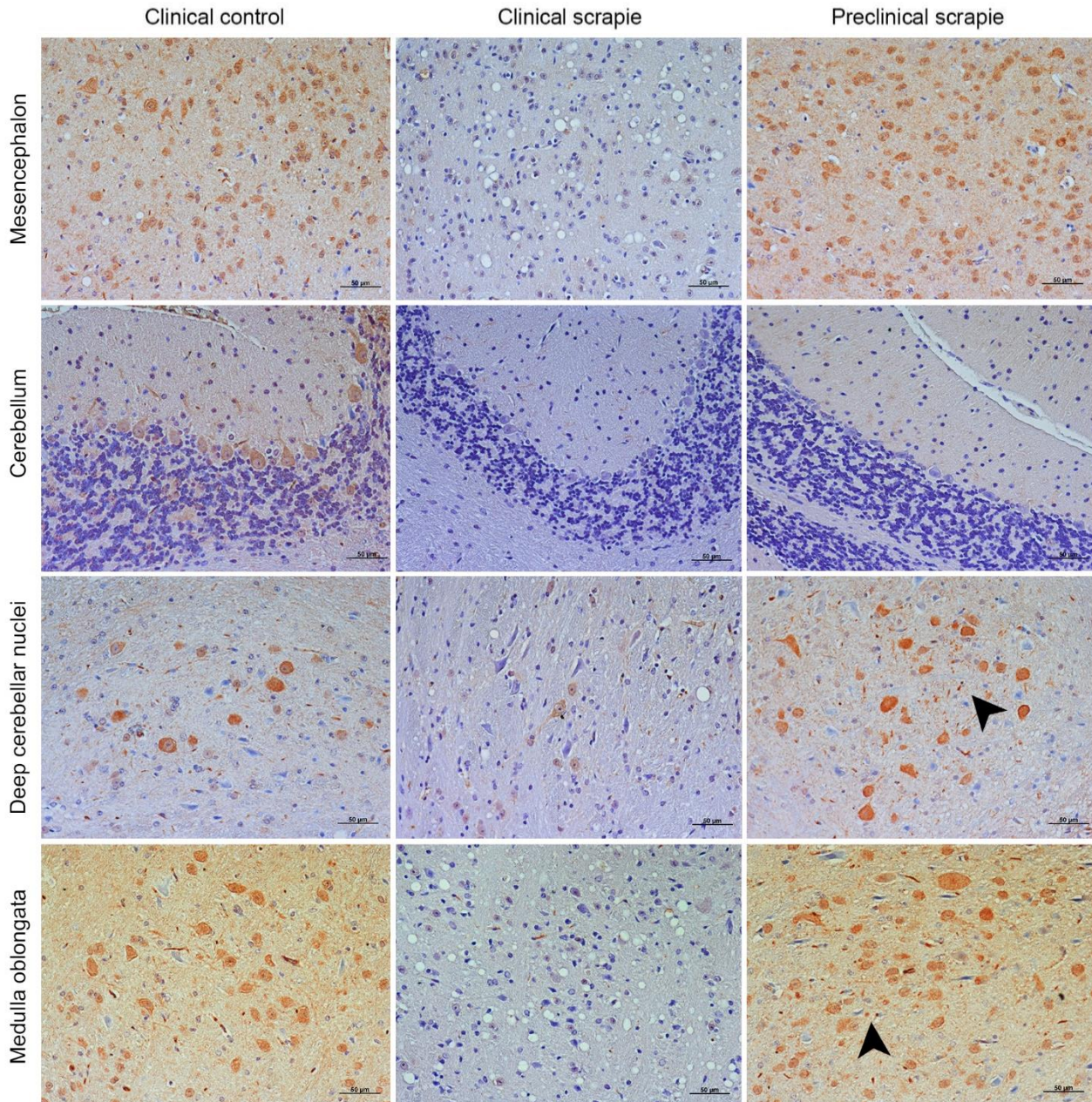


Figure 2: Semi-quantitative scoring and immunostaining patterns of LC3-B in the CNS of Tg338 scrapie-infected mice. Figure shows a global graph (A), comparative graphs of clinical group (black bars) with preclinical (grey bars) and control group (grey striped bars) (B), and representative pictures of LC3-B immunostaining (C). Comparative graphs between preclinical and their control group, and between control groups, are not shown because no significant differences were detected. Clinical scrapie-infected mice displayed a lower number of immunopositive cells and a slight neuropil immunolabelling in thalamus, hypothalamus and mesencephalon compared to the preclinical mice and control groups. In cerebellum, only a significant downregulation of LC3-B was observed in Purkinje layer in clinical mice when comparing with their control group, and in the deep cerebellar nuclei when comparing to the preclinical group. In medulla oblongata LC3-B was significantly decreased in clinical mice compared to their control group, but also a tendency to downregulation was observed with respect to the preclinical scrapie mice. Notice the abundant punctiform staining in the neuropil in deep cerebellar nuclei and medulla oblongata (arrowheads) (50 μ m). Score values (from 0: negative, to 5: staining present at its maximum intensity) evaluated in frontal cortex (Fc), septal area (Sa), thalamic cortex (Tc), hippocampus (Hc), thalamus (T), hypothalamus (Ht), mesencephalon (Mes), cerebellum (Cbl) [which includes molecular layer (Ml), Purkinje layer (Pl), granular layer (Gl), white matter (Wm) and deep cerebellar nuclei (DCN)], and medulla oblongata (Mo). The differences between the experimental groups were determined using the Mann Whitney U test (\blacksquare P<0.1 and *P<0.05).

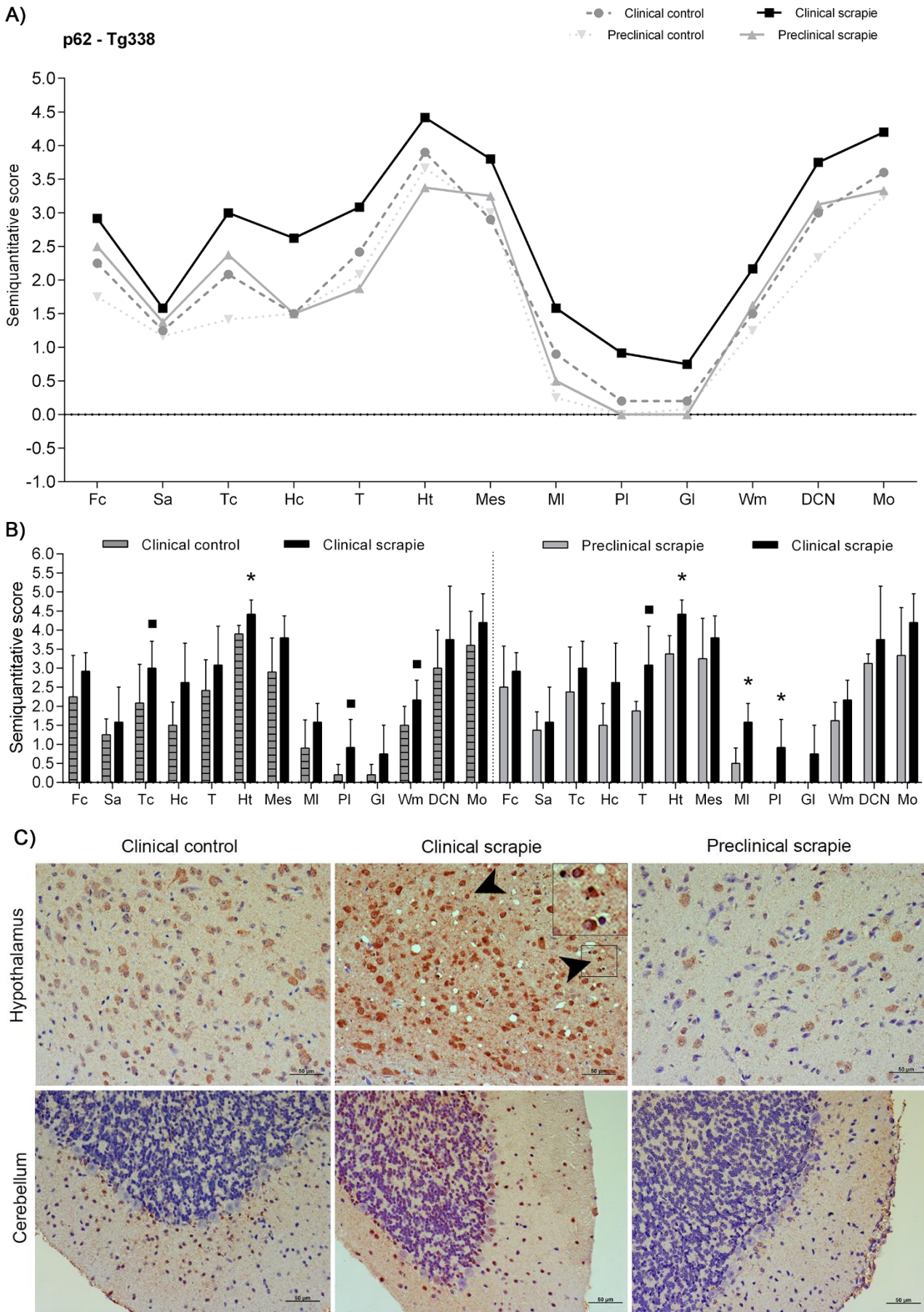


Figure 3 (See legend on next page).

(See figure on previous page).

Figure 3: Semi-quantitative scoring and immunostaining patterns of p62 in the CNS of Tg338 scrapie-infected mice. Figure shows a global graph (A), comparative graphs of clinical group (black bars) with preclinical (grey bars) and control group (grey striped bars) (B), and representative pictures of p62 immunostaining (C). Comparative graphs between preclinical and their control group, and between control groups, are not shown because no significant differences were detected. p62 immunostaining was significantly stronger in hypothalamus in clinical mice compared to preclinical and control groups, and in molecular layer and Purkinje layer of cerebellum compared only to the preclinical group (C). Notice the glial cell immunolabelling (arrowheads and detail) (50 μ m). Score values (from 0: negative, to 5: staining present at its maximum intensity) evaluated in frontal cortex (Fc), septal area (Sa), thalamic cortex (Tc), hippocampus (Hc), thalamus (T), hypothalamus (Ht), mesencephalon (Mes), cerebellum (Cbl) [which includes molecular layer (MI), Purkinje layer (PI), granular layer (GI), white matter (Wm) and deep cerebellar nuclei (DCN)], and medulla oblongata (Mo). The differences between the experimental groups were determined using the Mann Whitney U test (\bullet P<0.1 and *P<0.05).

Dysregulation of LC3-B and p62 is associated to prion-related neuropathology

To identify the relationship between scrapie lesions and autophagy, Spearman ρ correlation was calculated between immunohistochemical and histopathological scores. Table 3 shows correlation values and their statistical significance. Surprisingly, although LC3-B expression decreased in clinical mice, LC3-B immunostaining scores displayed a slight but statistically significant positive correlation with spongiform lesions in the total set of animals ($\rho=0.242$, $P<0.001$). However, this correlation seemed to be related with the preclinical stage of the disease where correlations were significant in both the total set ($\rho=0.462$, $P<0.001$) and only when the scrapie inoculated animals were analysed ($\rho=0.4261$, $P=0.003$). There was no correlation between the scrapie lesions and LC3-B in the clinical stage of the disease. In contrast, p62 expression was strong and positively correlated with spongiform lesions in all groups of the individuals. This correlation suggests a relationship between the accumulation of p62 and the course of the disease and degree of spongiform lesion. Intensity of prion deposition determined by PET blot negatively correlated with LC3-B immunostaining in the total set of scrapie inoculated animals ($\rho=-0.473$, $P<0.001$) but not when the preclinical or clinical groups were separated. Similarly, p62 immunostaining positively correlated with prion deposition in the total set of scrapie animals ($\rho=0.300$, $P=0.009$) but not in the individual groups. These correlations confirm the decrease of LC3-B and increase of p62 in clinical animals but the observed distribution patterns do not seem to be related with the degree of PrP^{Sc} deposition.

Table 3: Spearman correlation values between autophagy markers (LC3-B and p62) and scrapie-related histopathological lesions (spongiform changes and PrP^{Sc} deposition) in the preclinical and clinical stage, in the total set of animals and only in scrapie inoculated mice. Correlations were estimated using the full set of data obtained in all tissues. N.S.: No statistically significant value (P<0.01 and ***P<0.001)**

	Preclinical stage		Clinical stage		Total set	Scrapie clinical + preclinical
	Control + Scrapie	Scrapie	Control + Scrapie	Scrapie		
LC3-B						
Spongiosis	0.4616***	0.426***	0.09 N.S.	0.271 N.S.	0.242***	0.180 N.S.
PrP^{Sc}	----	-0.203 N.S.	----	-0.054 N.S.	----	-0.473***
p62						
Spongiosis	0.720***	0.760***	0.682***	0.768***	0.700***	0.766***
PrP^{Sc}	----	-0.040 N.S.	----	0.2349 N.S.	----	0.300**

Differential distribution of LC3-B and p62 in control Tg338 and wild-type mice

In order to determine if the overexpression of PrP^c in control Tg338 mice inoculated with healthy brain material influenced autophagy regulation, the two autophagy markers were also evaluated by IHC in brains from wild-type mice and their profile was compared to that observed in Tg338 control mice. Distribution and intensity of LC3-B in wild-type mice and Tg338 control mice for the age corresponding to the preclinical stage were very similar in almost all CNS areas, except for Sa, Ht and Ml. These areas showed a significant upregulation of LC3-B in Tg338 mice (P=0.004) (Figure 4A-4B). Interestingly, the same was true in Sa and Ht at later age corresponding to the clinical stage (P=0.015 and 0.007, respectively). The patterns of LC3-B immunolabelling were slightly different between the brains of Tg338 animals and wild-type mice. In the latter, the immunopositive neurons were sparse and presented a moderate intracytoplasmic staining. Moreover, in wild-type mice the immunostaining in the neuropil was almost absent (Figure 4C).

Similarly, in almost all brain structures, the lowest average scores for p62 were displayed by wild-type groups, especially at age of ~184 days (Figure 5A). Tg338 control groups showed a significant upregulation of p62 in T and Mes at age of 189 days (P=0.028 and 0.004, respectively) and 240 days (P=0.023 for both areas) compared with age-matched wild-type animals (Figure 5B). The immunohistochemical patterns of p62 in wild-type mice were similar to those described for LC3-B (Figure 5C).

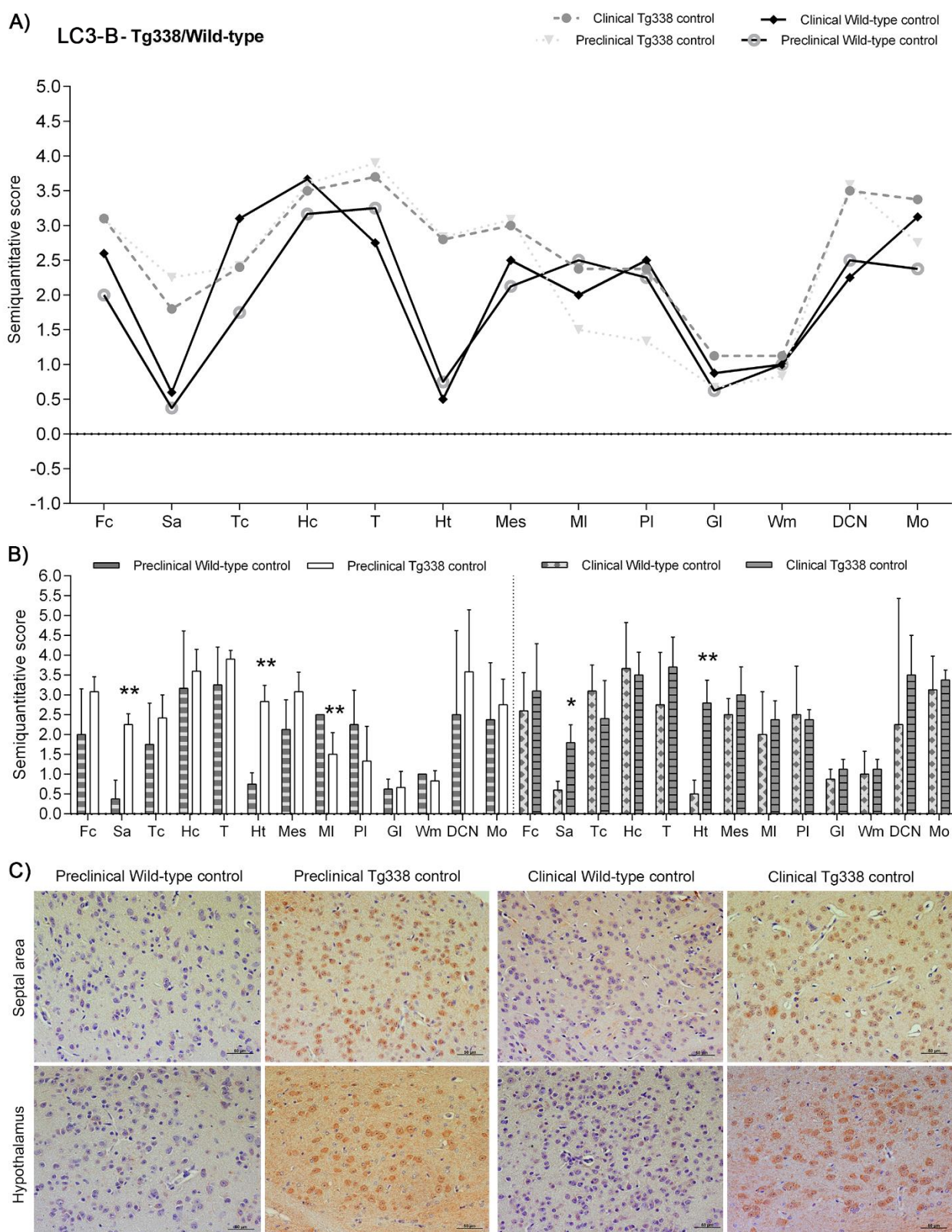


Figure 4: Semi-quantitative scoring and immunostaining patterns of LC3-B in the CNS of Tg338 and wild-type control mice. Figure shows a global graph (A), comparative graphs between Tg338 control mice (white bars for mice at age of 189 days, grey striped bars for mice at age of 240 days) with their age-matched wild-type mice (B), and representative pictures of LC3-B immunostaining (C). The immunopositive neurons were sparse and presented a mild intracytoplasmic staining in wild-type mice compared to Tg338 group. Moreover, the immunostaining in the neuropil was almost absent (C) (50 μ m). Score values (from 0: negative, to 5: staining present at its maximum intensity) evaluated in frontal cortex (Fc), septal area (Sa), thalamic cortex (Tc), hippocampus (Hc), thalamus (T), hypothalamus (Ht), mesencephalon (Mes), cerebellum (Cbl) [which includes molecular layer (MI), Purkinje layer (PI), granular layer (GI), white matter (Wm) and deep cerebellar nuclei (DCN)], and medulla oblongata (Mo). The differences between the experimental groups were determined using the Mann Whitney U test (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$).

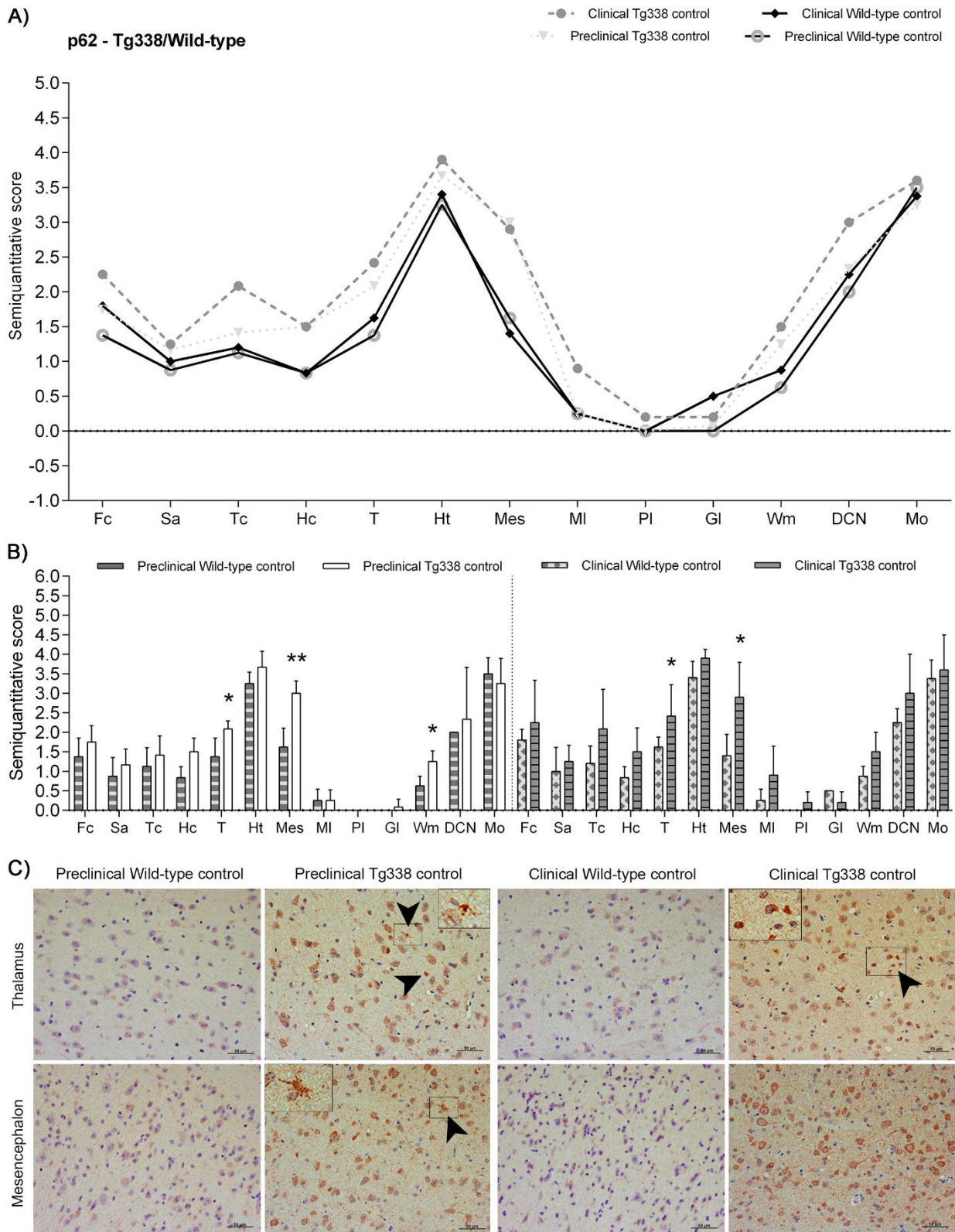


Figure 5: Semi-quantitative scoring and immunostaining patterns of p62 in the CNS of Tg338 and wild-type control mice. Figure shows a global graph (A), comparative graphs between Tg338 control mice (white bars for mice at age of 189 days, grey striped bars for mice at age of 240 days) with their age-matched wild-type mice (B), and representative pictures of p62 immunostaining (C). The immunopositive neurons were sparse and presented a mild intracytoplasmic staining in wild-type mice compared to Tg338 group. Moreover, the immunostaining in the neuropil was almost absent. Notice the intracellular immunolabelling displayed by glial cells in Tg338 mice (arrowheads and detail) (C) (50 μ m). Score values (from 0: negative, to 5: staining present at its maximum intensity) evaluated in frontal cortex (Fc), septal area (Sa), thalamic cortex (Tc), hippocampus (Hc), thalamus (T), hypothalamus (Ht), mesencephalon (Mes), cerebellum (Cbl) [which includes molecular layer (MI), Purkinje layer (PI), granular layer (GI), white matter (Wm) and deep cerebellar nuclei (DCN)], and medulla oblongata (Mo). The differences between the experimental groups were determined using the Mann Whitney U test (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$).

mRNA expression of *Gas5*, *Atg5* and *Fbxw7* is downregulated in some CNS areas of scrapie-infected Tg338 mice at clinical stage

Murine models may provide valuable tools for analysing the molecular mechanisms underlying the pathological processes in TSEs. In this work, transcripts from a selected group of genes encoding factors involved in autophagy were quantified in Mes and SC of the four Tg338 mouse groups. As shown in Figure 6A, *Gas5* displayed a significant downregulation ($P=0.03$) in Mes of the clinical group. In addition, a significant decrease of the expression of *Atg5* ($P=0.04$) and *Fbxw7* ($P=0.03$) was detected in SC of clinical mice, aside from a tendency to downregulation of *E2f1* ($P=0.08$) in the same animals (Figure 6B). Significant changes were not detected at preclinical stage of the disease.

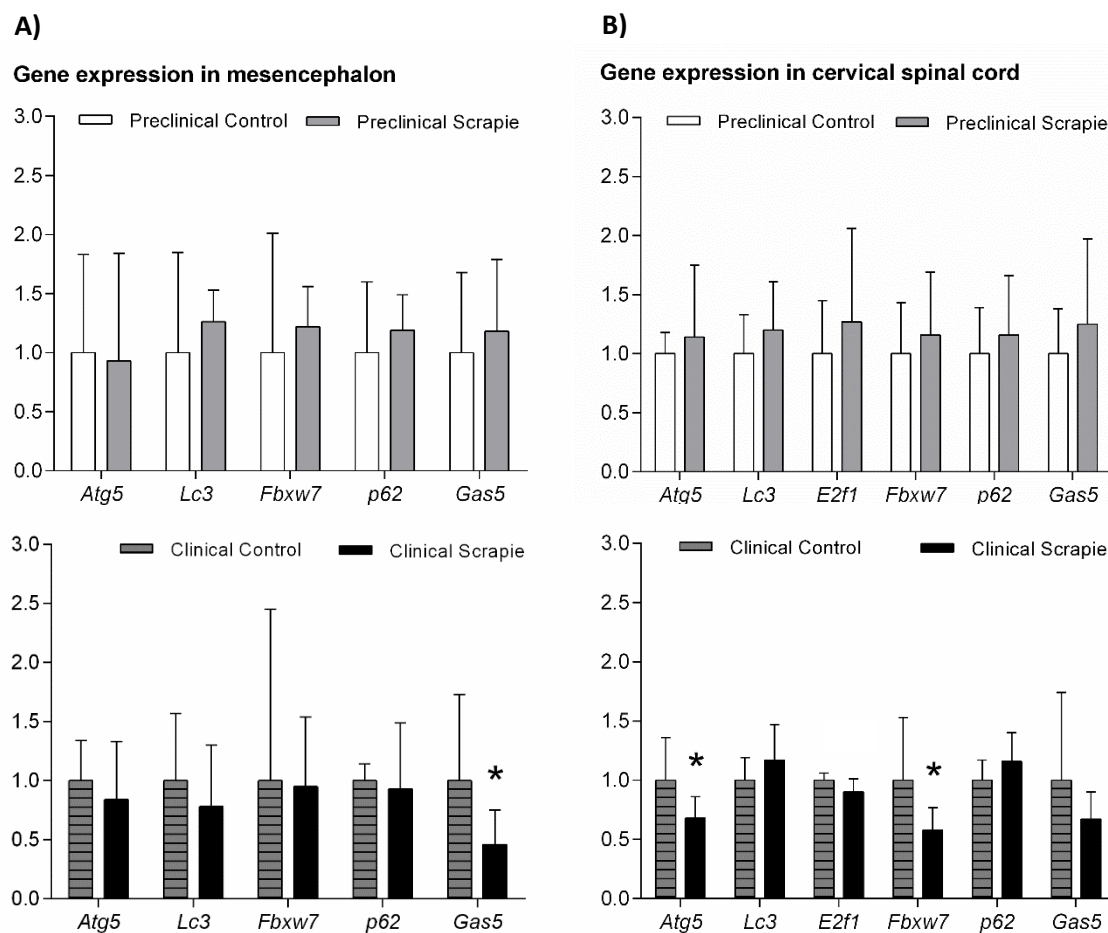


Figure 6: Gene expression profiles. mRNA expression profiles of *Atg5*, *Lc3*, *E2f1*, *Fbxw7*, *p62* and *Gas5*, in mesencephalon (A) and cervical spinal cord (B), in preclinical (above, grey bars) and clinical (below, black bars) Tg338 scrapie-infected mice. Relative expression levels are expressed as mean \pm standard deviation. Results were normalized using the expression of *Sdha* housekeeping gene. The expression values were determined using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method and results were analysed with the Student's *t*-test ($\bullet P < 0.1$ and $* P < 0.05$).

DISCUSSION

Prion diseases, a group of progressive and fatal neurodegenerative disorders of humans and animals, are characterized by the accumulation of misfolded and aggregated PrP^{Sc} in the CNS, resulting in spongiform degeneration. Autophagic vacuoles have been described in several models of TSEs (Boellaard *et al.*, 1989; Boellaard *et al.*, 1991; Schatzl *et al.*, 1997; Liberski *et al.*, 2004; Sikorska *et al.*, 2004), however, little is known about how this process is involved during the course of the disease. Consequently, the relationship between autophagy and prion-related pathology is still open to debate. In previous works, we investigated the dynamics of autophagy in the CNS of sheep naturally-affected with classical scrapie and sheep experimentally-infected with the atypical form of the disease. In these models, we described a possible malfunction of autophagy in some of the most highly-affected brain regions, whereas in other areas the autophagy machinery appeared to be intact, suggesting a combination of anti-prion and prion-promoting effects during the clinical stage of the disease. Murine models are widely used to perform *in vivo* assays and analyse the molecular mechanisms of the disease at different stages of the pathological process. In the present work, using a combination of immunohistochemical staining and real-time PCR quantification of markers involved in autophagy, we further investigated the role of this process in Tg338 mouse model that overexpresses the most sensitive allele (VRQ) to classical scrapie infection of the ovine *PRNP* gene (Laude *et al.*, 2002) in order to evaluate the use of this model to gain insight on the natural TSE.

It is well-established that the comparative analysis about LC3-B and p62 accumulation is necessary for the evaluation of autophagic activity (Niklaus *et al.*, 2017). Therefore, we decided to investigate the dynamics of autophagy during prion pathogenesis in Tg338 mice by estimating the expression levels of these proteins, currently the most widely used autophagy markers, by IHC. Immunostaining assays are equally efficient as Western blots to observe even slight changes of p62 aggregation. However, they can also provide additional information, such as the number, the size and the intracellular distribution of protein aggregates (Pircs *et al.*, 2012). Our findings show a significant downregulation of LC3-B in the most prion-affected areas (i.e. T, Ht, Mes and Mo) and in some cerebellar layers, such as Pl and DCN, in clinically-affected Tg338 mice. Conversely, p62 was upregulated in Ht and some cerebellar layers in clinical mice,

which suggests a disturbance of autophagy during prion infection. In addition, the apparent absence of detectable alterations in the studied markers in the preclinical group indicates that the dysregulation of autophagy mainly occurs during the last stage of the disease.

p62 has been described to be a common constituent of neuronal and glial inclusions in various neurodegenerative diseases, such as AD and PD (Kuusisto, Salminen, *et al.*, 2001; Zatloukal *et al.*, 2002; Kuusisto *et al.*, 2008). Moreover, it is induced as a response to the expression of mutant huntingtin (Nagaoka *et al.*, 2004). The presented study has revealed a significant increase in p62 staining in some brain regions of clinically-infected Tg338 mice, which also displayed immunolabelling of glial cells. In agreement, levels of p62 protein also increase in prion-infected cell cultures and in brains of scrapie 263K-infected hamsters and scrapie 22L-infected mice (Homma *et al.*, 2014). In contrast, in 22L-inoculated mice LC3-II protein was also upregulated, suggesting that activation of p62 could promote the clearance of PrP^{Sc} through the involvement of autophagic degradation. However, the interpretation of the results based on the detection of autophagy markers is not straightforward. Some studies have shown that inhibition of autophagy could also increase LC3-II levels, possibly caused by the blocking of autophagosome fusion with lysosomes, impeding the degradation of this protein (Mizushima *et al.*, 2010). Also, when autophagic flux is inhibited, p62 is accumulated (Tanida, 2011). In fact, Thellung *et al.* (Thellung *et al.*, 2018) recently described an upregulation of both LC3-II and p62 in neuron cells treated with amino-terminally truncated prion protein (PrP90-231), suggesting that this peptide stimulates autophagic flux but leads progressively to the accumulation of autophagolysosomes with impaired resolution ability. Here, we have described significant upregulation of p62 *in vivo*, but also downregulation of LC3-B, in some of the most prion-affected brain areas of clinically-affected mice. Consequently, at least in some brain areas of our experimental model, p62 increment does not seem to reflect an enhancement of autophagy activity but a disturbance of autophagic machinery, which would promote the progression of the disease during the terminal stages.

In contrast to the aforementioned data, a downregulation of p62 and conversion of LC3-I into LC3-II have been reported in the terminal stage of 263K-infected hamsters and in human genetic prion diseases, indicating enhanced autophagic activity (Xu *et al.*,

2012). Moreover, a recent study also suggested an activation of autophagy flux in human and mouse neuronal cells infected with human prion protein, reporting a downregulation of the amount of both LC3-II and p62 (Moon *et al.*, 2016). Such discrepancies may be related to the differences in the experimental model, diverse neuropathological profiles caused by different prion strains, or the brain regions studied (Homma *et al.*, 2014).

p62 also plays a role in the degradation of proteins through the ubiquitin-proteasome system (UPS) (Bjorkoy *et al.*, 2005), providing a key link between autophagy and the UPS (Bjorkoy *et al.*, 2006). The UPS and autophagy are compensatory mechanisms (Zheng *et al.*, 2009), and when the activity of the UPS is inhibited, the levels of ubiquitinated proteins and p62 are known to be increased (Kuusisto, Suuronen, *et al.*, 2001). Furthermore, in prion-infected mice there is an early impairment of the UPS, and polyubiquitinated aggregates progressively accumulate in brain areas affected by PrP^{Sc} deposition from the preclinical to the terminal stage of the disease (McKinnon *et al.*, 2016). Thus, the significant increment of p62 and downregulation of LC3-B levels observed in our clinical mice, but not in the preclinical group, likely reflects a disturbance of the autophagic activity during the last stages of the prion infection. This may represent a failure of autophagic proteolytic degradation to compensate the progressive impairment of the UPS (McKinnon *et al.*, 2016).

Surprisingly, we did not find any alterations in the levels of p62 in T nor Mes, two of the most highly-affected areas in Tg338 murine model. However, p62 was upregulated in these areas in healthy control Tg338 mice when compared to age-matched wild-type mice. Although the wild-type mice used were not inoculated with mock brain, this increment of p62 does not seem to be a short term response to the inoculation itself as it is maintained over time. It has been proposed that PrP^c expression may upregulate autophagic flux through the modulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7nAChR$), protecting neuron cells against truncated prion peptide (PrP106-126)-mediated neurotoxicity (Jeong & Park, 2015). In agreement, we observed an upregulation of both LC3-B and p62 in some brain areas in Tg338 control mice compared to wild-type mice, indicating an activation of autophagic activity. Thus, we suggest that in some CNS regions, the overexpression of the ovine *PRNP* transgene alone could affect the autophagic activity, which could explain the lack of significance of the aforementioned areas in scrapie-inoculated clinical mice.

In a previous study assessing the molecular mechanisms of autophagy, we reported a downregulation of some autophagy-related genes in the brains of sheep naturally infected with classical scrapie, an overexpression of p62 in all CNS areas and that of ATG5 in Mo attributable to a possible presence of non-functional autophagosomes. In minimally prion-affected areas, we also observed an upregulation of LC3. We described similar findings in the CNS of sheep experimentally infected with atypical scrapie, but slightly different depending on the area analysed. These data made suggest that the autophagic activity may be impaired during prion pathogenesis. The scrapie-inoculated Tg338 transgenic mice showed a lesion profile very similar to that observed in classical scrapie sheep, with a minimal effect on the Cbl and highest in T and brainstem. The presence of minimal spongiform lesions in the Tg338 control and preclinical mice could be related to the transgenic overexpression of PrP^c, as also described by Prusiner *et al.* (Westaway *et al.*, 1994). Besides the finding that the overexpression of ovine PrP^c in this transgenic model may affect the autophagic activity in some brain areas, our data generally argue that Tg338 mice mimic the natural sheep disease and could be a useful model for experimental studies of autophagy activity *in vivo*.

To complement the protein level studies, we further analysed the expression of autophagy-related genes in Tg338 mice infected with scrapie. Autophagy-related 5 (Atg5) has been characterized as a protein specifically required for the autophagic signalling pathway, promoting phagophore expansion and formation of the autophagosome (Romanov *et al.*, 2012). Neuron and liver-specific deletion of *Atg5* in mice causes accumulation of ubiquitinated proteins, damaged organelles, and autophagy-specific substrates such as p62 (Kuma *et al.*, 2017). In addition, low mRNA levels of *beclin-1* and *Atg5* were observed in scrapie-infected wild-type brain tissue, which suggested an impairment of autophagy although autophagosome formation was unchanged (Mok *et al.*, 2007). Here, we have described a downregulation of *Atg5* in SC of clinical-stage Tg338 mice, but not in the preclinical group, confirming the disruption of autophagy at least at the late stage of the disease. This also mimics the negative regulation of both *ATG5* and *ATG9* in T and Cbl, respectively, observed in clinically scrapie-infected sheep.

E2F transcription factor 1 (*E2f1*) is also an indispensable transcriptional regulator of the autophagy process (Polager & Ginsberg, 2009). It has been demonstrated that activation of E2f1 enhances autophagy by upregulating the expression of four autophagy-related genes (*Lc3*, *Atg1*, *Atg5* and *DRAM*) and, conversely, reduction of endogenous E2f1 expression inhibits autophagy (Polager *et al.*, 2008). F-box and WD repeat domain containing 7 (*Fbxw7*) is a cell cycle regulatory gene whose levels are increased in the persistent prion-infected cell line SMB-S15 and in the brains of scrapie-agent 263K-infected hamsters at the early stage of the disease, leading to degradation of mTOR and increased autophagy flux (Xu *et al.*, 2016). Although we did not find expression changes of *Fbxw7* in preclinically-affected mice, downregulation of this gene and close to significant downregulation of *E2f1* in SC of the clinical mice group supports the view that autophagy machinery seems to be impaired during the late stage of prion infection.

The long non-coding RNA growth arrest-specific 5 (*Gas5*) increases autophagy in NSCLC cells, and its depletion results in decreased autophagy (Zhang *et al.*, 2016). *Gas5* is also considered to be an apoptosis promoter, and disturbances in its expression have been reported in a range of animal pathological models (Pickard & Williams, 2015). Although further studies are needed to completely define the precise role of some of these regulatory factors in the specific conditions of prion infection, taken our findings together, the lower expression levels of *Atg5*, *Fbxw7* and *E2f1* in SC and *Gas5* in Mes in clinical scrapie mice would suggest that downregulation or disturbance of autophagy is part of the pathogenic process in the late stage of the disease.

To conclude, the specific role of autophagy in prion diseases is still controversial. However, there is good evidence that autophagic process seems to decrease in misfolded protein-mediated neurodegenerative diseases, as indicated by the lower mRNA levels of *beclin-1* and *Atg5* observed in prion-infected mice (Mok *et al.*, 2007), *beclin-1* reduction in AD (Pickford *et al.*, 2008), and defects in the ability of autophagy to recognize cytosolic cargo in HD (Martinez-Vicente *et al.*, 2010). Although further studies involving different strains and experimental models are needed to clarify the discrepancies previously discussed, the present data suggests that autophagy is part of the pathological process and could play an essential role in the pathogenesis of prion diseases. The downregulation of autophagy-related genes and dysregulation of both LC3-B and p62 proteins in clinical scrapie-infected mice observed here, suggest an impairment of the

autophagy pathway that seems to take place at the last stage of the prion infection, which would contribute to the accumulation of PrP^{Sc} and the development of the disease. Our data suggest that PrP^c itself seems to regulate the autophagy process (Shin *et al.*, 2013), which is important information and has to be taken into consideration when designing experimental studies of autophagy activity based on the use of similar transgenic models. Altogether, by comparing the results obtained in the Tg338 experimental model with those in wild-type mouse, we have demonstrated the suitability of this murine model in order to study the implication of autophagy in prion diseases.

Ethics statement: All experimental procedures performed in animals were approved by the Ethics Committee for Animal Experiments of the University of Zaragoza (Permit Number: PI40/15) and were carried out in compliance with the recommendations for the care and use of experimental animals established by Spanish law (R.D. 53/2013).

REFERENCES

- Aguib, Y., Heiseke, A., Gilch, S., Riemer, C., Baier, M., Schatzl, H. M., & Ertmer, A. (2009). Autophagy induction by trehalose counteracts cellular prion infection. *Autophagy*, 5(3), 361-369.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., . . . Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, 171(4), 603-614. doi: 10.1083/jcb.200507002
- Bjorkoy, G., Lamark, T., & Johansen, T. (2006). p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery. *Autophagy*, 2(2), 138-139.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Overvatn, A., Brech, A., & Johansen, T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*, 452, 181-197. doi: 10.1016/S0076-6879(08)03612-4
- Boellaard, J. W., Schlote, W., & Tateishi, J. (1989). Neuronal autophagy in experimental Creutzfeldt-Jakob's disease. *Acta Neuropathol*, 78(4), 410-418.
- Boellaard, J. W., Kao, M., Schlote, W., & Diringer, H. (1991). Neuronal autophagy in experimental scrapie. *Acta Neuropathol*, 82(3), 225-228.
- Bolognesi, M. L., & Legname, G. (2015). Approaches for discovering anti-prion compounds: lessons learned and challenges ahead. *Expert Opin Drug Discov*, 10(4), 389-397. doi: 10.1517/17460441.2015.1016498

- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., . . . Stefani, M. (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*, *416*(6880), 507-511. doi: 10.1038/416507a
- Forloni, G., Artuso, V., Roiter, I., Morbin, M., & Tagliavini, F. (2013). Therapy in prion diseases. *Curr Top Med Chem*, *13*(19), 2465-2476.
- 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.
- Gilch, S., & Schatzl, H. M. (2003). Promising developments bringing prion diseases closer to therapy and prophylaxis. *Trends Mol Med*, *9*(9), 367-369.
- Gilch, S., Krammer, C., & Schatzl, H. M. (2008). Targeting prion proteins in neurodegenerative disease. *Expert Opin Biol Ther*, *8*(7), 923-940. doi: 10.1517/14712598.8.7.923
- Goold, R., McKinnon, C., & Tabrizi, S. J. (2015). Prion degradation pathways: Potential for therapeutic intervention. *Mol Cell Neurosci*, *66*(Pt A), 12-20. doi: 10.1016/j.mcn.2014.12.009
- Hadlow, W. J., & Eklund, C. M. (1968). Scrapie--a virus-induced chronic encephalopathy of sheep. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, *44*, 281-306.
- Halliday, M., & Mallucci, G. R. (2015). Review: Modulating the unfolded protein response to prevent neurodegeneration and enhance memory. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *41*(4), 414-427. doi: 10.1111/nan.12211
- 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
- Heitz, S., Grant, N. J., Leschiera, R., Haerberle, A. M., Demais, V., Bombarde, G., & Bailly, Y. (2010). Autophagy and cell death of Purkinje cells overexpressing Doppel in Ngsk Prnp-deficient mice. *Brain Pathol*, *20*(1), 119-132. doi: 10.1111/j.1750-3639.2008.00245.x
- 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
- Jahreiss, L., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2008). The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic*, *9*(4), 574-587. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00701.x
- Jeong, J. K., & Park, S. Y. (2015). Neuroprotective effect of cellular prion protein (PrPC) is related with activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor (alpha7nAChR)-mediated autophagy flux. *Oncotarget*, *6*(28), 24660-24674. doi: 10.18632/oncotarget.4953
- Kaur, J., & Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *16*(8), 461-472. doi: 10.1038/nrm4024

- Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y. S., Ueno, T., Hara, T., . . . Tanaka, K. (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, *131*(6), 1149-1163. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.035
- Krammer, C., Vorberg, I., Schatzl, H. M., & Gilch, S. (2009). Therapy in prion diseases: from molecular and cellular biology to therapeutic targets. *Infect Disord Drug Targets*, *9*(1), 3-14.
- Kuma, A., Komatsu, M., & Mizushima, N. (2017). Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice. *Autophagy*, *13*(10), 1619-1628. doi: 10.1080/15548627.2017.1343770
- Kuusisto, E., Salminen, A., & Alafuzoff, I. (2001). Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies. *Neuroreport*, *12*(10), 2085-2090.
- Kuusisto, E., Suuronen, T., & Salminen, A. (2001). Ubiquitin-binding protein p62 expression is induced during apoptosis and proteasomal inhibition in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, *280*(1), 223-228. doi: 10.1006/bbrc.2000.4107
- Kuusisto, E., Kauppinen, T., & Alafuzoff, I. (2008). Use of p62/SQSTM1 antibodies for neuropathological diagnosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *34*(2), 169-180. doi: 10.1111/j.1365-2990.2007.00884.x
- Laude, H., Vilette, D., Le Dur, A., Archer, F., Soulier, S., Besnard, N., . . . Vilotte, J. L. (2002). New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives. *C R Biol*, *325*(1), 49-57.
- Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, *132*(1), 27-42. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018
- Li, L., Zhang, X., & Le, W. (2010). Autophagy dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis*, *7*(4), 265-271. doi: 10.1159/000276710
- 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
- Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., . . . Cuervo, A. M. (2010). Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci*, *13*(5), 567-576. doi: 10.1038/nn.2528
- McKinnon, C., Goold, R., Andre, R., Devoy, A., Ortega, Z., Moonga, J., . . . Tabrizi, S. J. (2016). Prion-mediated neurodegeneration is associated with early impairment of the ubiquitin-proteasome system. *Acta Neuropathol*, *131*(3), 411-425. doi: 10.1007/s00401-015-1508-y
- Mizushima, N., & Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, *3*(6), 542-545.

- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, *140*(3), 313-326. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.028
- Mok, S. W., Riemer, C., Madela, K., Hsu, D. K., Liu, F. T., Gultner, S., . . . 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
- Moon, J. H., Lee, J. H., Nazim, U. M., Lee, Y. J., Seol, J. W., Eo, S. K., . . . 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
- Myeku, N., & Figueiredo-Pereira, M. E. (2011). Dynamics of the degradation of ubiquitinated proteins by proteasomes and autophagy: association with sequestosome 1/p62. *J Biol Chem*, *286*(25), 22426-22440. doi: 10.1074/jbc.M110.149252
- Nagaoka, U., Kim, K., Jana, N. R., Doi, H., Maruyama, M., Mitsui, K., . . . Nukina, N. (2004). Increased expression of p62 in expanded polyglutamine-expressing cells and its association with polyglutamine inclusions. *J Neurochem*, *91*(1), 57-68. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02692.x
- Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., . . . Otsu, K. (2007). The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med*, *13*(5), 619-624. doi: 10.1038/nm1574
- Niklaus, M., Adams, O., Berezowska, S., Zlobec, I., Graber, F., Slotta-Huspenina, J., . . . 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
- Nixon, R. A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W. H., Peterhoff, C., Cataldo, A., & Cuervo, A. M. (2005). Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol*, *64*(2), 113-122.
- Nixon, R. A. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med*, *19*(8), 983-997. doi: 10.1038/nm.3232
- Oh, J. M., Choi, E. K., Carp, R. I., & Kim, Y. S. (2012). Oxidative stress impairs autophagic flux in prion protein-deficient hippocampal cells. *Autophagy*, *8*(10), 1448-1461. doi: 10.4161/auto.21164
- Pickard, M. R., & Williams, G. T. (2015). Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Tumour Suppressor GAS5 LncRNA. *Genes (Basel)*, *6*(3), 484-499. doi: 10.3390/genes6030484
- Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P. A., . . . Wyss-Coray, T. (2008). The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest*, *118*(6), 2190-2199. doi: 10.1172/JCI33585

- Pircs, K., Nagy, P., Varga, A., Venkei, Z., Erdi, B., Hegedus, K., & Juhasz, G. (2012). Advantages and limitations of different p62-based assays for estimating autophagic activity in *Drosophila*. *PLoS One*, *7*(8), e44214. doi: 10.1371/journal.pone.0044214
- Polager, S., Ofir, M., & Ginsberg, D. (2008). E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene*, *27*(35), 4860-4864. doi: 10.1038/onc.2008.117
- Polager, S., & Ginsberg, D. (2009). p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer*, *9*(10), 738-748. doi: 10.1038/nrc2718
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, *216*(4542), 136-144.
- Romanov, J., Walczak, M., Ibiricu, I., Schuchner, S., Ogris, E., Kraft, C., & Martens, S. (2012). Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO J*, *31*(22), 4304-4317. doi: 10.1038/emboj.2012.278
- Rubinsztein, D. C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, *443*(7113), 780-786. doi: 10.1038/nature05291
- Rubinsztein, D. C., Cuervo, A. M., Ravikumar, B., Sarkar, S., Korolchuk, V., Kaushik, S., & Klionsky, D. J. (2009). In search of an "autophagometer". *Autophagy*, *5*(5), 585-589.
- Schatzl, H. M., Laszlo, L., Holtzman, D. M., Tatzelt, J., DeArmond, S. J., Weiner, R. I., . . . Prusiner, S. B. (1997). A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J Virol*, *71*(11), 8821-8831.
- Schulz-Schaeffer, W. J., Tschoke, S., Kranefuss, N., Drose, W., Hause-Reitner, D., Giese, A., . . . Kretzschmar, H. A. (2000). The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(Sc) early in the incubation time in prion diseases. *Am J Pathol*, *156*(1), 51-56. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64705-0
- 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
- Sikorska, B., Liberski, P. P., Giraud, P., Kopp, N., & Brown, P. (2004). Autophagy is a part of ultrastructural synaptic pathology in Creutzfeldt-Jakob disease: a brain biopsy study. *Int J Biochem Cell Biol*, *36*(12), 2563-2573. doi: 10.1016/j.biocel.2004.04.014
- Soto, C. (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, *4*(1), 49-60. doi: 10.1038/nrn1007
- Suzuki, K., & Terry, R. D. (1967). Fine structural localization of acid phosphatase in senile plaques in Alzheimer's presenile dementia. *Acta Neuropathol*, *8*(3), 276-284.
- Tanida, I. (2011). Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal*, *14*(11), 2201-2214. doi: 10.1089/ars.2010.3482
- Thellung, S., Scoti, B., Corsaro, A., Villa, V., Nizzari, M., Gagliani, M. C., . . . 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
- Wang, Q. J., Ding, Y., Kohtz, D. S., Mizushima, N., Cristea, I. M., Rout, M. P., . . . Yue, Z. (2006). Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J Neurosci*, 26(31), 8057-8068. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2261-06.2006
- Wells, G. A., & McGill, I. S. (1992). Recently described scrapie-like encephalopathies of animals: case definitions. *Res Vet Sci*, 53(1), 1-10.
- Westaway, D., DeArmond, S. J., Cayetano-Canlas, J., Groth, D., Foster, D., Yang, S. L., . . . Prusiner, S. B. (1994). Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell*, 76(1), 117-129.
- 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.
- Xu, Y., Tian, C., Wang, S. B., Xie, W. L., Guo, Y., Zhang, J., . . . Dong, X. P. (2012). 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
- Xu, Y., Tian, C., Sun, J., Zhang, J., Ren, K., Fan, X. Y., . . . Dong, X. P. (2016). FBXW7-Induced MTOR Degradation Forces Autophagy to Counteract Persistent Prion Infection. *Mol Neurobiol*, 53(1), 706-719. doi: 10.1007/s12035-014-9028-7
- Zatloukal, K., Stumptner, C., Fuchsichler, A., Heid, H., Schnoelzer, M., Kenner, L., . . . Denk, H. (2002). p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol*, 160(1), 255-263. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64369-6
- Zhang, N., Yang, G. Q., Shao, X. M., & Wei, L. (2016). GAS5 modulated autophagy is a mechanism modulating cisplatin sensitivity in NSCLC cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20(11), 2271-2277.
- Zheng, Q., Li, J., & Wang, X. (2009). Interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in proteinopathies. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 1(2), 127-142.

**Validation of biomarkers potentially involved in
prion replication *in vitro* in ovine scrapie**

Manuscrito preliminar

*Óscar López Pérez, Marcos Bernal Martín, Alicia Otero, Janne Markus
Toivonen, Juan José Badiola, Pilar Zaragoza,
Rosa Bolea, Inmaculada Martín Burriel*

Validation of biomarkers potentially involved in prion replication *in vitro* in ovine scrapie

ABSTRACT

Scrapie is a transmissible spongiform encephalopathy (TSE) in sheep and goats. A recent *in vitro* study identified a gene regulatory network that modulates the resistance/susceptibility of cultured cells to prion infection and could be used as biomarkers of the disease. On the basis of that study, we have investigated here the implication of a battery of those genes potentially involved in prion propagation in scrapie neuropathology *in vivo*, using the natural ovine model and transgenic mice (Tg338) overexpressing the highly susceptible variant (VRQ) of the ovine *PRNP* gene. Dysregulation of the transcript levels of *BAMBI* and *CHGA* in both scrapie models, suggests that these genes may play a relevant role in TSE neuropathology. When analysing the distribution of proteins encoded by those differentially expressed genes by immunohistochemistry, we found an overexpression of *BAMBI* and *CHGA* in some brain areas of both scrapie models. In general, *BAMBI* was upregulated in highly affected areas whereas overexpression of *CHGA* was distributed along the brain. Moreover, the neuroanatomical areas where *BAMBI* protein was overexpressed in Tg338 mice perfectly matched with those displaying an increase of reactive microglia, and correlation of *BAMBI* and *CHGA* immunostaining scores with microgliosis was stronger than that observed with prion deposition. Our data suggest that, rather than participating in prion replication, *BAMBI* and *CHGA* could be involved in the characteristic neuroinflammatory response associated to prion infection *in vivo*.

INTRODUCTION

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), or prion diseases, are fatal neurodegenerative disorders caused by prions (Prusiner, 1982). These pathologies affect humans and animals, and share common pathological features such as accumulation of abnormal conformers (PrP^{Sc}) of the cellular prion protein (PrP^c) in the central nervous system (CNS), which leads to neuronal dysfunction and cell death. Ovine scrapie was the first TSE described and constitutes one of the most widely studied models of these pathologies (Pattison & Jones, 1967).

For years, the field of prion research has focused on the characterisation of the molecular mechanisms and events implicated in prion-induced neurodegeneration. Transcriptomic studies have revealed differentially expressed genes that could be involved in the pathogenesis of these diseases and are potential targets for therapies in humans (Xiang *et al.*, 2005; Basu *et al.*, 2012; Vanni, 2017). Most of these studies were done using mice infected with different prion strains, since animal models are suitable tools to perform these genomic approaches (Vanni, 2017). Our group developed several transcriptomic analysis in scrapie-infected sheep that confirmed changes in the CNS described in murine scrapie, Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans and in other neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease (AD), and associated these changes with neuropathological alterations, which may support the development of biomarkers for diagnosis and therapy (Filali *et al.*, 2011; Filali *et al.*, 2012).

In vitro models are also useful for the identification of biomarkers or genes involved in TSE neuropathology. A transcriptomic comparison between prion-resistant revertants and highly susceptible clones of the mouse neuroblastoma N2a cells revealed a genomic signature associated with prion replication and susceptibility (Marbiah *et al.*, 2014). Although some variants of the prion protein gene (*PRNP*) have been linked to susceptibility to prion infection in human (Aguzzi, 2006) and sheep (Hunter, 2007), animals with the same scrapie *PRNP* genotype may have distinct incubation period times, which suggests the influence of other genetic factors (Moreno *et al.*, 2003). The described regulatory network includes genes encoding proteins with a known role in extracellular matrix (ECM) remodelling, suggesting that genes involved in ECM homeostasis affect prion conversion *in vitro*. Similarly, a genomic study performed in natural scrapie-infected sheep at the early stage of the disease revealed a downregulation of genes implicated in the organization of the ECM (Filali *et al.*, 2012).

The aim of the present study was to evaluate whether the genes described as potentially involved in prion protein replication could also play a role in scrapie neuropathology *in vivo*. For this purpose, we selected a battery of ten of those potential biomarkers (*BAMBI*, *CHGA*, *DLC1*, *FNI*, *GALT*, *IL11RA*, *ITGA8*, *LRRN4*, *PAPSS2* and *RGS4*) that were downregulated in N2a clones permissive to prion replication (Marbiah *et al.*, 2014). We performed an expression analysis of these genes in medulla oblongata (Mo) of sheep naturally infected with classical scrapie at clinical stage, since this tissue

is one of the most affected in this disorder. Then, the distribution of proteins encoded by differentially expressed genes, i.e. *BAMBI* and *CHGA*, was evaluated by immunohistochemistry (IHC) in different areas of the CNS of scrapie-affected sheep and in the transgenic Tg338 murine model of scrapie. These animals were used in a previous work assessing the molecular mechanisms of autophagy. Finally, we investigated the relationship between protein expression results and the appearance of the main scrapie-related lesions, including spongiform changes, PrP^{Sc} deposition and microgliosis. Our gene expression and immunohistochemical study has revealed that *BAMBI* and *CHGA* could play a role in TSE neuropathology *in vivo* but, rather than participating in prion replication, they could be involved in neuroinflammation.

MATERIALS AND METHODS

Gene expression analysis in natural ovine scrapie

Animals

Gene expression analysis was performed in Mo obtained from sheep naturally-infected with classical scrapie ($n=5$). All of them were female Rasa Aragonesa sheep and displayed the ARQ/ARQ genotype, which is the most frequently affected by scrapie in Mediterranean sheep breeds (Acin *et al.*, 2004). These animals came from scrapie-infected flocks and were diagnosed *in vivo* by the clinical signs associated with the disease. We used IHC to detect PrP^{Sc} in the selected tissue with the L42 monoclonal antibody to confirm the diagnosis of scrapie, as further described below. Due to the difficulty of finding controls with the same genotype, animals used as controls ($n=5$) were obtained from culling sheep from a scrapie-free flock, which were of the same sex and breed, but older (7.51 ± 1 years) than scrapie-affected animals (3.39 ± 1.26 years) (Table 1). This significant difference was considered when analysing the results.

Table 1: Animals used for the gene expression analysis in medulla oblongata of scrapie-infected sheep. All the animals were female and displayed the ARQ/ARQ genotype for *PRNP* gene. Ctrl: control; Scrp: scrapie

Animal ID	C1	C2	C3	C4	C5	SC1	SC2	SC3	SC4	SC5
Disease status	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Scrp	Scrp	Scrp	Scrp	Scrp
Age (years)	8.17	8.24	6.08	6.83	8.24	2.21	2.29	4.06	3.19	5.20

Gene expression analysis

Ten genes, described to be involved in prion replication (Marbiah *et al.*, 2014), were selected for the analysis of their expression profile in Mo: *BAMBI* (BMP and activin membrane-bound inhibitor), *CHGA* (chromogranin A), *DLC1* (DLC1 Rho GTPase-activating protein), *FNI* (fibronectin 1), *GALT* (galactose-1-phosphate uridylyltransferase), *IL11RA* (interleukin 11 receptor subunit alpha), *ITGA8* (integrin subunit alpha 8), *LRRN4* (leucine rich repeat neuronal 4), *PAPSS2* (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2) and *RGS4* (regulator of G protein signaling 4). Total RNA was obtained from 100 mg of RNAlater-preserved Mo using the RNeasy Lipid Tissue Mini kit (QIAGEN®) following the purchaser recommended protocol. Previously, tissue submerged in 1 ml of QUIAZOL Lysis Reagent (QIAGEN®) was mechanically disrupted in a TeSeE Precess 48 TissueLyser (Bio-Rad). Contaminating genomic DNA was digested using the Turbo DNA-free kit (Ambion). Complementary DNA (cDNA) was obtained from 500 ng of total RNA using the SuperScript First-Strand Synthesis System kit (Invitrogen). Final cDNA was diluted 1:10 in water for further analyses.

The quantitative PCR (qPCR) assays to amplify ovine genes were designed using Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems). Table 2 shows the sequences of primers designed for the amplification of the ovine genes. Whenever possible, the exon-exon border was considered when designing primers to prevent amplification of genomic DNA. PCR reactions were performed using SYBR® Green (Thermo Fisher Scientific) and PCR was carried out in a StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). All reactions were run in triplicate in a total volume of 10 µl, using 2 µl of diluted cDNA and 300 nM of each primer. Amplification cycling included a first activation and denaturation step of 10 minutes (min) at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds (s) at 95°C and 30 s at 60°C. Raw fluorescence data were analysed with the LinRegPCR software (Ruijter *et al.*, 2009), which used the mean PCR efficiency per amplicon and the Cq value per sample to calculate a starting concentration per sample, expressed in arbitrary fluorescence units. The geometric mean of the concentration of three housekeeping genes per sample was used to normalize results. Selected housekeeping genes have been previously shown to be stable in scrapie-affected sheep brain: *G6PDH*, *GAPDH* and *HPRT* (Lyahyai *et al.*, 2010). Normalized data were log transformed and differences between scrapie and control animals were evaluated using

the Student's *t*-test. Pearson correlation was calculated in the total set of individuals and within groups in order to detect any relationship between relative expression values and age (days), and Pearson and Spearman ρ correlations were calculated in scrapie animals and in the total set of sheep, respectively, to identify associations between gene expression levels and histopathological lesions in Mo. In all test we used IBM® SPSS® statistics 22 software for data analysis and hereafter the results were considered significant at $P < 0.05$. Proteins encoded by differentially expressed genes, i.e. *BAMBI* and *CHGA*, were selected for the analysis of their distribution in the CNS of scrapie-infected sheep.

Table 2: Primers used for the amplification of candidate genes. Ensemble access numbers for the ovine genes (ENSOARG) are shown in brackets under their corresponding gene name

Gene (ENSOARG)	Primer sequences	Primer length (bp)	T _m (°C)	Amplicon length (bp)
<i>ILI1RA</i> (00000009133)	Fw: 5' GTTGCCCTGGAGTGAAGTGT 3' Rv: 5' CCTAGCCCAGAGGCAGGT 3'	20 18	60.2 60.4	88
<i>RGS4</i> (00000011014)	Fw: 5' ATCTCAGTCCAGGCAACCAA 3' Rv: 5' GAGCCTCATCGAAGCAAGTT 3'	20 20	60.7 59.6	103
<i>PAPSS2</i> (00000014018)	Fw: 5' AGAGGTGGCCAAGCTGTTT 3' Rv: 5' CTGCCGATTCATGGATTTTG 3'	19 20	59.9 61.4	107
<i>BAMBI</i> (00000015180)	Fw: 5' GGCTACAGGATGTCTCACC 3' Rv: 5' TCTTTGGAGGACGTCAGCTC 3'	20 20	59.5 60.5	118
<i>DLC1</i> (00000009748)	Fw: 5' TCTATGGCGATTCCAGGTCT 3' Rv: 5' GCATACTGGGGGAATCCTG 3'	20 19	59.7 59.7	98
<i>LRRN4</i> (00000018440)	Fw: 5' CTACGGGTCCTTCATTTCCA 3' Rv: 5' CCGAAGAGGTTGATGGACAG 3'	20 20	59.9 60.7	92
<i>ITGA8</i> (00000008389)	Fw: 5' TGCTGTGGCACATTTAGGAG 3' Rv: 5' TGAGCACTTTCCTCTTTGA 3'	20 20	59.9 59.7	98
<i>CHGA</i> (00000013347)	Fw: 5' TGTATCGTCGAGGTCATCTCTGA 3' Rv: 5' CGAGGTCTTGAGCTCTTTCA 3'	23 21	58.4 58.3	144
<i>FNI</i> (00000019329)	Fw: 5' GGCTGAACCGGTAACGAA 3' Rv: 5' AGGCATGAAGCACTCAATTGG 3'	19 21	59.5 58.8	111
<i>GALT</i> (00000009164)	Fw: 5' ACCCCACAACCCTCTCTGT 3' Rv: 5' CAGAGCTGGGAAGTCGTTGTC 3'	20 21	59.3 58.5	100

Protein distribution analysis of *BAMBI* and *CHGA* in CNS of scrapie-affected sheep

Animals

The distribution of *BAMBI* and *CHGA* was analysed in formalin-fixed, paraffin-embedded CNS sections of 12 Rasa Aragonesa female sheep belonging to the CEETE (Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes) tissue bank of the University of Zaragoza, including 6 controls and 6 natural cases of classical scrapie obtained from different flocks of Aragon (Spain). All animals displayed the ARQ/ARQ genotype for *PRNP* gene and similar ages (scrapie animals 4.69 ± 0.48 years; healthy animals 4.06 ± 1.41 years) (Table 3).

Table 3: Animals used for BAMBI and CHGA protein distribution analysis in the central nervous system of scrapie-infected sheep. All the animals were female and displayed the ARQ/ARQ genotype for *PRNP* gene. Ctrl: control; Scrp: scrapie

Animal ID	C6	C7	C8	C9	C10	C11	SC6	SC7	SC8	SC9	SC10	SC11
Disease status	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Scrp	Scrp	Scrp	Scrp	Scrp	Scrp
Age (years)	3.14	5.59	4.57	4.70	4.71	1.68	4.98	5.04	5.31	4.20	4.33	4.26

Immunohistochemical analysis

Protein expression and distribution of BAMBI and CHGA was determined by IHC in 4 CNS areas: frontal cortex (Fc), thalamus (T), cerebellum (Cbl) and Mo. Heat pre-treatment (96°C for 20 min) in EnVision Flex target retrieval solution at low and high pH was used in a PTLINK PT100 (Dako) for BAMBI and CHGA immunostaining, respectively. Rabbit polyclonal antibodies were used to detect BAMBI [1:1000 dilution at room temperature (RT) for 1 hour (h), PA5-38027; ThermoFisher] and CHGA (1:200 dilution at RT for 1 h, PA5-16685; ThermoFisher). The reaction specificity was ensured by including a negative control without primary antibody in each staining procedure. EnVision Polymer anti-rabbit (Dako) was used to detect primary antibodies and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) as chromogen (Dako).

The specificity of antibodies was confirmed by Western blot. Briefly, 25 µg of total protein obtained from CNS tissues (Fc, T, Cbl and Mo) were subjected to 10% SDS/PAGE and transferred to PVDF membranes (GE Healthcare). After blocking at RT for 1 h, the membranes were incubated at 4°C overnight using the primary antibodies described above for IHC (both 1:1000 dilution). Next, the membranes were incubated for 1 h at RT with a HRP-conjugated secondary antibody (1:4000 dilution, goat anti-rabbit IgG-HRP; Santa Cruz Biotechnology). Western blots were developed using the ECL Plus Western Blotting system (GE Healthcare) and visualized with VersaDoc imaging system (Bio-Rad).

Histopathological study

In order to establish a relationship between the distribution of BAMBI and CHGA and prion pathology, scrapie-related histopathological lesions (neuropil spongiosis, intraneuronal vacuolation, PrP^{Sc} deposition and microgliosis) were evaluated in the same

CNS areas. Four micrometres sections were stained with haematoxylin and eosin (HE) to evaluate morphological changes. IHC for PrP^{Sc} detection was performed as previously described (Filali *et al.*, 2011) using the mouse monoclonal primary antibody L42 (1:500 dilution at RT for 30 min; R-Biopharm), EnVision Polymer anti-mouse as secondary antibody and DAB as chromogen (Dako). Pre-treatment included immersion of slices in formic acid for 15 min and digestion with proteinase K (PK) (4 µg/ml; Roche) for 15 min at 37°C. Similarly, microgliosis was also evaluated by IHC, using the primary antibody goat polyclonal anti-Iba1 (1:600 dilution at 4°C overnight, ab5076; Abcam), and the biotinylated multilink swine anti-goat/mouse/rabbit immunoglobulin G (1:200 dilution at RT for 1 h; Dako) as secondary antibody. In this case, the Vectastain ABC kit (Vector Labs Inc.) was used according to the manufacturer's instructions to visualize the binding of the primary antibody.

IHC and HE stained sections were examined with a ZEISS Axioskop 40 optical microscope and scored semi-quantitatively from 0 (no immunostaining or lesion) to 5 (strongly stained or injured areas). Histopathological and immunohistochemical differences between scrapie and control groups were assessed using non-parametric Mann Whitney U test. Possible relationship between BAMBI and CHGA immunostaining and scrapie-related lesions were evaluated using the non-parametric Spearman ρ correlation.

Gene expression and protein distribution analysis of *Bambi* and *Chga* in the CNS of scrapie-infected Tg338 mice

Animals

A transgenic mouse model (Tg338) overexpressing the highly susceptible VRQ allelic variant of the ovine *PRNP* gene (Laude *et al.*, 2002) was used to evaluate the gene expression and protein distribution of the two selected genes in the CNS. Mice aged ~50 days were anesthetized with isoflurane and inoculated into the right brain hemisphere with Tg338-adapted prions, derived from classical scrapie sheep material. Animals were euthanized by cervical dislocation at preclinical [n=6, 136 days post-inoculation (dpi)] or clinical (n=6, mean onset: 170 dpi) stages of the disease. Mice of the clinical group were monitored three times per week until the onset of clinical signs of TSE and culled when they showed locomotor disorders, poor body condition and inability to stand up. Two groups of mock-inoculated Tg338 mice (n=6 each) were culled at different time points,

i.e. 136 and 191 dpi, and selected as age-matched controls for the preclinical and clinical groups of mice, respectively (Table 4). After euthanasia, brains were removed and divided sagittally. One brain hemisphere was immediately frozen in dry ice and conserved at -80°C for biochemical analyses and the other one was fixed in 10% formalin for neuropathological evaluation.

Table 4: Tg338 mice used for the gene expression and protein distribution analysis of *Bambi* and *Chga* in the central nervous system. Table includes age at inoculation, survival time, and age at euthanasia

Experimental group	Inoculum	Inoculation age (days)	Survival time (dpi) (mean \pm SEM)	Age (days) (mean \pm SEM)
Clinical scrapie	Tg338-adapted scrapie	49	170 \pm 7	219 \pm 7
Clinical control	Mock	49	191	240
Preclinical scrapie	Tg338-adapted scrapie	53	136	189
Preclinical control	Mock	53	136	189

Gene expression analysis

Total RNA was isolated from mouse mesencephalon (Mes) obtained from frozen samples, using the Direct-ZolTM RNA kit (Zymo Research). Retrotranscription was performed from 200 ng of total RNA using qScriptTM cDNA Supermix (Quanta BiosciencesTM). Resulting cDNA was diluted 1:5 in water. Gene expression of *Bambi* and *Chga* was quantified by qPCR using the Mm03024088_g1 and Mm00514341_m1 assays (Thermo Fisher Scientific) in a StepOne Plus (Applied Biosystems). Expression levels were normalized with *Sdha* and *H6pd* housekeeping genes, which were amplified using the Mm01352366_m1 and Mm00557617_m1 assays. Relative gene expression quantification was determined using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method and differences between groups were evaluated with the Student's *t*-test.

Immunohistochemical analysis

Immunostaining of BAMBI and CHGA was evaluated in nine formalin-fixed paraffin-embedded CNS sections from Tg338 mice (Fraser & Dickinson, 1968): Fc, septal area (Sa), thalamic cortex (Tc), hippocampus (Hc), T, hypothalamus (Ht), Mes, Cbl [which includes molecular layer (Ml), Purkinje layer (Pl), granular layer (Gl), white matter (Wm) and deep cerebellar nuclei (DCN)] and Mo. The IHC protocol used was similar to that previously described for the ovine brain samples, but in this case, BAMBI immunolabelling was performed overnight.

Histopathological study

Spongiform changes were evaluated in the nine aforementioned brain areas with HE. Analysis of PrP^{Sc} deposition was performed using the paraffin-embedded tissue (PET) blot method, as formerly described (Schulz-Schaeffer *et al.*, 2000). Briefly, PrP^{Sc} labelling was performed in 4- μ m-thick sections from paraffin-embedded brain samples, collected on a 0.45- μ m pore size nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Immunodetection was performed using Sha31 mouse monoclonal antibody (1:8000 dilution for 1 h; SPI-Bio) followed by an alkaline phosphatase-labelled goat anti-mouse antibody (1:500 dilution for 1 h; Dako). Immunostaining was revealed using NBT/BCIP chromogen (Sigma-Aldrich). The intensity and distribution of PrP^{Sc} deposition were subsequently evaluated using a Zeiss Stemi DV4 stereomicroscope. Microgliosis immunolabelling was performed using an identical protocol to that described for sheep. The extent of spongiform changes, PrP^{Sc} deposition, microgliosis, as well as BAMBI and CHGA immunolabelling was scored as described in sheep and analysed using the Mann Whitney U test. Correlations between BAMBI and CHGA immunostaining and histopathological lesions were determined using the non-parametric Spearman ρ correlation.

RESULTS

Gene expression profile of prion replication-related genes in Mo of natural ovine scrapie

Gene expression profile in scrapie-affected sheep

Figure 1 shows the relative gene expression values of the ten genes analysed in Mo of scrapie-infected and control sheep. We used this tissue because it is one of the most affected areas in classical scrapie (Vidal *et al.*, 2009). Whilst a trend to downregulation was observed in half of the analysed genes, only *CHGA* displayed a statistically significant negative regulation in these tissues ($P < 0.01$). On the contrary, *BAMBI* was upregulated in scrapie medullae ($P < 0.05$). We selected these genes for further studies at the protein level (see below). The only gene that displayed a significant correlation between its gene expression level and age, in the total set of animals, was *CHGA* (Pearson $r = 0.827$, $P = 0.006$). However, this correlation was lost within individual groups (data not shown).

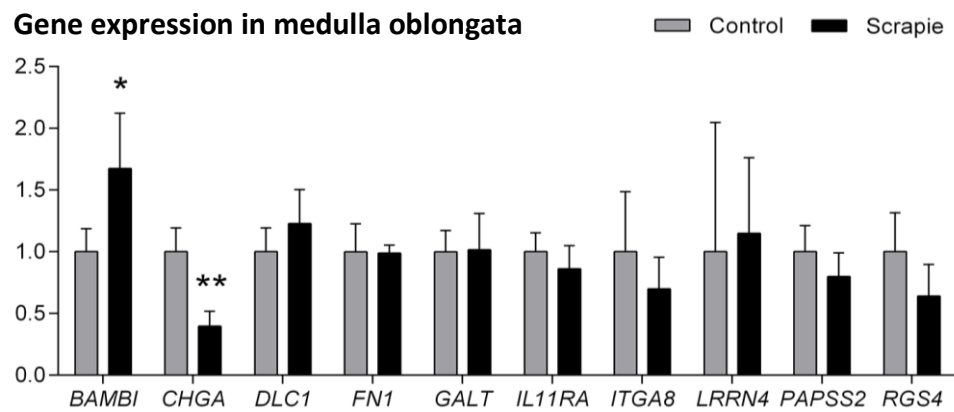


Figure 1: mRNA expression profiles of genes potentially involved in prion replication in medulla oblongata of sheep naturally-infected with scrapie (black bars) and control animals (grey bars). Relative expression levels are expressed as mean \pm standard deviation. Relative expression values (Y axis) are expressed as arbitrary units. Results were normalized using the geometric mean of the expression of *G6PDH*, *GAPDH* and *HPRT* housekeeping genes. Differences between groups were evaluated with the Student's *t*-test (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$).

Correlations between gene expression levels and histopathological lesions

Scrapie pathology was detected consistently in Mo of scrapie sheep but not in control animals. HE-stained sections revealed an increment of spongiosis and neuronal vacuolation, and PrP^{Sc} immunolabelling confirmed the diagnosis of scrapie (Figure 2). Using the total set of animals, we detected significant histopathological correlations only with those genes that displayed significant expression changes between groups (Table 5). Once controls were removed from the correlation study, *BAMBI* transcript levels positively correlated with prion deposition in scrapie animals ($r=0.98$, $P=0.003$) and spongiosis scores correlated significant and positively with the expression levels of *GALT* ($r=0.962$, $P=0.009$), *PAPSS2* ($r=0.968$, $P=0.007$) and *RGS4* ($r=0.938$, $P=0.018$).

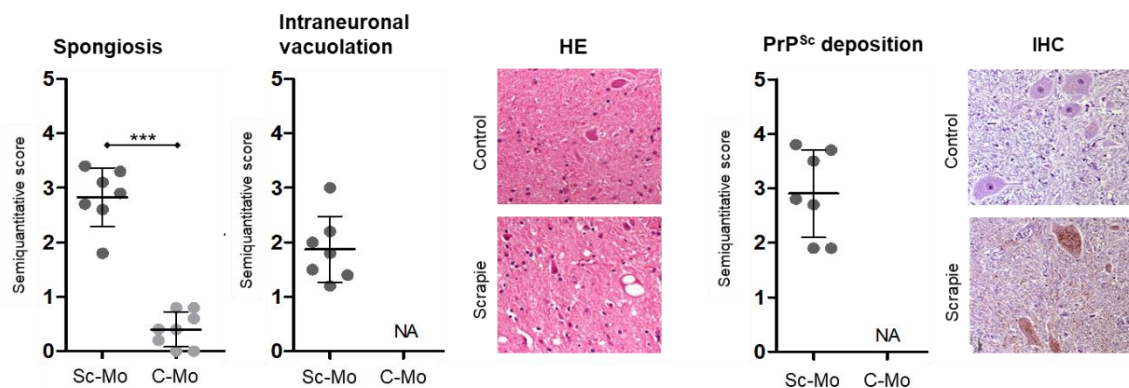


Figure 2: Neuropil spongiosis, intraneuronal vacuolation and PrP^{Sc} deposition in medulla oblongata of scrapie-infected sheep (Sc-Mo) and control animals (C-Mo). Figure shows representative images of haematoxylin and eosin staining (HE) and PrP^{Sc} deposition (IHC). Graphics show the semi-quantitative assessment values of these lesions evaluated from 0 (negative) to 5 (lesion/staining present at maximum intensity). Significant differences were determined using the Mann Whitney U test (*** $P < 0.001$).

Table 5: Correlation values between scrapie-related lesions in medulla oblongata of scrapie-affected sheep and expression of genes potentially involved in prion replication. Spearman (ρ) correlation was calculated in the total set of sheep and Pearson (r) correlation was calculated only in scrapie animals. N.S.: No statistically significant value

Gene	PrP ^{Sc} deposition		Intraneuronal vacuolation		Spongiosis	
	Total (ρ)	Scrapie (r)	Total (ρ)	Scrapie (r)	Total (ρ)	Scrapie (r)
<i>BAMBI</i>	0.83 (P=0.003)	0.98 (P=0.003)	0.692 (P=0.027)	-0.205 (N.S.)	0.705 (P=0.023)	-0.181 (N.S.)
<i>CHGA</i>	-0.892 (P=0.001)	-0.415 (N.S.)	-0.836 (P=0.005)	-0.01 (N.S.)	-0.733 (P=0.025)	0.853 (P=0.066)
<i>DLC1</i>	0.586 (N.S.)	0.565 (N.S.)	0.592 (N.S.)	0.444 (N.S.)	0.426 (N.S.)	0.065 (N.S.)
<i>FNI</i>	-0.195 (N.S.)	-0.813 (P=0.09)	0.019 (N.S.)	0.526 (N.S.)	0.213 (N.S.)	0.666 (N.S.)
<i>GALT</i>	-0.175 (N.S.)	-0.282 (P=0.079)	-0.019 (N.S.)	0.365 (N.S.)	0.177 (N.S.)	0.962 (P=0.009)
<i>IL1RA</i>	-0.506 (N.S.)	-0.724 (N.S.)	-0.136 (N.S.)	0.762 (N.S.)	-0.258 (N.S.)	0.538 (N.S.)
<i>ITGA8</i>	-0.214 (N.S.)	0.569 (N.S.)	-0.304 (N.S.)	0.203 (N.S.)	-0.319 (N.S.)	0.236 (N.S.)
<i>LRRN4</i>	0.367 (N.S.)	0.767 (N.S.)	0.3104 (N.S.)	0.244 (N.S.)	0.317 (N.S.)	-0.047 (N.S.)
<i>PAPSS2</i>	-0.487 (N.S.)	-0.423 (N.S.)	-0.356 (N.S.)	0.427 (N.S.)	-0.307 (N.S.)	0.968 (P=0.007)
<i>RGS4</i>	0.61 (N.S.)	-0.344 (N.S.)	-0.51 (N.S.)	0.308 (N.S.)	-0.384 (N.S.)	0.938 (P=0.018)

Protein distribution of BAMBI and CHGA in the CNS of scrapie-affected sheep

Histopathological study in scrapie-affected sheep

Histopathological analysis revealed a significant increment of neuropil spongiosis and intraneuronal vacuolation in most brain areas of scrapie-affected animals compared to controls (Figure 3A). As expected, the misfolded PrP^{Sc} protein was only detected in scrapie-infected sheep, whereas its absence was characteristic of the control group (Figure 3B). Activated microglial cells were significantly increased in basal ganglia (Bg), T, pons (P) and Mo (Figure 3C). In all cases, intensity of neuropathological features was significantly stronger in the three latter aforementioned areas, showing the dorsal nucleus of the vagus nerve (NVN) the highest scores, which corresponds to the characteristic lesion profile observed in classical scrapie (Vidal *et al.*, 2009).

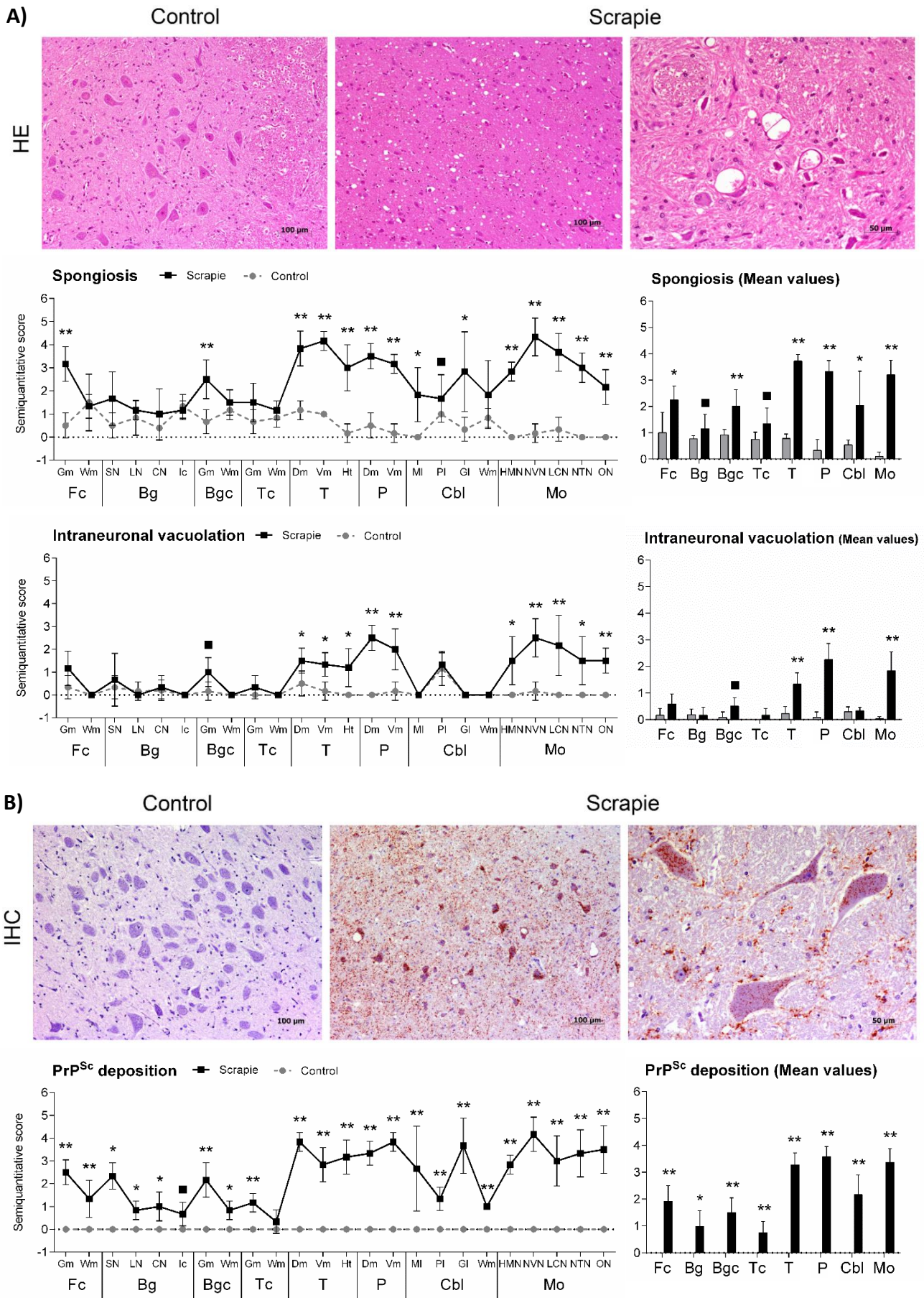


Figure 3 (Figure continues on next page).

(Continued from previous page).

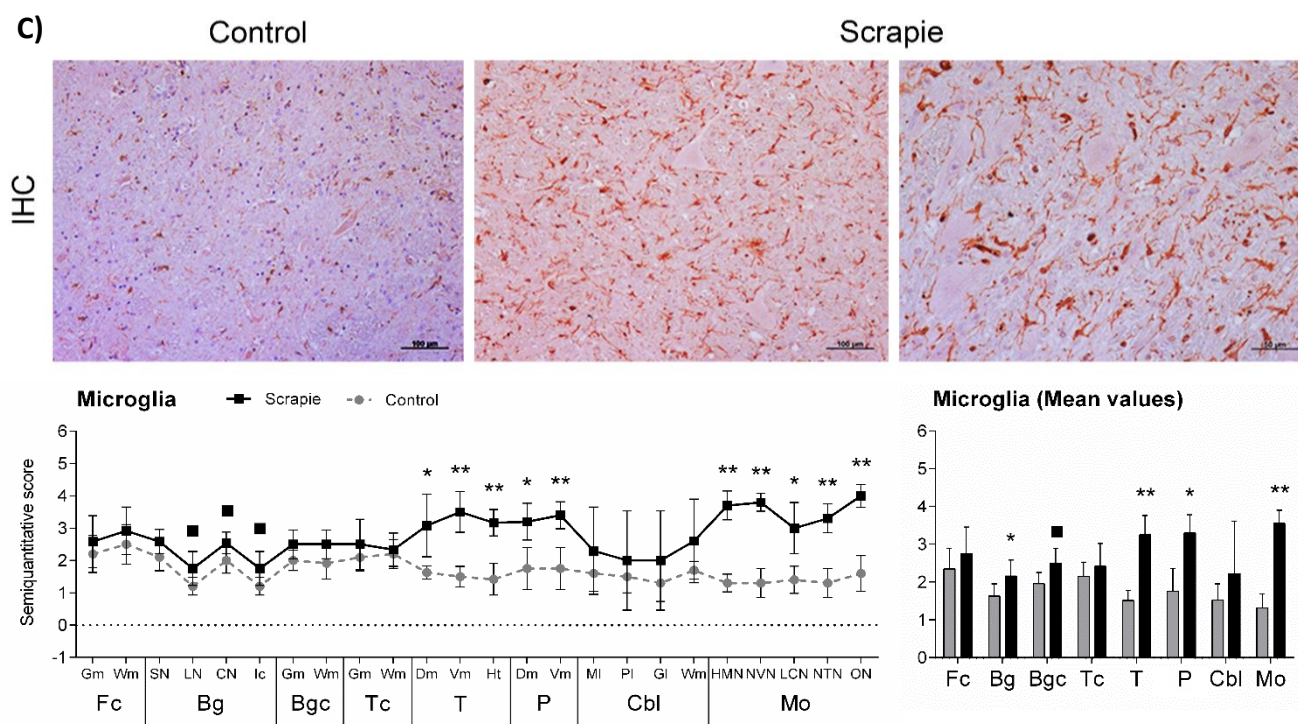


Figure 3: Neuropil spongiosis and intraneuronal vacuolation (A), PrP^{Sc} deposition (B) and microgliosis (C) in different CNS areas of scrapie-infected sheep. Figure shows representative images of haematoxylin and eosin staining (A), PrP^{Sc} deposition (B) and reactive microglia (C) (100 and 50 μ m). Graphics show the semi-quantitative assessment values of neuropathological lesions in frontal cortex (Fc), basal ganglia (Bg), basal ganglia cortex (Bgc), thalamic cortex (Tc), thalamus (T), pons (P), cerebellum (Cbl) and medulla oblongata (Mo). Abbreviations: grey matter (Gm), white matter (Wm), septal nucleus (SN), lateral nucleus (LN), caudate nucleus (CN), internal capsule (Ic), dorsomedial (Dm), ventromedial (Vm), hypothalamus (Ht), molecular layer (MI), Purkinje layer (PI), granular layer (GI), hypoglossal motor nucleus (HMN), dorsal nucleus of the vagus nerve (NVN), lateral cuneate nucleus (LCN), nucleus of the trigeminal nerve spinal tract (NTN), olivary nucleus (ON). Scores range from 0 (negative) to 5 (lesion/staining present at maximum intensity). Significant differences were determined using the Mann Whitney U test (■P<0.1, *P<0.05 and **P<0.01).

BAMBI and CHGA immunohistochemical distribution in scrapie-infected sheep

BAMBI immunostaining displayed a homogeneous intranuclear pattern in both neurons and glial cells in all brain areas of scrapie and control sheep (Figure 4A). However, the amount of immunopositive cells and the intensity of immunolabelling were moderately larger in some regions of the clinical sheep, such as the nuclei of the Mo. Figure 4B shows the semi-quantitative expression profile of this protein in the different areas analysed. Average scores were slightly higher in scrapie-affected sheep, being this increment statistically significant in Ht (P=0.047) and the hypoglossal motor nucleus (HMN) in Mo (P=0.031).

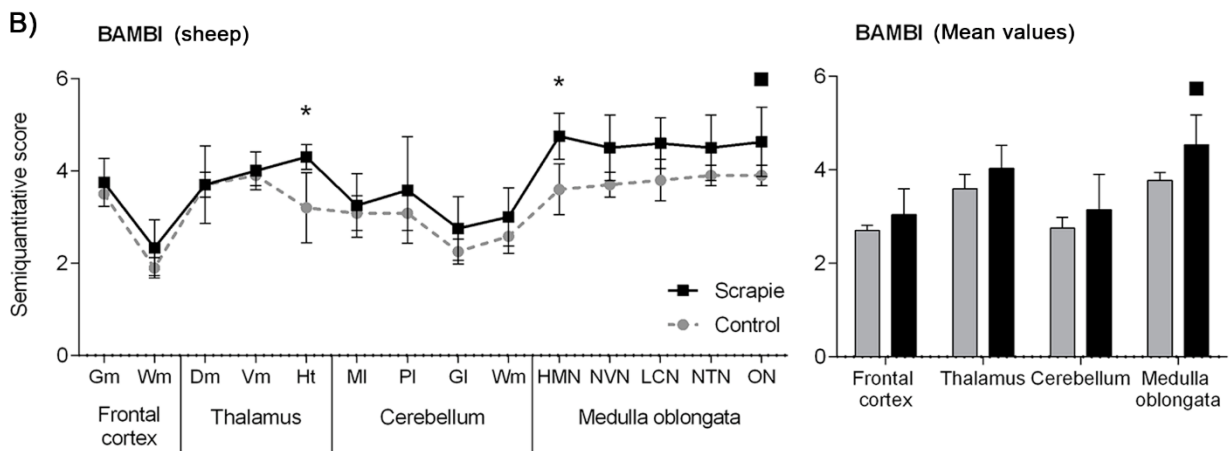
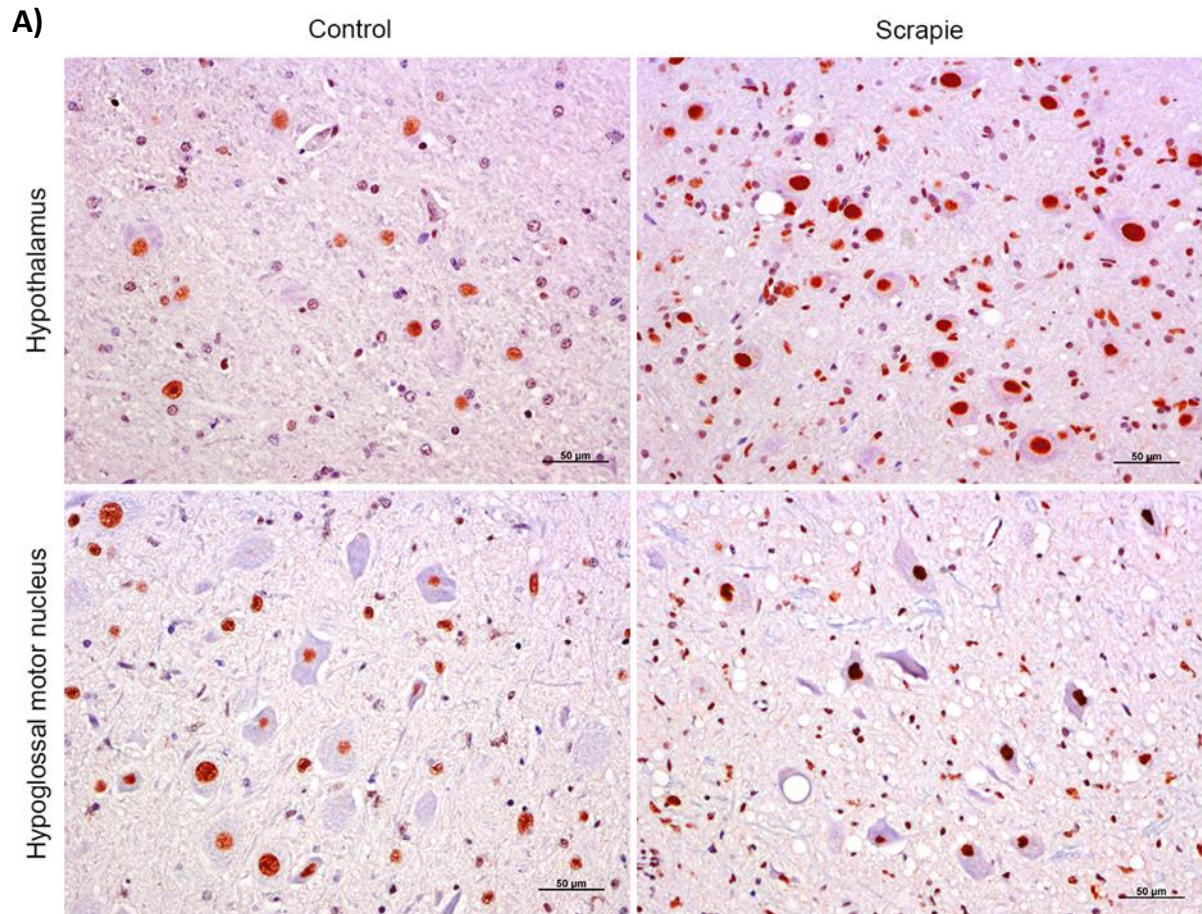


Figure 4: Immunostaining patterns and semi-quantitative scoring of BAMBI in the CNS of scrapie-infected sheep. Figure includes representative images of BAMBI immunostaining (A) and comparative graphs between scrapie (black bars) and control sheep (grey bars) (B). BAMBI immunostaining displayed a homogeneous intranuclear pattern in both neurons and glial cells in scrapie and control sheep, although the amount of immunopositive cells and the intensity of immunolabelling were moderately larger in some regions of the clinical sheep (50 µm) (A). Score values (from 0: negative, to 5: staining present at its maximum intensity) evaluated in frontal cortex, thalamus, cerebellum and medulla oblongata (B). Abbreviations: grey matter (Gm), white matter (Wm), dorsomedial (Dm), ventromedial (Vm), hypothalamus (Ht), molecular layer (MI), Purkinje layer (PI), granular layer (GI), hypoglossal motor nucleus (HMN), dorsal nucleus of the vagus nerve (NVN), lateral cuneate nucleus (LCN), nucleus of the trigeminal nerve spinal tract (NTN), olivary nucleus (ON). Significant differences were determined using the Mann Whitney U test (■P<0.1 and *P<0.05).

CHGA displayed different immunohistochemical patterns depending on the brain area (Figure 5A). Primarily, this protein formed intracytoplasmic aggregates. In Fc and T, these aggregates were coarse, occupying almost the entire cytoplasm, whereas they displayed fine particulate deposits in Mo. These granular-like deposits were more prominent and intense in the scrapie sheep group. In addition, a linear punctiform immunostaining was observed in the neuropil throughout the brain. In Cbl, we observed a synaptic-like and a perineuronal arrangement of this protein in the Purkinje cells, being remarkably stronger in the scrapie-affected animals. Also, these cells showed a homogeneous intracytoplasmic staining, which was minimal or absent in the control group and more intense in the scrapie-infected sheep. CHGA expression profile is shown in Figure 5B. Similar to BAMBI, the staining was stronger in scrapie brains, being significantly higher in all regions analysed from Fc and Cbl. Despite the nuclei of the Mo displayed larger scores, we did not observe significant differences due to the high variability detected in this area. However, when the mean values in each of the four regions were compared, we found that CHGA was significantly overexpressed not only in Fc ($P=0.015$) and Cbl ($P=0.004$), but also in Mo ($P=0.031$).

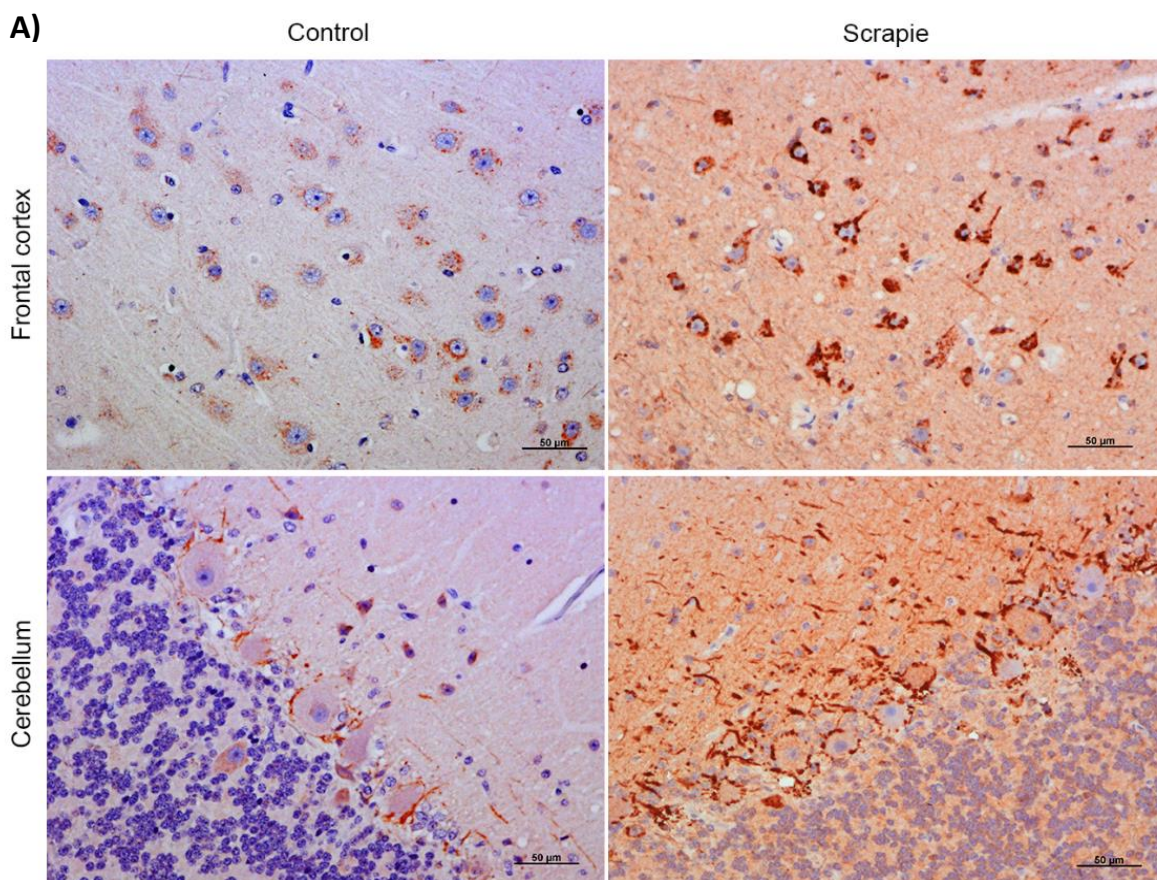


Figure 5 (Figure continues on next page).

(Continued from previous page).

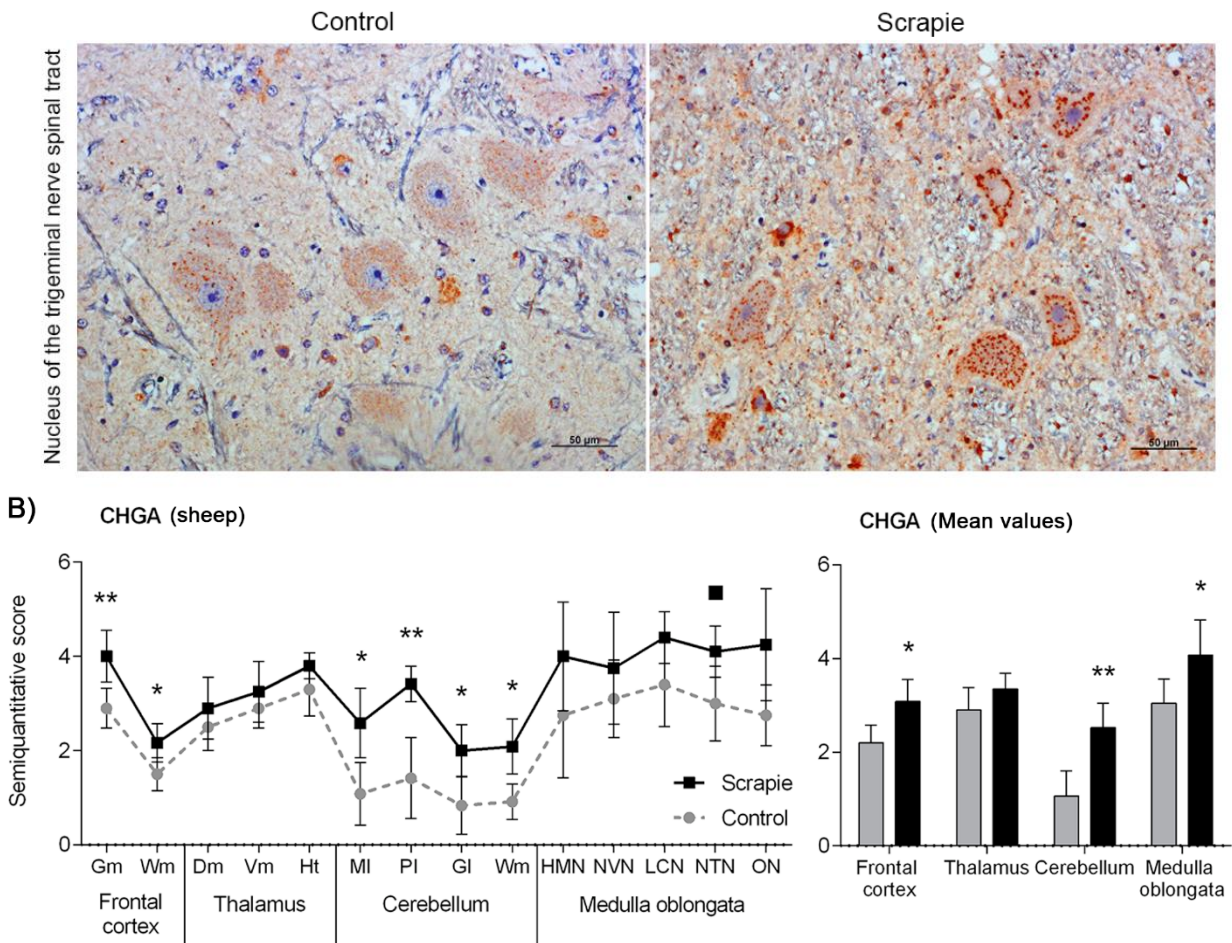


Figure 5: Immunostaining patterns and semi-quantitative scoring of CHGA in the CNS of scrapie-infected sheep. Figure includes representative pictures of CHGA immunostaining (A), and comparative graphs between scrapie (black bars) and control sheep (grey bars) (B). CHGA was found forming coarse intracytoplasmic aggregates in frontal cortex, occupying almost the entire cytoplasm, whereas it was observed as fine particulate deposits in medulla oblongata. These granular-like deposits were more prominent and intense in the scrapie sheep group. In cerebellum, CHGA displayed a synaptic-like and a perineuronal arrangement in the Purkinje layer, being remarkably stronger in the scrapie-affected animals (50 μ m) (A). Score values (from 0: negative, to 5: staining present at its maximum intensity) evaluated in frontal cortex, thalamus, cerebellum and medulla oblongata (B). Abbreviations: grey matter (Gm), white matter (Wm), dorsomedial (Dm), ventromedial (Vm), hypothalamus (Ht), molecular layer (MI), Purkinje layer (PI), granular layer (GI), hypoglossal motor nucleus (HMN), dorsal nucleus of the vagus nerve (NVN), lateral cuneate nucleus (LCN), nucleus of the trigeminal nerve spinal tract (NTN), olivary nucleus (ON). Significant differences were determined using the Mann Whitney U test (\bullet P<0.1, *P<0.05 and **<0.01).

Western blot analysis confirmed the specificity of the antibodies used in IHC. A unique and specific band at ~25 kDa was detected for BAMBI, whereas CHGA revealed a multiband pattern with a major band migrating at a molecular mass of ~70kDa (Figure 6). Both BAMBI and CHGA showed higher proportions of intensity of bands in scrapie animals in Mo and Fc, respectively.

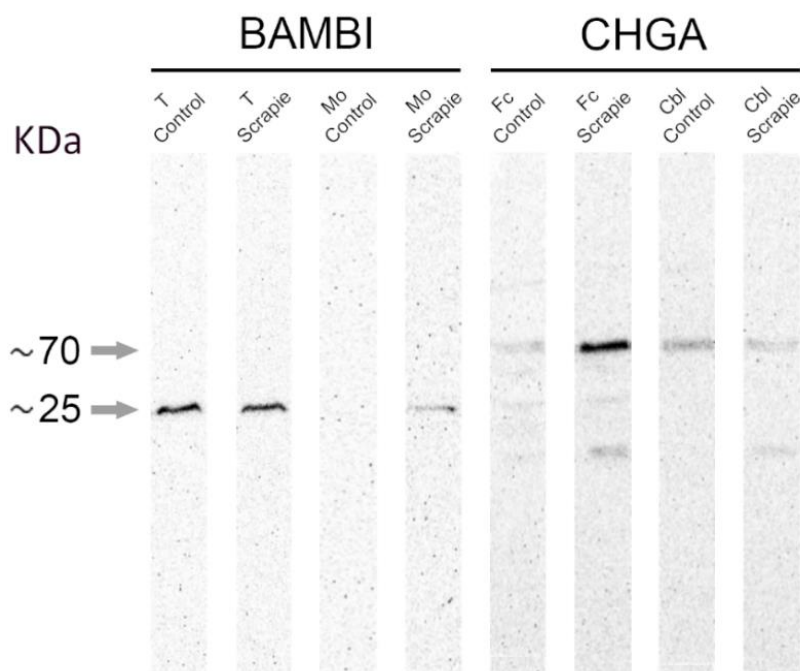


Figure 6: Specificity of antibodies. Membranes showing the specificity of antibodies against BAMBI and CHGA proteins in ovine thalamus (T), medulla oblongata (Mo), frontal cortex (Fc) and cerebellum (Cbl) of control and scrapie-infected sheep detected by Western blot. Each protein was cropped and grouped from different parts of the same gel. Distinctive bands of ~25 kDa and ~70 kDa confirmed the specificity of the antibody used against BAMBI and CHGA, respectively.

Correlations between BAMBI and CHGA protein expression and scrapie-lesions

The scores of BAMBI and CHGA immunostaining positively correlated with all scrapie-related lesions in the total set of animals ($P < 0.001$) (Table 6). This correlation was even stronger when the scrapie-affected group was analysed separately ($P < 0.001$). The strongest correlation was found between BAMBI and CHGA protein levels ($\rho = 0.765$, $P < 0.001$), suggesting a coordinate regulation of these proteins *in vivo*.

Table 6: Spearman correlation values between BAMBI and CHGA immunostaining scores and scrapie histopathological lesions (spongiosis, neuronal vacuolation, PrP^{Sc} deposition and microgliosis) in the total set of sheep and only in scrapie-infected sheep. Correlations were estimated using the full set of data obtained in the four areas analysed (*** $P < 0.001$)

	Spongiosis	Intraneuronal vacuolation	PrP ^{Sc} deposition	Microgliosis	CHGA
BAMBI					
Total set	0.362***	0.392***	0.409***	0.313***	0.702***
Scrapie	0.563***	0.447***	0.540***	0.489***	0.765***
CHGA					
Total set	0.431***	0.345***	0.507***	0.360***	
Scrapie	0.564***	0.476***	0.530***	0.451***	

Gene expression and protein distribution of *Bambi* and *Chga* in the CNS of scrapie-infected Tg338 mice

Gene expression profile of Bambi and Chga in scrapie-infected Tg338 mice

Transcripts from *Bambi* and *Chga* genes were quantified in Mes of the four Tg338 mouse groups (Figure 7). We used this tissue because it showed the most abundant accumulation of PrP^{Sc} and the highest scores of spongiform changes (see Figure 8 in next section). A significant downregulation was observed for both *Bambi* ($P < 0.01$) and *Chga* ($P < 0.05$) in the clinical scrapie mice compared to their selected age-matched control group. Significant changes were not detected at preclinical stage of the disease when comparing to selected age-matched group.

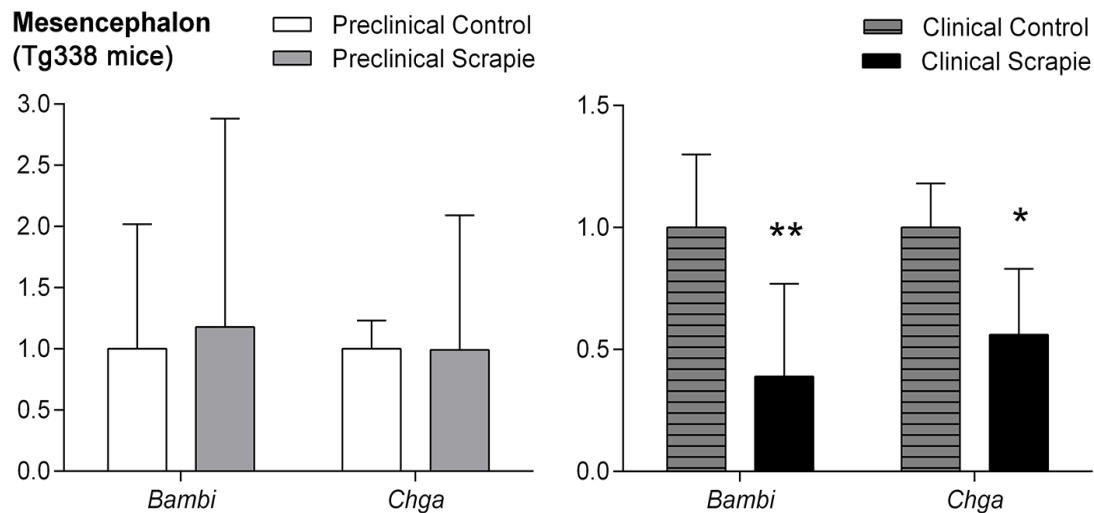


Figure 7: mRNA expression profiles of *Bambi* and *Chga* genes in mesencephalon of preclinical (grey bars) and clinical (black bars) scrapie-infected Tg338 mice. White bars and grey-striped bars display expression levels in controls for preclinical and clinical mice, respectively. Relative expression levels are expressed as mean \pm standard deviation. Relative expression values (Y axis) are expressed as arbitrary units. Results were normalized using the geometric mean of the expression of *Sdha* and *H6pd* housekeeping genes. Differences between groups were evaluated with the Student's *t*-test (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$).

Histopathological study of scrapie-infected Tg338 mice

Histopathological profiles obtained in clinical Tg338 mice were compatible with TSE and resembled those observed in classical scrapie sheep (Figure 8). Neuropathological variability was minimal within each group. In all clinically-affected mice, spongiform changes were most prominent in T, Ht, Mes and Mo, least noticeable in Hc and cerebral cortex and almost absent in Cbl. Presence of spongiform lesions in the

other groups was of a markedly lower magnitude (Figure 8A). All Tg338 mice culled due to clinical disease were positive for PrP^{Sc} in the brain. In these mice, prion protein deposition was observed throughout the brain and was particularly pronounced in Mes, Ht and Mo. In the latter, significant differences were not observed due to the high variability in PrP^{Sc} deposition showed by this tissue. Evidence of PrP^{Sc} deposition was not detected in mice at preclinical stage (Figure 8B). Microgliosis scores were very similar between the four groups analysed, although Hc, T, Ht and Mo displayed a slight but significant staining increment in clinical mice (Figure 8C).

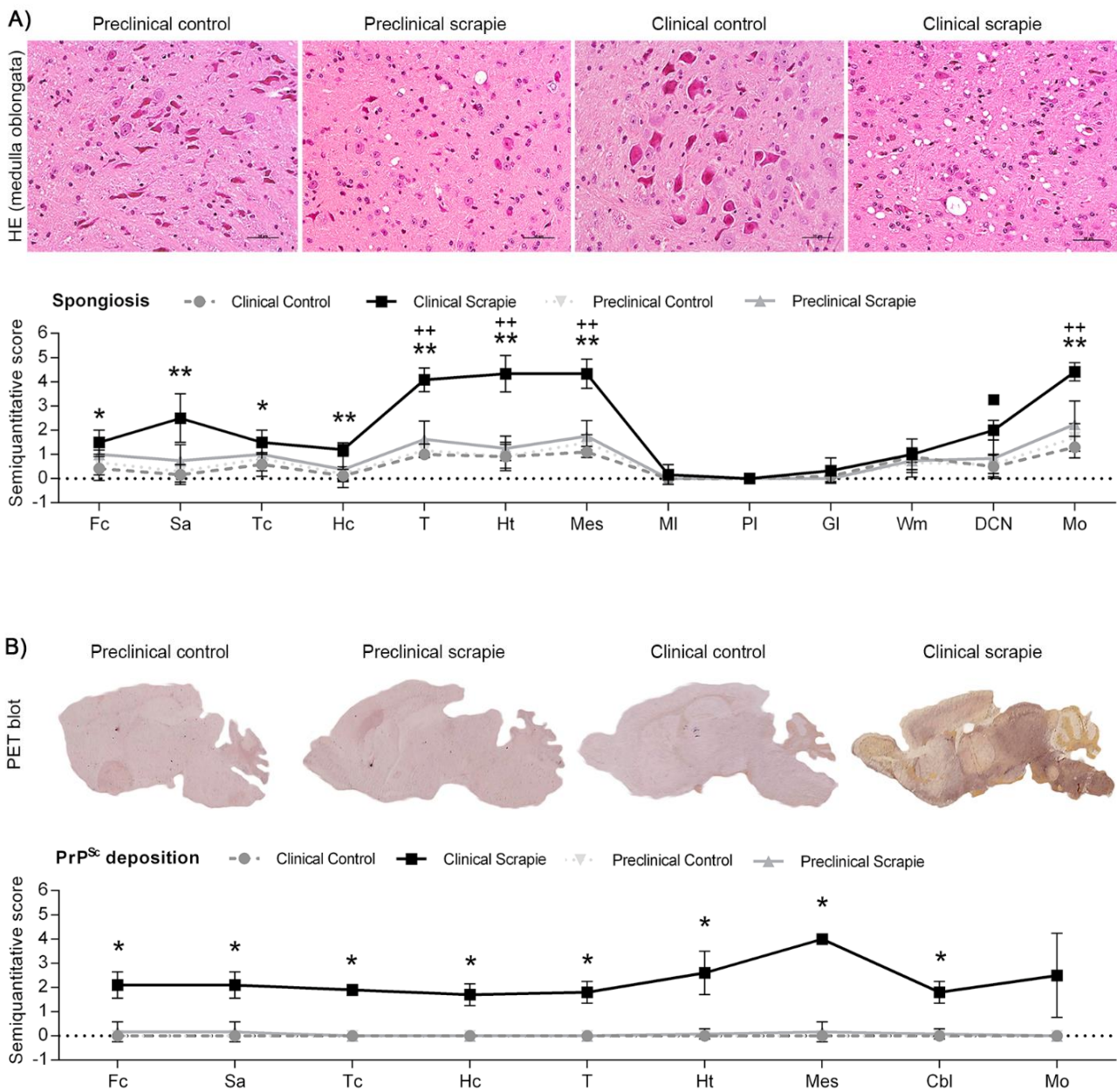


Figure 8 (Figure continues on next page).

(Continued from previous page).

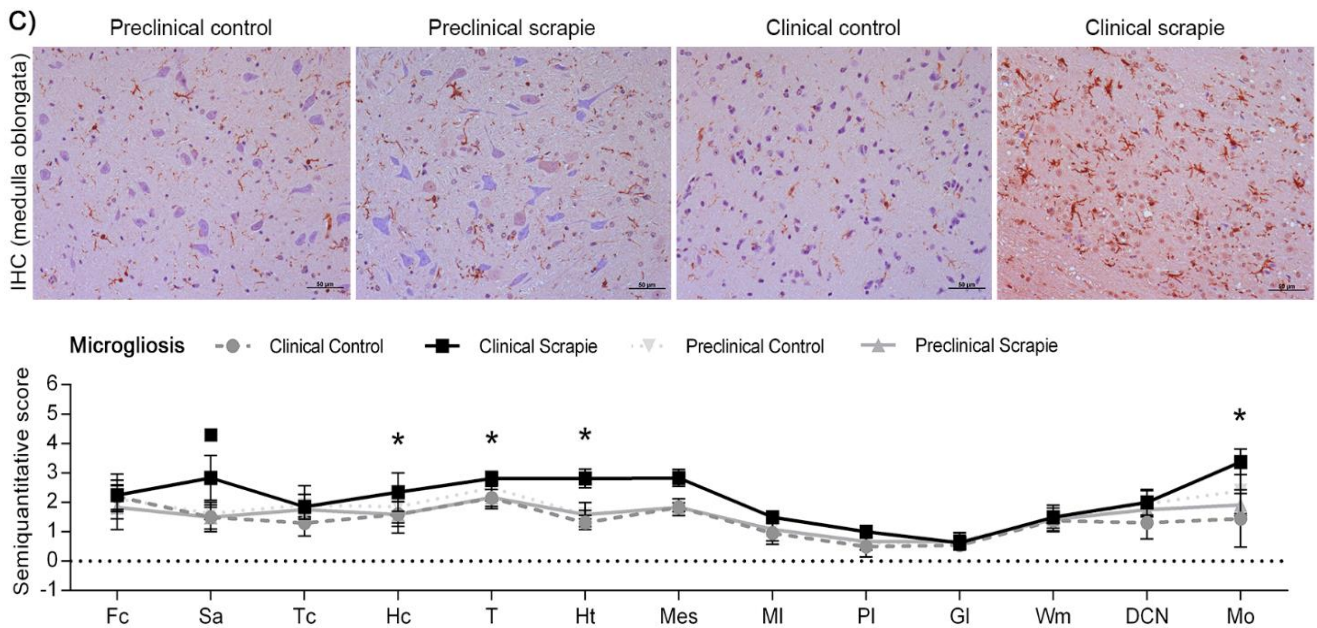


Figure 8: Spongiform changes (A), PrP^{Sc} deposition (B) and microgliosis (C) in different CNS areas of Tg338 scrapie-infected mice. Figure shows representative images of haematoxylin and eosin staining (A) and reactive microglia (C) in medulla oblongata (50 µm), and PET blot method in sagittally divided brain (B). Graphics show the semi-quantitative assessment values of these lesions in frontal cortex (Fc), septal area (Sa), thalamic cortex (Tc), hippocampus (Hc), thalamus (T), hypothalamus (Ht), mesencephalon (Mes), cerebellum (Cbl) [which includes molecular layer (MI), Purkinje layer (PI), granular layer (Gl), white matter (Wm) and deep cerebellar nuclei (DCN)], and medulla oblongata (Mo). Scores range from 0 (negative) to 5 (lesion/staining present at maximum intensity). Significant differences were determined using the Mann Whitney U test (•P<0.1, *P<0.05 and **P<0.01 when comparing the clinical group with their control group, and ++P<0.01 when comparing to the preclinical group).

Immunohistochemical distribution of BAMBI and CHGA proteins in scrapie-infected Tg338 mice

In Tg338 mice brain samples, BAMBI deposition type consisted of coarse granules found in the nuclei of cells (Figure 9A). This granular pattern was more evident in neurons in some of the brain areas studied, such as T, DCN and Mo. In addition, a diffuse neuropil staining was observed, remarkably strong in Ht but also present in the other brain regions studied. Clinical mice showed the highest accumulation of BAMBI in almost all brain structures (Figure 9B). In particular, this increment was statistically significant in Hc (P=0.034), T (P=0.026), Ht (P=0.039), DCN (P=0.031), and Mo (P=0.023) of clinically-infected mice compared to their control group (Figure 9C). No significant differences were detected between the other groups.

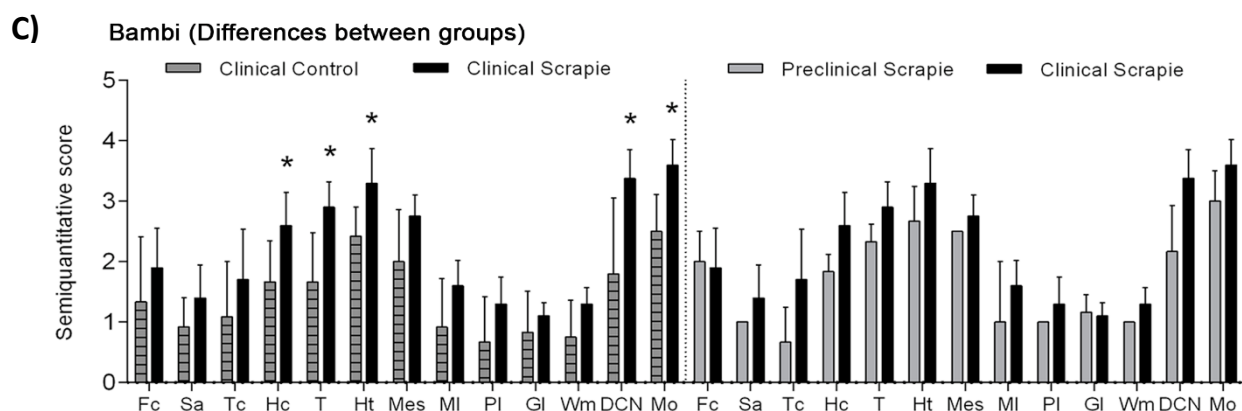
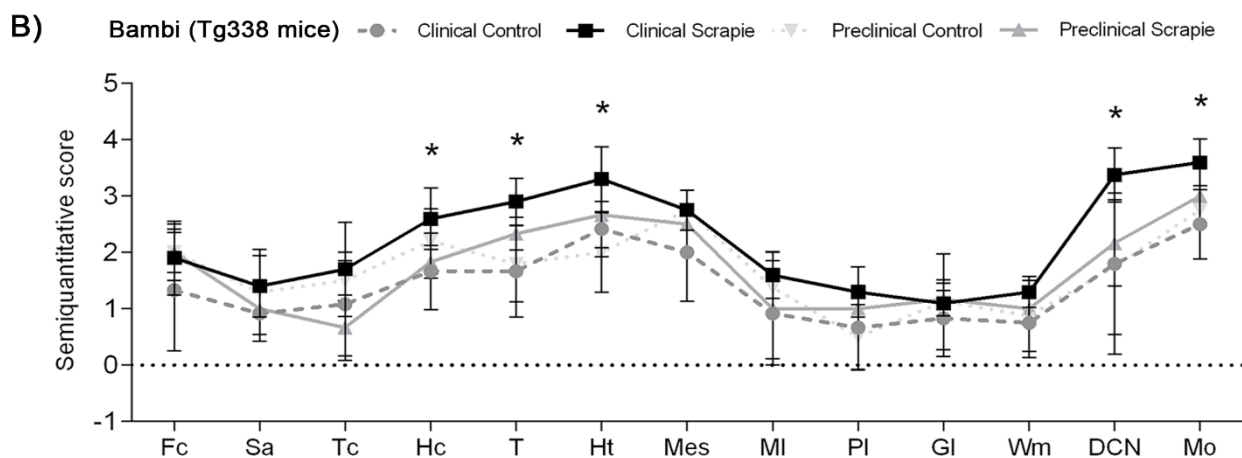
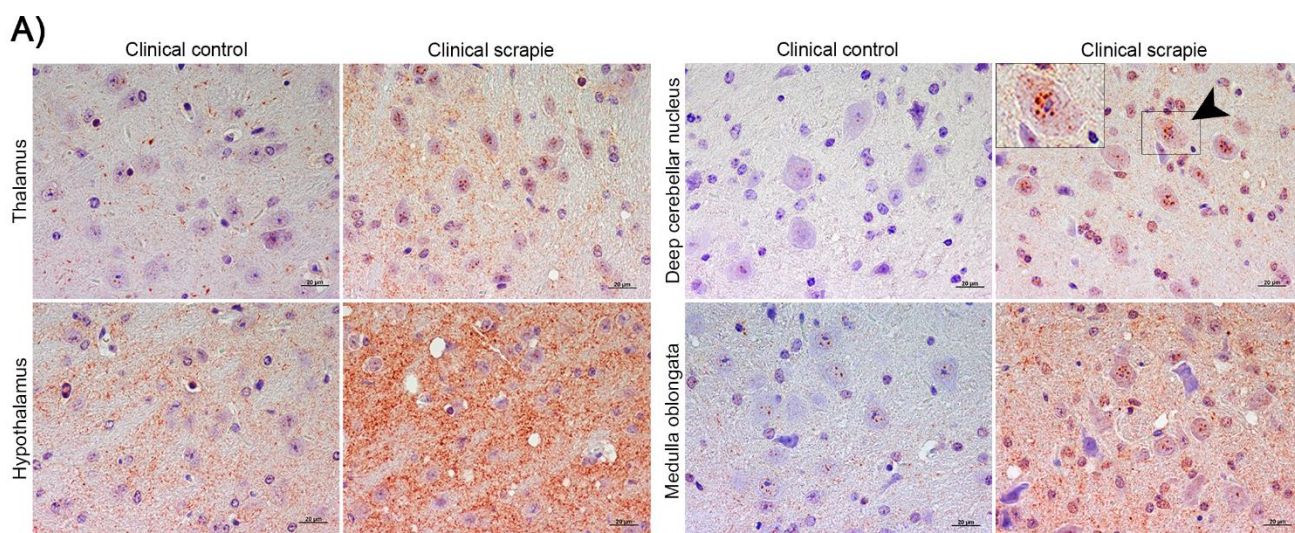


Figure 9: Immunostaining patterns and semi-quantitative scoring of BAMBI in the CNS of Tg338 scrapie-infected mice. Figure includes representative pictures of BAMBI immunostaining (A), a global graph (B), and comparative graphs between clinical group (black bars) with preclinical (grey bars) and control group (grey-striped bars) (C). Comparative graphs between preclinical and their control group, and between control groups, are not shown because no significant differences were detected. BAMBI deposition type consisted of coarse granules found in the nuclei of cells, which were more evident in neurons of thalamus, deep cerebellar nuclei of cerebellum (arrowhead and detail) and medulla oblongata. In addition, a diffuse neuropil staining was observed, remarkably strong in the hypothalamus but also present in the other brain regions studied (20 μm) (A). Score values (from 0: negative, to 5: staining present at its maximum intensity) evaluated in frontal cortex (Fc), septal area (Sa), thalamic cortex (Tc), hippocampus (Hc), thalamus (T), hypothalamus (Ht), mesencephalon (Mes), cerebellum (Cbl) [which includes molecular layer (MI), Purkinje layer (PI), granular layer (GI), white matter (Wm) and deep cerebellar nuclei (DCN)], and medulla oblongata (Mo). The differences between the experimental groups were determined using the Mann Whitney U test (*P<0.05).

CHGA protein in the Tg338 mice model presented an immunostaining pattern similar to that described for scrapie sheep (Figure 10A). A linear punctiform synaptic-like immunostaining was observed in the neuropil throughout the brain. In addition, multiple cells exhibited intracytoplasmic granular immunolabelling, being particularly well-defined and strong in certain regions of the clinical mice, such as T, DCN and Mo. The morphology of some CHGA-immunopositive cells was compatible with glial cells. In Cbl, clinically-affected mice showed a mild intracytoplasmic staining of the Purkinje cells, which were not immunolabelled in the other groups. However, these cells occasionally had neurites partially stained, not only in clinical mice, but also in the preclinical and control group. Like BAMBI, CHGA deposition scores were higher in the clinically-infected mice (Figure 10B). This increase was statistically significant in Tc (P=0.039), Hc (P=0.023), T (P=0.015), Pl (P=0.023), Wm (P=0.007) and Mo (P=0.007) when comparing the clinical mice with their control group (Figure 10C). Moreover, when these animals were also compared to the preclinical-stage group, a significant increase of CHGA was observed in T (P=0.017), Pl (P=0.035) and Wm (P=0.035).

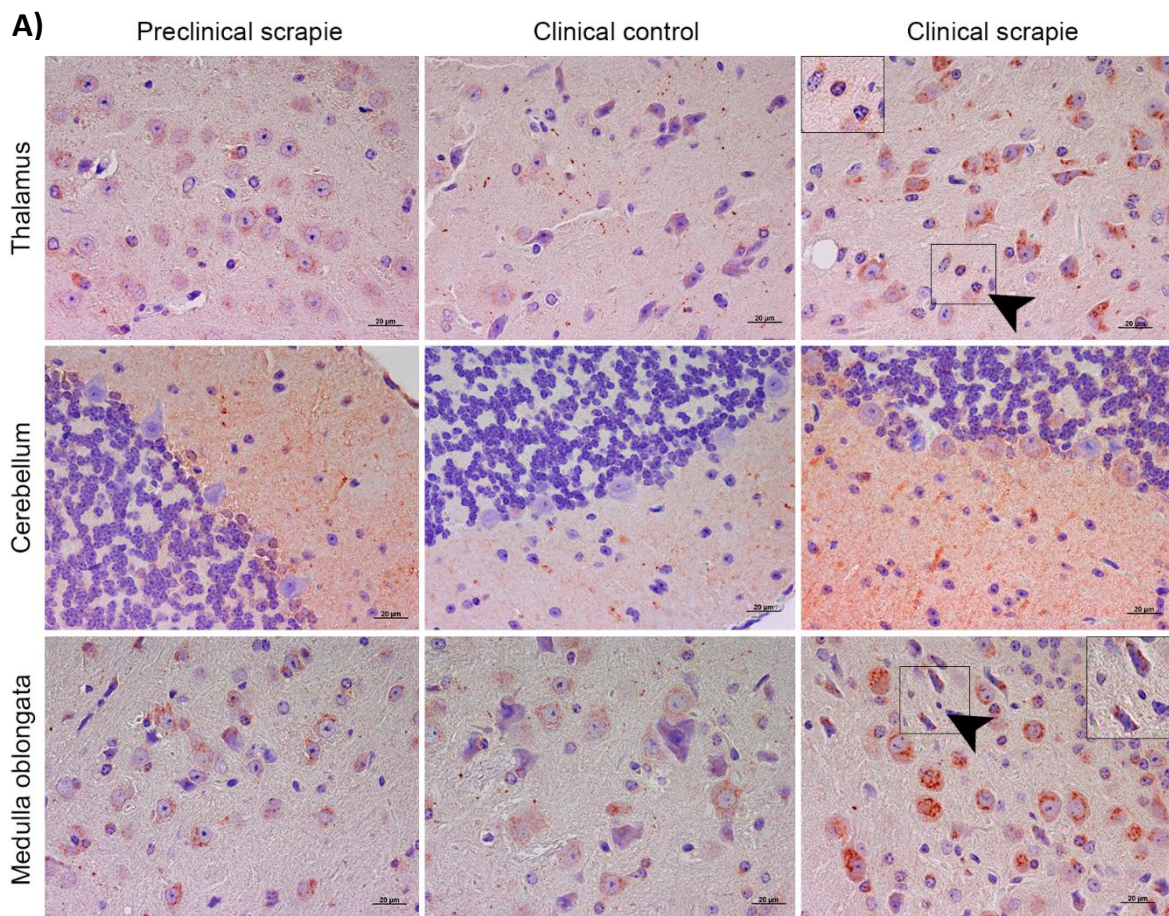


Figure 10 (Figure continues on next page).

(Continued from previous page).

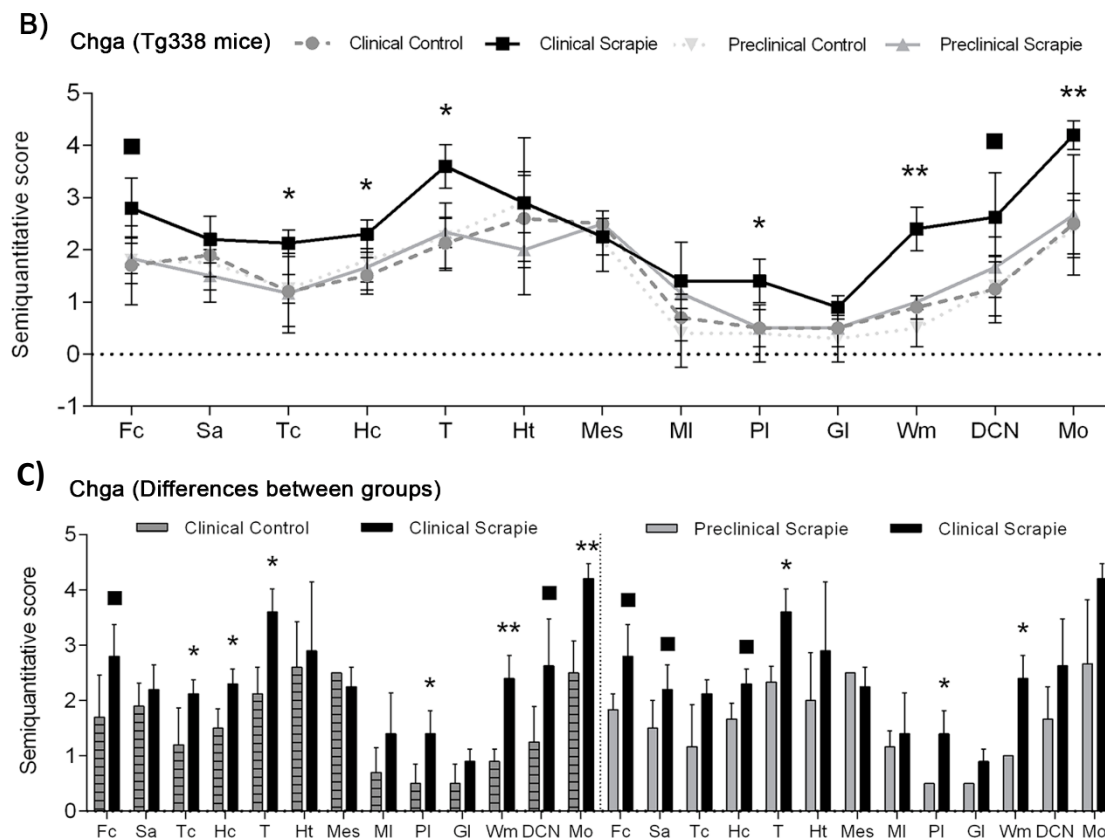


Figure 10: Immunostaining patterns and semi-quantitative scoring of CHGA in the CNS of Tg338 scrapie-infected mice. Figure includes representative images of CHGA immunostaining (A), a global graph (B), and comparative graphs between clinical group (black bars) with preclinical (grey bars) and control group (grey-striped bars) (C). Comparative graphs between preclinical and their control group, and between control groups, are not shown because no significant differences were detected. CHGA displayed a linear punctiform synaptic-like immunostaining observed in the neuropil throughout the brain. In addition, multiple cells exhibited intracytoplasmic granular immunolabelling, being particularly well-defined and strong in thalamus and medulla oblongata. In cerebellum, clinically-affected mice showed a mild intracytoplasmic staining of the Purkinje cells, which were not immunolabelled in the rest of the groups. However, these cells occasionally had neurites partially stained, not only in clinical mice, but also in the preclinical and control group. Notice the glial cell immunolabelling (arrowheads and detail) (20 μ m) (A). Score values (from 0: negative, to 5: staining present at its maximum intensity) evaluated in frontal cortex (Fc), septal area (Sa), thalamic cortex (Tc), hippocampus (Hc), thalamus (T), hypothalamus (Ht), mesencephalon (Mes), cerebellum (Cbl) [which includes molecular layer (MI), Purkinje layer (PI), granular layer (GI), white matter (Wm) and deep cerebellar nuclei (DCN)], and medulla oblongata (Mo). The differences between the experimental groups were determined using the Mann Whitney U test (\bullet P<0.1, *P<0.05 and **<0.01).

Correlations between BAMBI and CHGA protein expression and scrapie-lesions

As aforementioned for scrapie sheep, the scores of BAMBI and CHGA immunostaining in scrapie-infected Tg338 mice positively correlated with all scrapie-related lesions (Table 7). In clinical mice, correlations were stronger with spongiosis and microgliosis, and lower with prion deposition. Also, both proteins were positively correlated between each other in all group analysed.

Table 7: Spearman correlation values between BAMBI and CHGA immunostaining scores and scrapie histopathological lesions (spongiform changes, PrP^{Sc} deposition and microgliosis) in the preclinical and clinical stage, in the total set of animals and only in scrapie-inoculated Tg338 mice. Correlations were estimated using the full set of data obtained in all tissues. N.S.: No statistically significant value (*P<0.05, **P<0.01 and *P<0.001)**

	Preclinical stage		Clinical stage		Total set	Scrapie clinical + preclinical
	Control + Scrapie	Scrapie	Control + Scrapie	Scrapie		
BAMBI						
Spongiosis	0.379***	0.545***	0.559***	0.709***	0.483***	0.648***
PrP^{Sc}	-----	N.S.	-----	0.454**	-----	0.327*
Microgliosis	0.487***	0.515**	0.371***	0.535***	0.422***	0.575***
CHGA						
Spongiosis	0.518***	0.625***	0.668***	0.694***	0.594***	0.694***
PrP^{Sc}	-----	N.S.	-----	0.454**	-----	0.550***
Microgliosis	0.559***	0.543***	0.724***	0.609***	0.644***	0.662***
BAMBI/CHGA	0.603***	0.637***	0.520***	0.613***	0.545***	0.645***

DISCUSSION

Susceptibility to scrapie is mostly controlled by point mutations at the *PRNP* locus. However, additional genes, apart from *PRNP*, have been reported to modulate resistance/susceptibility to this neurodegenerative disease and may affect prion incubation time and prion replication. Genomic analysis can contribute to the determination of these genes or the identification of genes involved in prion neuropathology (Moreno *et al.*, 2003; Cosseddu *et al.*, 2007; Marcos-Carcavilla *et al.*, 2010; Filali *et al.*, 2011; Basu *et al.*, 2012; Filali *et al.*, 2012). A genomic study performed *in vitro* using cell lines with different susceptibilities to prion replication determined potential genes involved in the susceptibility to PrP^{Sc} propagation (Marbiah *et al.*, 2014). On the basis of that study, we have investigated here the implication of a battery of those genes in classical scrapie, using both the natural ovine model and the transgenic Tg338 mice that overexpress the highly susceptible variant of the ovine *PRNP* gene (Laude *et al.*, 2002). The analysed genes were expressed by prion-resistant revertants of highly susceptible neuroblastoma cells, and their expression was downregulated after treatment with retinoic acid, which was linked to an augmented prion replication of revertant clones (Marbiah *et al.*, 2014).

We first analysed the expression of these genes in Mo of sheep naturally-infected with scrapie. This tissue is one of the most affected by both prion accumulation and spongiform degeneration in classical scrapie (Vidal *et al.*, 2009). Although most of the genes trend to reduce their expression in scrapie medullae, statistically significant downregulation was only observed for *CHGA*. This lack of significance can be somehow expected due to the cellular complexity of the CNS, where not all cellular types are necessarily involved in prion propagation. This complexity dilutes changes that can be happening in individual cell class. Moreover, *Chga* gene was also downregulated in Mes of Tg338 mice in the clinical stage, but not in the preclinical stage. Therefore, since the expression of this gene decreased in the most prion-affected areas of both the natural model and the transgenic model of scrapie, our expression study confirms those changes observed *in vitro* by Marbiah *et al.* (Marbiah *et al.*, 2014) and the involvement of *CHGA* in prion disease.

When analysing the subcellular location of prion modifier proteins, Marbiah *et al.* found CHGA deposited at the ECM level in prion-resistant cells, whilst we found this protein mainly forming coarse intracytoplasmic aggregates within the neurons of natural scrapie and scrapie-infected transgenic mice. Chromogranin A is a neuroendocrine secretory glycoprophosphoprotein belonging to a multifunctional protein family widely enclosed within secretory large dense core-vesicles in the neuroendocrine system and a variety of neurons, where they constitute the main protein component of the intravesicular matrix (Taupenot *et al.*, 2003). By now, CHGA is a cytoplasmic protein that is not known to be directly involved in ECM homeostasis, therefore it could have indirect effects on ECM biology, or may act through a different mechanism (Imberdis & Harris, 2014).

Downregulation of *CHGA* transcription and translation *in vitro* was associated with a significant increase in prion propagation, although CHGA protein does not colocalise with PrP at the ECM level, and knockdown of this gene converts resistant cells to a susceptible phenotype (Marbiah *et al.*, 2014). However, unlike the study mentioned before, when analysing immunohistochemically the expression of CHGA, we found an overexpression of this protein in some CNS areas of both the natural model (i.e. Fc, Cbl and Mo) and the transgenic Tg338 model (i.e. Tc, Hc, T, Cbl and Mo). Clinically-infected mice also displayed an increment of this protein in T and Cbl when comparing to mice at preclinical stage. In addition, the scores of CHGA immunostaining positively correlated

with prion-related lesions in both TSE models. Several studies have described that CHGA accumulates in brain areas with neuronal degeneration, like Lewy bodies in the substantia nigra in Parkinson's disease (PD) (Nishimura *et al.*, 1994), Pick bodies and swollen neurons in Pick's disease (Yasuhara *et al.*, 1994) and dystrophic neurites in senile plaques in AD (Willis *et al.*, 2011), suggesting that this protein could be a useful biomarker for various neurological diseases. In fact, the potential of CHGA as biomarker in cerebrospinal fluid has been investigated in prion-like neurodegenerative diseases such as AD (Willis *et al.*, 2011) or amyotrophic lateral sclerosis (Kaiserova *et al.*, 2017). The presence of a large amount of CHGA around β -amyloid plaques also suggests that neurosecretory granules could be involved in β -amyloid formation (Willis *et al.*, 2011). Moreover, it has been observed by IHC that the levels of one component of large dense-core vesicles, i.e. CHGA, are elevated in temporal cortex from patients with AD (Weiler *et al.*, 1990; Lassmann *et al.*, 1992). Hence, data in both scrapie models used in our study indicate that expression of CHGA is also a key feature of prion disease.

Published data support the idea that CHGA is one of the endogenous factors that trigger the microglial response involved in neuronal degeneration. Experiments showing that exposure of cultured rodent microglia to CHGA resulted in rapid microglial activation, suggested that this protein may act as an important stimulator of neuroinflammation (Taupenot *et al.*, 1996). *In vitro*, CHGA itself is unable to exert a direct toxic effect on neurons, but induces neurodegeneration in presence of microglial cells by stimulating these cells to secrete neurotoxic agents (Ciesielski-Treska *et al.*, 1998). Also, CHGA has been postulated to be a potent pro-inflammatory inducer of neuroinflammation in AD (Heneka *et al.*, 2010), since it activates microglial stress pathways (Willis *et al.*, 2011). During the course of AD, CHGA released by neuronal stress or death may act as an endogenous danger signal, known as danger-associated molecular pattern (DAMP), which alerts the innate immune system and induces the inflammatory process (Venegas & Heneka, 2017). Within the brain, we found that CHGA is accumulated in some of the neurodegenerative areas associated with reactive microglia, i.e. Mo in scrapie sheep, and Hc, T and Mo in scrapie-infected transgenic mice. Moreover, in clinical Tg338 mice we detected a stronger correlation of CHGA immunostaining scores with microgliosis than that observed with prion deposition, which suggests that this protein is likely to be a mediator between inflammatory and neurodegenerative mechanisms also in prion diseases.

On the other hand, like Marbiah *et al.* described, we found *Bambi* to be downregulated in Mes from clinically-affected Tg338 mice. *Bambi* is expressed in neuroblastoma prion-resistant clones, however, after treatment with retinoic acid, *Bambi* transcript levels decrease in the susceptible phenotype (Marbiah *et al.*, 2014). Surprisingly, we found this gene to be significantly overexpressed in Mo of the natural scrapie model. In these animals, *BAMBI* is not only upregulated, but its protein expression is also increased in Ht and Mo and positively correlated with scrapie-related lesions. Similarly, *BAMBI* protein expression was significantly upregulated in Hc, T, Ht, DCN and Mo of clinically-infected mice and also displayed a positive correlation with neuropathological scrapie lesions.

BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) is a transmembrane pseudoreceptor that negatively regulates TGF- β (transforming growth factor-beta) signalling by preventing the formation of active receptor complexes (Onichtchouk *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2009). In adult mouse, *Bambi* transcripts are expressed in several regions of the CNS involved in pain processing (Tramullas *et al.*, 2010). The lack of *Bambi* in knock-out mice, and the corresponding increased levels of TGF- β signalling activity, was associated with attenuation of pain behaviours, which unravelled the role of TGF- β in nociceptive perception (Tramullas *et al.*, 2010). We observed an intranuclear immunostaining of *BAMBI* in neurons and glial cells in all brain areas. Immunostaining of *BAMBI* in both cytoplasm and nucleus has been previously described in other organs like porcine ovary (Bai *et al.*, 2014). Co-translocation of *BAMBI* with Smads, transcriptional co-regulators involved in TGF- β signalling, into the nucleus in tumoral ovarian cells occurs after TGF- β treatment, although it has been associated with a modulation of TGF- β signalling in the nucleus rather than with an inhibition (Pils *et al.*, 2010). TGF- β overexpression occurs in Fc and Cbl of patients with sporadic CJD, although changes differ between subtypes of this disease (Llorens *et al.*, 2014). In natural ovine scrapie, a gene expression analysis of TGF- β did not reveal significant changes in any of the analysed areas (Serrano *et al.*, 2009). Further studies are necessary to confirm the possible role of this regulatory pathway in scrapie neuropathology.

More interesting, it has been recently suggested that the impairment of TGF- β signalling and inhibition of its anti-inflammatory properties could prolong microglial activation and contribute to the development and maintenance of neuroinflammation

(Affram *et al.*, 2017). Chronic immune activation, in particular of microglia, induced by deposition of abnormal proteins, is strongly associated with the pathogenesis of neurodegenerative disorders like AD, PD or TSEs (Vidal *et al.*, 2009; Amor *et al.*, 2010; Llorens *et al.*, 2014). Unfortunately, the mechanisms underlying chronic microglial activation are not completely understood. β -amyloid is an example of DAMP since its deposition in the CNS activates microglia, induces chronic neuroinflammation and contributes to neuropathology of AD (Goldsworthy & Vallence, 2013). β -amyloid (1-42) oligomers suppressed TGF- β gene expression *in vitro*, and induced transient upregulation of mRNA encoding the inhibitor of TGF- β signalling, i.e. *Bambi* (Affram *et al.*, 2017). However, the role of BAMBI protein in neurodegenerative diseases has not been further investigated.

The upregulation observed in scrapie medullae at the transcript level in our study, and the increment of BAMBI immunostaining in several CNS areas of both scrapie models, suggest a role of this protein in prion neuropathology. Moreover, the neuroanatomical areas where this protein was overexpressed in clinical Tg338 mice perfectly matched with those areas where an increase of activated microglia was observed (i.e. Hc, T, Ht and Mo). BAMBI was also upregulated in Ht and Mo of scrapie sheep, which also displayed an increment of reactive microglia, and positively correlated with microgliosis in both scrapie models. Taken our results together with those of others, our study suggests that this molecule could be crucial to regulate chronic neuroinflammation in scrapie, probably through the regulation of TGF- β expression.

To conclude, although further research of role and function of BAMBI and CHGA in prion disease-related conditions is still required, our study certainly suggests that these proteins could play a relevant role in TSE neuropathology *in vivo*, and may be involved in the characteristic neuroinflammatory response associated to these disorders. A more profound understanding of the molecular pathways involved in neuroinflammation may reveal potential targets for improving chronic inflammation and help develop therapeutic interventions for neurodegenerative diseases.

Ethics statement: All experimental procedures performed in animals were approved by the Ethics Committee for Animal Experiments of the University of Zaragoza (Permit Number: PI38/15 and PI40/15). The care and use of experimental animals were performed in strict accordance with the national law (R.D. 53/2013).

REFERENCES

- Acin, C., Martin-Burriel, I., Goldmann, W., Lyahyai, J., Monzon, M., Bolea, R., . . . Zaragoza, P. (2004). Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. *J Gen Virol*, *85*(Pt 7), 2103-2110. doi: 10.1099/vir.0.80047-0
- Affram, K. O., Mitchell, K., & Symes, A. J. (2017). Microglial Activation Results in Inhibition of TGF-beta-Regulated Gene Expression. *J Mol Neurosci*, *63*(3-4), 308-319. doi: 10.1007/s12031-017-0980-3
- Aguzzi, A. (2006). Prion diseases of humans and farm animals: epidemiology, genetics, and pathogenesis. *J Neurochem*, *97*(6), 1726-1739. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03909.x
- Amor, S., Puentes, F., Baker, D., & van der Valk, P. (2010). Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*, *129*(2), 154-169. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03225.x
- Bai, L., Chu, G., Mai, Y., Zheng, J., Wang, W., Zhang, Q., & Yang, G. (2014). Identification and expression analyses of BAMBI mediated by FSH in swine luteinizing granulosa cells. *Theriogenology*, *82*(8), 1094-1101. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.07.022
- Basu, U., Guan, L. L., & Moore, S. S. (2012). Functional genomics approach for identification of molecular processes underlying neurodegenerative disorders in prion diseases. *Curr Genomics*, *13*(5), 369-378. doi: 10.2174/138920212801619223
- Ciesielski-Treska, J., Ulrich, G., Taupenot, L., Chasserot-Golaz, S., Corti, A., Aunis, D., & Bader, M. F. (1998). Chromogranin A induces a neurotoxic phenotype in brain microglial cells. *J Biol Chem*, *273*(23), 14339-14346.
- Cosseddu, G. M., Andreoletti, O., Maestrale, C., Robert, B., Ligios, C., Piumi, F., . . . Vaiman, D. (2007). Gene expression profiling on sheep brain reveals differential transcripts in scrapie-affected/not-affected animals. *Brain Res*, *1142*, 217-222. doi: 10.1016/j.brainres.2007.01.033
- Filali, H., Martin-Burriel, I., Harders, F., Varona, L., Lyahyai, J., Zaragoza, P., . . . Bolea, R. (2011). Gene expression profiling and association with prion-related lesions in the medulla oblongata of symptomatic natural scrapie animals. *PLoS One*, *6*(5), e19909. doi: 10.1371/journal.pone.0019909
- Filali, H., Martin-Burriel, I., Harders, F., Varona, L., Serrano, C., Acin, C., . . . Bolea, R. (2012). Medulla oblongata transcriptome changes during presymptomatic natural scrapie and their association with prion-related lesions. *BMC Genomics*, *13*, 399. doi: 10.1186/1471-2164-13-399
- 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.

- Goldsworthy, M. R., & Vallence, A. M. (2013). The role of beta-amyloid in alzheimer's disease-related neurodegeneration. *J Neurosci*, 33(32), 12910-12911. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2252-13.2013
- Heneka, M. T., O'Banion, M. K., Terwel, D., & Kummer, M. P. (2010). Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, 117(8), 919-947. doi: 10.1007/s00702-010-0438-z
- Hunter, N. (2007). Scrapie: uncertainties, biology and molecular approaches. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1772(6), 619-628. doi: 10.1016/j.bbadis.2007.04.007
- Imberdis, T., & Harris, D. A. (2014). Prion permissive pathways: extracellular matrix genes control susceptibility to prion infection. *EMBO J*, 33(14), 1506-1508. doi: 10.15252/embj.201489071
- Kaiserova, M., Grambalova, Z., Otruba, P., Stejskal, D., Prikrylova Vranova, H., Mares, J., . . . Kanovsky, P. (2017). Cerebrospinal fluid levels of chromogranin A and phosphorylated neurofilament heavy chain are elevated in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand*, 136(4), 360-364. doi: 10.1111/ane.12735
- Lassmann, H., Weiler, R., Fischer, P., Bancher, C., Jellinger, K., Floor, E., . . . Winkler, H. (1992). Synaptic pathology in Alzheimer's disease: immunological data for markers of synaptic and large dense-core vesicles. *Neuroscience*, 46(1), 1-8.
- Laude, H., Vilette, D., Le Dur, A., Archer, F., Soulier, S., Besnard, N., . . . Vilotte, J. L. (2002). New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives. *C R Biol*, 325(1), 49-57.
- 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
- Llorens, F., Lopez-Gonzalez, I., Thune, K., Carmona, M., Zafar, S., Andreoletti, O., . . . Ferrer, I. (2014). Subtype and regional-specific neuroinflammation in sporadic creutzfeldt-jakob disease. *Front Aging Neurosci*, 6, 198. doi: 10.3389/fnagi.2014.00198
- Marbiah, M. M., Harvey, A., West, B. T., Louzolo, A., Banerjee, P., Alden, J., . . . Klohn, P. C. (2014). Identification of a gene regulatory network associated with prion replication. *EMBO J*, 33(14), 1527-1547. doi: 10.15252/embj.201387150
- Marcos-Carcavilla, A., Moreno, C., Serrano, M., Laurent, P., Cribiu, E. P., Andreoletti, O., . . . Moazami-Goudarzi, K. (2010). Polymorphisms in the HSP90AA1 5' flanking region are associated with scrapie incubation period in sheep. *Cell Stress Chaperones*, 15(4), 343-349. doi: 10.1007/s12192-009-0149-2
- Moreno, C. R., Lantier, F., Lantier, I., Sarradin, P., & Elsen, J. M. (2003). Detection of new quantitative trait Loci for susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies in mice. *Genetics*, 165(4), 2085-2091.

- Nishimura, M., Tomimoto, H., Suenaga, T., Nakamura, S., Namba, Y., Ikeda, K., . . . Kimura, J. (1994). Synaptophysin and chromogranin A immunoreactivities of Lewy bodies in Parkinson's disease brains. *Brain Res*, *634*(2), 339-344.
- Onichtchouk, D., Chen, Y. G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J., & Niehrs, C. (1999). Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*, *401*(6752), 480-485. doi: 10.1038/46794
- Pattison, I. H., & Jones, K. M. (1967). The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *Vet Rec*, *80*(1), 2-9.
- Pils, D., Wittinger, M., Petz, M., Gugerell, A., Gregor, W., Alfanz, A., . . . Krainer, M. (2010). BAMBI is overexpressed in ovarian cancer and co-translocates with Smads into the nucleus upon TGF-beta treatment. *Gynecologic Oncology*, *117*(2), 189-197. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.12.034
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, *216*(4542), 136-144.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J., & Moorman, A. F. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res*, *37*(6), e45. doi: 10.1093/nar/gkp045
- Schulz-Schaeffer, W. J., Tschoke, S., Kranefuss, N., Drose, W., Hause-Reitner, D., Giese, A., . . . Kretzschmar, H. A. (2000). The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(Sc) early in the incubation time in prion diseases. *Am J Pathol*, *156*(1), 51-56. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64705-0
- Serrano, C., Lyahyai, J., Bolea, R., Varona, L., Monleon, E., Badiola, J. J., . . . Martin-Burriel, I. (2009). Distinct spatial activation of intrinsic and extrinsic apoptosis pathways in natural scrapie: association with prion-related lesions. *Vet Res*, *40*(5), 42. doi: 10.1051/vetres/2009024
- Taupenot, L., Ciesielski-Treska, J., Ulrich, G., Chasserot-Golaz, S., Aunis, D., & Bader, M. F. (1996). Chromogranin A triggers a phenotypic transformation and the generation of nitric oxide in brain microglial cells. *Neuroscience*, *72*(2), 377-389.
- Taupenot, L., Harper, K. L., & O'Connor, D. T. (2003). The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med*, *348*(12), 1134-1149. doi: 10.1056/NEJMra021405
- Tramullas, M., Lantero, A., Diaz, A., Morchon, N., Merino, D., Villar, A., . . . Hurle, M. A. (2010). BAMBI (bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor) reveals the involvement of the transforming growth factor-beta family in pain modulation. *J Neurosci*, *30*(4), 1502-1511. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2584-09.2010
- Vanni, S. (2017). Omics of Prion Diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci*, *150*, 409-431. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.05.004

- Venegas, C., & Heneka, M. T. (2017). Danger-associated molecular patterns in Alzheimer's disease. *J Leukoc Biol*, *101*(1), 87-98. doi: 10.1189/jlb.3MR0416-204R
- Vidal, E., Acin, C., Foradada, L., Monzon, M., Marquez, M., Monleon, E., . . . Bolea, R. (2009). Immunohistochemical characterisation of classical scrapie neuropathology in sheep. *J Comp Pathol*, *141*(2-3), 135-146. doi: 10.1016/j.jcpa.2009.04.002
- Weiler, R., Lassmann, H., Fischer, P., Jellinger, K., & Winkler, H. (1990). A high ratio of chromogranin A to synaptin/synaptophysin is a common feature of brains in Alzheimer and Pick disease. *FEBS Lett*, *263*(2), 337-339.
- Willis, M., Leitner, I., Jellinger, K. A., & Marksteiner, J. (2011). Chromogranin peptides in brain diseases. *J Neural Transm (Vienna)*, *118*(5), 727-735. doi: 10.1007/s00702-011-0648-z
- Xiang, W., Windl, O., Westner, I. M., Neumann, M., Zerr, I., Lederer, R. M., & Kretschmar, H. A. (2005). Cerebral gene expression profiles in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol*, *58*(2), 242-257. doi: 10.1002/ana.20551
- Yan, X., Lin, Z., Chen, F., Zhao, X., Chen, H., Ning, Y., & Chen, Y. G. (2009). Human BAMBI cooperates with Smad7 to inhibit transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*, *284*(44), 30097-30104. doi: 10.1074/jbc.M109.049304
- Yasuhara, O., Kawamata, T., Aimi, Y., McGeer, E. G., & McGeer, P. L. (1994). Expression of chromogranin A in lesions in the central nervous system from patients with neurological diseases. *Neurosci Lett*, *170*(1), 13-16.

**Increased circulating microRNAs miR-342-3p
and miR-21-5p in natural sheep prion disease**

*El texto que se describe a continuación se corresponde con el artículo publicado
en la revista científica Journal of General Virology*

*Sanz Rubio, D., López-Pérez, Ó., de Andrés Pablo, Á., Bolea, R., Osta, R., Badiola, J.
J., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I. and Toivonen, J.M. (2017).
J Gen Virol. doi: 10.1099/jgv.0.000685*

Increased circulating microRNAs miR-342-3p and miR-21-5p in natural sheep prion disease

ABSTRACT

Scrapie is a transmissible spongiform encephalopathy (TSE), or prion disease, of sheep and goats. As no simple diagnostic tests are yet available to detect TSEs *in vivo*, easily accessible biomarkers could facilitate the eradication of scrapie agents from the food chain. To this end, we analysed by quantitative reverse transcription PCR a selected set of candidate microRNAs (miRNAs) from circulating blood plasma of naturally-infected, classical scrapie sheep that demonstrated clear scrapie symptoms and pathology. Significant scrapie-associated increase was repeatedly found for miR-342-3p and miR-21-5p. This is the first demonstration, to our knowledge, of circulating miRNA alterations in any animal suffering from TSE. Genome-wide expression studies are warranted to investigate the true depth of miRNA alterations in naturally occurring TSEs especially in presymptomatic animals, as the presented study demonstrates the potential feasibility of miRNAs as circulating TSE biomarkers.

FULL-TEXT

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), also known as prion diseases, are fatal neurodegenerative disorders that include Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and Gerstmann–Sträussler–Scheinker (GSS) syndrome in humans, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle and scrapie in sheep and goats (Colby & Prusiner, 2011). According to the prion hypothesis, TSEs result from misfolding of a native cellular prion protein, PrP^c, encoded by the gene *PRNP*, to an infectious, pathological conformation, PrP^{Sc} (named after PrP Scrapie). This process is template driven and perpetual: conformationally altered PrP^{Sc} molecules can repeatedly convert their correctly folded, soluble counterparts into infectious prion deposits. The *PRNP* gene is highly, although not exclusively, expressed in the central nervous system (CNS) where its pathologically transformed products may spread from cell to cell. The accumulation of PrP^{Sc} in the CNS generally corresponds with the progression of neurodegeneration as evidenced by correlation with severity of common histopathological lesions observed in TSEs, such as neuropil spongiosis, vacuolation and activation of astrocytes and microglia.

Recent work in experimental TSE models warrant further investigation on the yet ill-defined zoonotic potential of scrapie (Cassard *et al.*, 2014; Comoy *et al.*, 2015). To date, there are no epidemiological studies that indicate that scrapie could be transmitted to humans. However, scrapie has both social and economic impact due to its effect on animal health and the resulting practical complications impinge on animal production and surveillance. The current measures for scrapie eradication are selective breeding (to replace susceptible *PRNP* genotypes with resistant ones) and culling of symptomatic, PrP^{Sc}-positive livestock. However, like in human TSE patients and in primate models of prion disease, long incubation periods occur in sheep during which asymptomatic but infected animals are a potential source of disease spread. Scientific opinion by the European Food Safety Authority (EFSA, 2014) suggests that post-mortem testing of infected sheep stocks is not likely to be a sufficient measure to eradicate the disease.

At present, the only biochemical diagnostic marker for TSEs is considered to be PrP^{Sc} accumulation in post-mortem brain tissue or lymphoid tissue. The use of PrP^{Sc} as a preclinical diagnostic biomarker is difficult because the levels of PrP^{Sc} in easily accessible tissues or body fluids are minimal (Kubler *et al.*, 2003). Accumulation of PrP^{Sc} may be detected in the lymphoreticular system of preclinical animals (Beringue *et al.*, 2012). However, this requires genetic predisposition to peripheral PrP^{Sc} accumulation (Schreuder *et al.*, 1998; Androletti *et al.*, 2000) and, hence, may be prone to false negatives as a diagnostic method. Equally, assays based on PrP^{Sc} detection may perform worse for identifying atypical scrapie than classical scrapie cases (Androletti *et al.*, 2011). An ideal biomarker would be one capable of diagnosing all types of TSEs at the clinical and preclinical phases from easily obtainable tissue source.

Alterations in RNA metabolism, including that of microRNAs (miRNAs), are frequently found as contributors in neurodegenerative diseases (Hruska-Plochan *et al.*, 2015). miRNAs are small non-protein-coding RNAs that, as a part of the miRNA-induced silencing complex, regulate gene expression post-transcriptionally and play a critical role in neuronal survival and function (Hebert & De Strooper, 2009). miRNAs have also gained attention as minimally invasive disease biomarkers as they are often secreted by pathologically affected tissues into plasma and other body fluids where they show remarkable stability due to proteic chaperones or vesicular (such as exosomal)

protection from ribonucleases (Mitchell *et al.*, 2008). Interestingly, human PRNP binds essential components of the miRNA-induced silencing complex and promotes its stability or formation (Gibbings *et al.*, 2012). However, it is not known if this interaction is perturbed in TSEs. Only a few studies have investigated how miRNA expression is affected in prion diseases. Brains of mice intracerebrally inoculated with scrapie displayed alterations in 15 miRNAs, including miR-342-3p, let-7b, let-7d, miR-128a and miR-146a (Saba *et al.*, 2008; Saba *et al.*, 2012). miRNA miR-342-3p was also increased in post-mortem brain samples from BSE-infected macaques and in sporadic CJD (sCJD) patients (Montag *et al.*, 2009), and miR-146a was upregulated in sCJD and GSS patients (Lukiw *et al.*, 2011). Studies on hippocampal neurons and synaptoneuroosomes imply that dynamic modulation of miRNAs occurs between the preclinical and terminal stages of the prion disease (Majer *et al.*, 2012; Boese *et al.*, 2016). Finally, exosomes released *in vitro* by prion-infected neuronal cells have altered miRNA profiles (including miR-342-3p, let-7b, miR-128a, miR-21 and miR-146a) compared with non-infected exosomes (Bellingham *et al.*, 2012). If neuronal cells modulate their miRNA release (or secretion) in prion disease also *in vivo*, these could be possibly detected directly from the circulation of animals and humans suffering from TSEs.

Here, the aim was to carry out the first set of experiments in order to investigate circulating miRNA alterations in symptomatic, naturally-infected cases of classical scrapie. Selected candidate miRNAs for the study (Table 1) were based on published data on miRNA alterations in the CNS of mouse models of prion disease (Saba *et al.*, 2008; Lukiw *et al.*, 2011; Majer *et al.*, 2012; Saba *et al.*, 2012; Boese *et al.*, 2016), prion-infected neuronal cells (Bellingham *et al.*, 2012) as well as on very limited data on human sCJD patients (Montag *et al.*, 2009; Lukiw *et al.*, 2011). Breed Rasa Aragonesa of genotype ARQ/ARQ (homozygous for polymorphisms at codons 136, 154, and 171 of the *PRNP* gene) was used as it is the most frequently found genotype in the scrapie-affected animals of this breed (Acin *et al.*, 2004). All classical scrapie animals were at clearly clinical stage and were derived from several regional flocks in Aragón, Spain, and the samples from healthy controls were harvested from the same region but from a flock negative for scrapie history. The mean age (\pm sd) of the scrapie sheep was 37.1 ± 13.4 months and that of control sheep 30.9 ± 4.0 months. None of the sheep was pregnant as this could possibly alter the abundance of circulating miRNAs

(Chim *et al.*, 2008). The whole *PRNP* coding region was sequenced from the experimental sheep to confirm the ARQ genotype and to reveal any other polymorphisms present (Table 2). Earlier described protective polymorphisms in *PRNP* amino acid residues 112 and 141 (Houston *et al.*, 2015) were not found in any of the sheep. However, dimorphic variations in codons 101, 143 and 175 were found, each in one individual sheep. Additionally, two silent polymorphisms at codons 231 and 237 were present in approximately half of the sheep.

Table 1: List of miRNA assays used. “Assay ID” and “Assay name” are as described by the provider (Life Technologies). “miRNA detected” depicts the arm (-5p or -3p) of the mature miRNA detected and the sequence for the corresponding miRNA is shown in the last column

Assay ID	Assay name	miRNA detected	Mature miRNA sequence
476665_mat	chi-miR-342-3p	miR-342-3p	UCUCACACAGAAAUCGCACCCA
000397	hsa-miR-21	miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
002619	hsa-let-7b	let-7b-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGUU
002283	hsa-let-7d	let-7d-5p	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU
002216	hsa-miR-128a	miR-128-3p	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU
000457	hsa-miR-132	miR-132-3p	UACAGUCUACAGCCAUGGUCG
006215_mat	xtr-miR-146	miR-146a-5p	UGAGAACUGAAUCCAUAUGGUU
473715_mat	chi-miR-342-5p	miR-342-5p	AGGGGUGCUAUCUGUGGUUGAGG
006763_mat	dre-miR-16	miR-16-5p	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGAG
00200	cel-miR-39	cel-miR-39-3p	UCACCGGUGUAAAUCAGCUUG

Table 2: Age and *PRNP* genotype of the sheep used. [§]ARQ refers to common classification of *PRNP* genotype based on *PRNP* amino-acid residues 136, 154 and 171. Any additional deviations from the reference sequence are shown with corresponding amino-acid residue number. [&]Codons (Cod) refer to silent DNA polymorphisms observed in this study. Nucleotide sequences of the codons are shown, the variant residues in bold

Group	Animal ID	Age (months)	<i>PRNP</i> genotype [§]	Cod 231 ^{&}	Cod 237 ^{&}
Control	C-R1	34.0	ARQ/ARQ	agg/cgg	ctc/ctg
	C-R2	33.6	ARQ/ARQ		
	C-R3	24.7	ARQ/ARQ _{E175}		
	C-R4	33.3	ARQ/ARQ	agg/cgg	ctc/ctg
	C-R5	26.3	ARQ/ARQ		
	C-R6	31.6	ARQ/ARQ		
	C-R7	33.5	ARQ/ARQ	agg/cgg	ctc/ctg
	C-R8	33.5	ARQ/ARQ	cgg/cgg	ctg/ctg
	C-R9	24.7	ARQ/AR ₁₄₃ RQ		
	C-R10	33.6	R ₁₀₁ ARQ/R ₁₀₁ ARQ	cgg/cgg	ctg/ctg
Scrapie	Sc-726	45.4	ARQ/ARQ	agg/cgg	ctc/ctg
	Sc-728	19.3	ARQ/ARQ	agg/cgg	ctc/ctg
	Sc-731	19.2	ARQ/ARQ		
	Sc-732	19.9	ARQ/ARQ		
	Sc-733	47.5	ARQ/ARQ		
	Sc-737	56.2	ARQ/ARQ	agg/cgg	ctc/ctg
	Sc-738	46.2	ARQ/ARQ		
	Sc-742	35.3	ARQ/ARQ	agg/cgg	ctc/ctg
	Sc-1661	35.2	ARQ/ARQ		
	Sc-1667	17.8	ARQ/ARQ		
	Sc-1690	47.4	ARQ/ARQ	agg/cgg	ctc/ctg
Sc-42349	27.7	ARQ/ARQ			

Using methods previously described (Filali *et al.*, 2011), we first analysed histopathological lesions [spongiosis and vacuolation, haematoxylin and eosin (HE) staining], astrogliosis [glial fibrillary acidic protein (GFAP), rabbit polyclonal antibody Z0334 by Dako] and pathological PrP^{Sc} levels (mAb L42, R-Biopharm) in the medulla oblongata (Mo) and cervical spinal cord (SC) of classical scrapie and control groups (Figure 1). The PrP^{Sc} levels were measured from proteinase-K-digested sections to remove any non-pathological PrP^c. The pathology in each case was quantified as an average score from mild to severe (1-5) in five nuclei of Mo or three regions of SC. Both Mo and SC in classical scrapie sheep were found to be affected to a similar extent for spongiosis (Figure 1A), astrogliosis (Figure 1C) and PrP^{Sc} levels (Figure 1D), whereas vacuolation in Mo was significantly higher than in SC ($P=0.001$) (Figure 1B). Vacuolation or PrP^{Sc} expression was not observed in any of the control sheep. However, spongiosis and GFAP expression were detected at low levels in Mo and SC of controls, and in each case, the levels were significantly lower than those in Mo or SC from classical scrapie sheep ($P<0.0001$). These results demonstrate that scrapie pathology was detected consistently in the two CNS regions of symptomatic classical scrapie sheep but not in control animals.

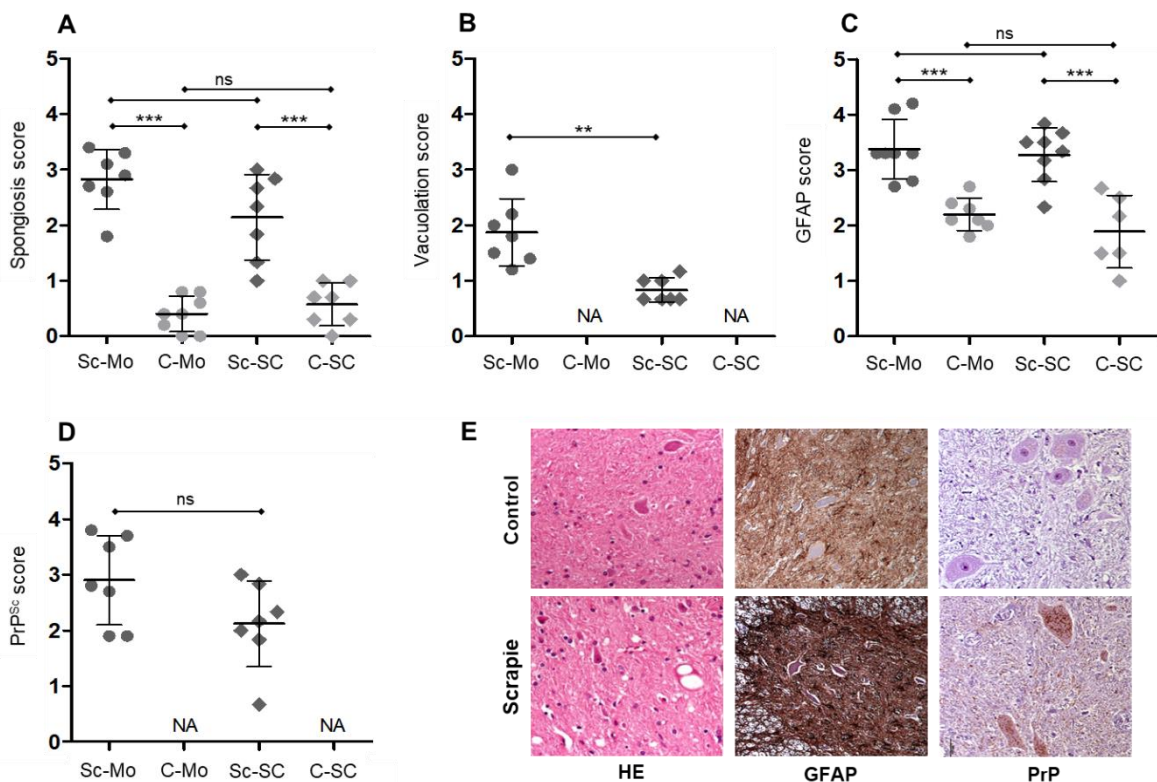


Figure 1 (See legend on next page).

(See figure on previous page).

Figure 1. Scrapie-associated histopathology in the CNS. (A–D) Histopathological scores (1–5) in Mo (circles) and SC (diamonds) of scrapie (Sc, dark grey) and control (C, light grey) sheep. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$). (A) Spongiosis, detected by HE staining, was increased in Mo and SC of scrapie sheep with no significant differences between the two CNS regions within scrapie or control groups. (B) Vacuolation (HE staining) was observed in all scrapie animals but not in controls, and was more pronounced in Mo compared with SC in scrapie sheep. (C) Astrogliosis, as measured by immunohistochemical quantification of GFAP, was increased in Mo and SC of scrapie sheep, but there were not significant differences between the two CNS regions within scrapie or control groups. (D) PrP^{Sc}, as measured by immunohistochemical quantification of pathological, proteinase-K-resistant form of PrP, was observed in all scrapie animals but not in controls, and there were no significant differences between Mo and SC. (E) Representative images demonstrating the presence of scrapie-associated pathology. HE staining for spongiosis and vacuolation and immunohistochemistry for astrogliosis marker (GFAP) and proteinase-K-resistant PrP (PrP) are shown for one control (upper row) and one scrapie animal (lower row).

Next, blood plasma samples from healthy ($n=10$) and classical scrapie ($n=11$) sheep were analysed for the expression of eight candidate miRNAs (let-7b-5p, let-7d-5p, miR-128-3p, miR-132-3p, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-342-3p and miR-342-5p) (Table 1) that were shown earlier to be altered in the brains of intracranially inoculated mice and other models of prion disease (Saba *et al.*, 2008; Montag *et al.*, 2009; Lukiw *et al.*, 2011; Majer *et al.*, 2012; Saba *et al.*, 2012; Boese *et al.*, 2016). One plasma sample from each individual sheep was used, i.e. the number of samples reflects the number of experimental sheep. Briefly, blood was collected to EDTA tubes, plasma was separated by centrifugation at 1300 g for 10 minutes at 4°C and samples were frozen at -80°C within one hour of blood collection. Total RNA was extracted from 0.2 ml plasma using Norgen Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek) modified for plasma samples, as instructed in the kit. After inactivation of nucleases, samples were spiked with 25 fmol synthetic RNA normalizer cel-miR-39 (Qiagen), and 0.7 µl MS2 RNA (Roche) was added as a carrier. Samples were eluted in 100 µl nuclease-free water, from which 9 µl was used as a template to prepare complementary DNA (cDNA) for each miRNA under study using stem-loop primers from TaqMan MicroRNA Assays (Life Technologies) combined with TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). cDNAs were subjected to quantitative PCR in three technical replicate reactions consisting of 2.5 µl 2× TaqMan Fast Universal PCR Master Mix, no AmpErase UNG (Life Technologies), 0.25 µl TaqMan miRNA probe (Life Technologies) and 2.25 µl of cDNA diluted 1:7 in nuclease-free water. Cycling conditions were 95°C for 20 seconds (s) followed by 40 cycles of 95°C for 1 s and 60°C for 20 s. Sample/probe combinations where Ct values exceeded 32 cycles were omitted.

For each sample, the mean Ct of technical replicates for each miRNA was normalized using the mean Ct of spiked-in cel-miR-39. Relative miRNA expression was determined with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen, 2001) using healthy control sheep as calibrators. The statistics were analysed using the Student's (equal variances) or Welch's (unequal variances) *t*-test for normally distributed data and the Mann Whitney U test when the test for normality failed.

Three of the studied miRNAs were significantly increased in the circulation of classical scrapie sheep (Figure 2A). miRNA miR-342-3p was 2.3-fold increased ($P=0.022$, Welch's test), miR-21-5p was 3.3-fold increased ($P=0.007$, Mann Whitney test) and let-7b showed 4.0-fold increase in classical scrapie sheep ($P=0.008$, Mann Whitney test). In the latter, however, the let-7b levels were sufficiently high for reliable quantification ($Ct < 32$) only in 4 out of 12 controls and 11 out of 12 scrapie samples. Additionally, let-7d was detected only in 1 out of 12 control samples (preventing relative quantification), whereas it was detected in 7 out of 12 scrapie samples (data not shown). miRNA miR-128a-3p was not affected and three miRNAs (miR-132-3p, miR-146a and miR-342-5p) were not found at quantifiable levels in any of the plasma samples.

In an attempt to increase the number of reliably detected circulating miRNAs, the experiment was repeated ($n=8$ for each group) with increased volume (1.5 ml) of plasma as a starting material using Norgen Plasma/Serum RNA Purification Midi Kit (Norgen Biotek). In this experiment (Figure 2B), increased circulating levels of miR-342-3p (2.8-fold, $P=0.041$, Student's *t*-test) and miR-21-5p (3.8-fold, $P=0.031$, Welch's test) in scrapie sheep were confirmed. Additionally, let-7b was now detectable in all RNA samples studied. Although there was tendency towards let-7b upregulation in scrapie sheep (3.9-fold increase, similar to the previous experiment), this was not significant ($P=0.205$, Welch's test). miRNAs miR-128a-3p, miR-146a-5p and let-7d were all found at quantifiable levels but were not significantly altered in scrapie sheep.

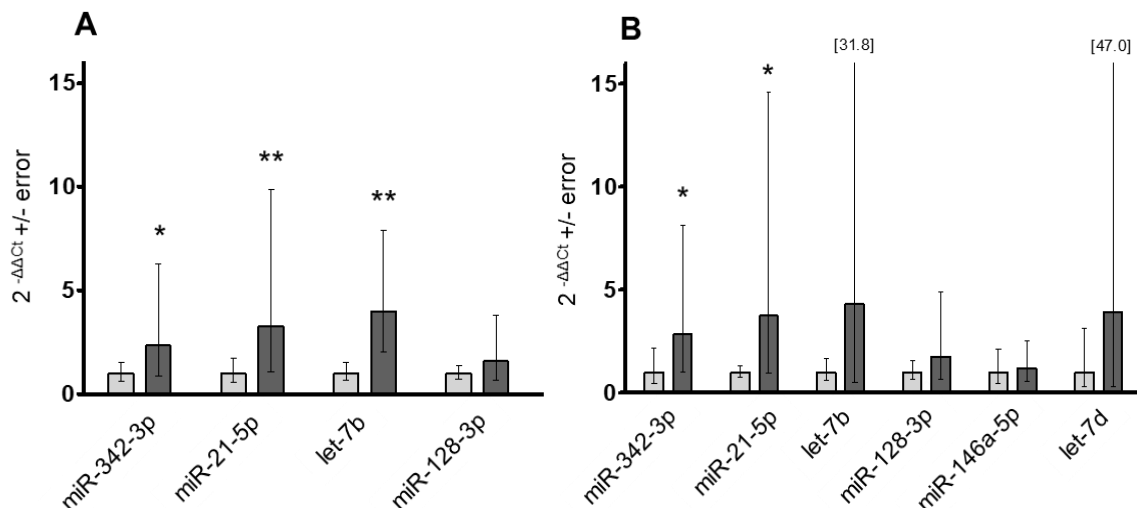


Figure 2. Circulating plasma miRNA alterations in scrapie sheep. Relative expression of miRNAs in blood plasma of scrapie sheep (dark-grey bars) compared with control sheep (light-grey bars) as measured by quantitative RT-PCR. Each plasma sample was normalized (ΔCt) using synthetic, spiked-in cel-miR-39, and the mean ΔCt of the controls was used as a calibrator ($\Delta\Delta\text{Ct}$). (A) First experiment carried out from 0.2 ml plasma. Four miRNAs were found at detectable levels. Significantly increased levels were found for miR-342-3p ($P=0.022$), miR-21-5p ($P=0.007$) and let-7b ($P=0.008$). (B) Repeat experiment carried out from 1.5 ml plasma. Six miRNAs were found at detectable levels. Significantly increased levels were found for miR-342-3p ($P=0.041$) and miR-21-5p ($P=0.031$). Additionally, miRNAs of the let-7 family showed a tendency towards increase but their levels were extremely variable in the scrapie group. Note: for clarity, the value of positive error for let-7b and let-7d is shown in brackets above the bar. The data in both graphs are expressed as a relative expression value after $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ conversion. The error bars represent \pm sd of ΔCt values after $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ conversion, expressed as positive and negative error. Statistical significance was assessed by Student's t -test (equal variances) or Welch's t -test (unequal variances) for normally distributed data and the Mann Whitney U test when the test for normality failed (* $P<0.05$ and ** $P<0.01$).

The two CNS regions studied here displayed clear scrapie pathology, including the presence of PrP^{Sc}. Interestingly, however, we did not find significant alterations in any of the studied candidate miRNAs in the SC of clinical scrapie sheep (Figure 3), although miR-21-5p displayed a close-to-significant increase in the scrapie sheep compared with healthy controls of the same *PRNP* genotype ($P=0.056$, Student's t -test). This may indicate true differences with naturally-infected sheep versus experimentally-infected mice and *in vitro* models. However, it is equally possible that the discrepancy between earlier studies reflects larger variability in naturally infected (non-inoculated) animals. Under experimental inoculation, most animals reach symptomatic stage within a narrow interval depending on the prion strain and dose used. In natural scrapie sheep, however, the incubation period may vary substantially. Additionally, increase or decrease in a specific set of miRNAs may be observed depending on the disease stage in

mouse CNS (Majer *et al.*, 2012; Boese *et al.*, 2016). Due to this dynamic nature of miRNA levels, greater variability in time between infection and clinical disease in natural scrapie cases may mask some differences observed in laboratory models. Last, natural scrapie in the affected flocks spreads most likely by oral transmission, and the route of infection (oral, peripheral or intracerebral) is known to influence neuropathological phenotype (Langevin *et al.*, 2011; Arsac & Baron, 2014). In this respect, it would be important to compare the miRNA profiles of natural scrapie cases (such as those used in here) with those of experimentally-infected scrapie sheep in the future.

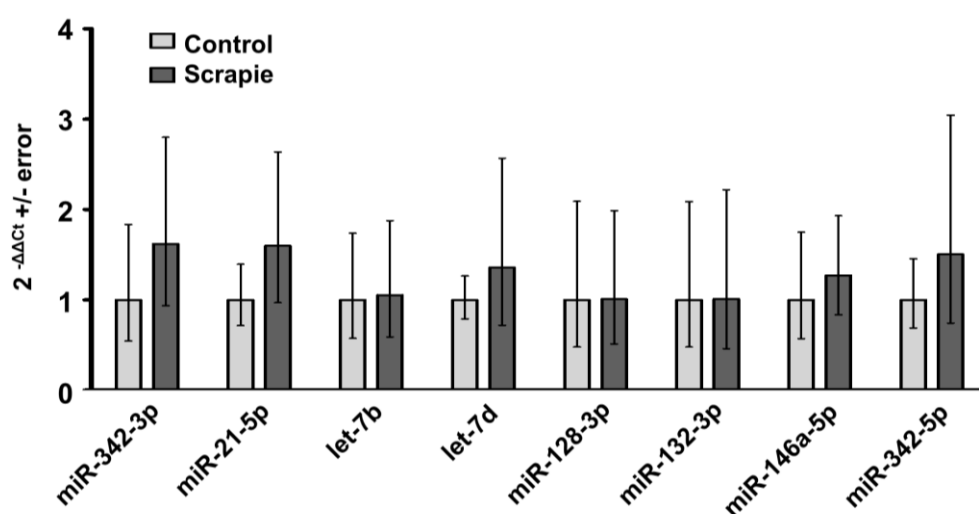


Figure 3. miRNA expression in cervical spinal cord of symptomatic scrapie sheep. Relative expression of miRNAs in cervical spinal cord of scrapie sheep (dark-grey bars) compared with control sheep (light-grey bars) as measured by quantitative RT-PCR. There were no significant differences found, although miR-21-5p showed close-to-significant increase ($P=0.056$, Student's *t*-test). Each sample was normalized (ΔC_t) using stably expressed miR-16-5p, which was selected using NormFinder algorithm (Andersen *et al.*, 2004) due to more stable expression between and within experimental groups as the other considered normalizer, U6 snRNA (stability values for miR-16-5p and U6 snRNA were 0.011 and 0.028, respectively). The mean ΔC_t of the controls was used as a calibrator ($\Delta\Delta C_t$). The data are expressed as a relative expression value after $2^{-\Delta\Delta C_t}$ conversion. The error bars represent \pm sd of ΔC_t values after $2^{-\Delta\Delta C_t}$ conversion, expressed as positive and negative error.

Experiments on neuronal cells suggest that release of miRNAs is altered upon prion infection (Bellingham *et al.*, 2012). If this were to occur *in vivo*, miRNAs could serve as easily accessible biofluid-derived markers of TSEs. However, earlier studies have not explored this possibility. Here, miR-342-3p and miR-21-5p were found to be repeatedly increased in plasma of the natural scrapie sheep, providing the first demonstration of circulating miRNA alterations in any TSE. This suggests that altered

circulating miRNAs may be feasible candidates for TSE biomarkers. Genomic-wide expression studies are required to systematically investigate which miRNAs, if any, show required specificity and sensitivity to serve as tools for TSE detection, especially in the preclinical phase. Interestingly, miR-342-3p and miR-21-5p, as well as let-7b, which were found here to be elevated only in one of the repeat experiments, are also increased in exosomes released *in vitro* by prion-infected neuronal cells (Bellingham *et al.*, 2012). Future studies should address the possible location of these miRNAs in plasma exosomes *in vivo*. In this line of work, close-to-significant increase for miR-21-5p found in the CNS of classical scrapie sheep (Figure 3) may suggest that elevated plasma levels of this miRNA are a consequence of increased expression and release from the CNS. miRNA-21 has not been previously associated with neurodegenerative disorders but is known to be upregulated and protective in traumatic brain injury (Saugstad, 2010), as well as a key mediator of the anti-inflammatory response (Sheedy, 2015).

The elucidation of true depth of miRNA alterations in TSEs, like in many other neurodegenerative diseases, is complicated by yet ill-defined temporal changes in different disease stages. In this light, it remains possible that miRNA alterations found in clinical sheep are not identical to those observed in preclinical stage. To provide useful alternatives for current diagnostic methodology for early scrapie eradication, the next essential step is to conduct similar experiments using preclinical sheep. In addition to classical scrapie, potential miRNA alterations should also be addressed in atypical scrapie sheep. Investigation of circulating miRNAs as TSE biomarkers should preferably employ also complementary models. Parallel experiments with scrapie-inoculated sheep and mouse TSE models should reveal common and model-specific miRNA networks, which could give further indications for their use in translational medicine.

Ethical statement: All the animal procedures were approved by the Ethic Committee for Animal Experiments of the University of Zaragoza (procedure identification numbers PI38/15 and PI40/15). The care and handling of animals was performed according to the Spanish Policy for Animal Protection R.D. 53/2013 and the EU Directive 2010/63.

REFERENCES

- Acin, C., Martin-Burriel, I., Goldmann, W., Lyahyai, J., Monzon, M., Bolea, R., . . . Zaragoza, P. (2004). Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. *J Gen Virol*, *85*(Pt 7), 2103-2110. doi: 10.1099/vir.0.80047-0
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Orntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*, *64*(15), 5245-5250. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
- Andreoletti, O., Berthon, P., Marc, D., Sarradin, P., Grosclaude, J., van Keulen, L., . . . 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., Orge, L., Benestad, S. L., Beringue, V., Litaie, C., Simon, S., . . . Lacroux, C. (2011). Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. *PLoS Pathog*, *7*(2), e1001285. doi: 10.1371/journal.ppat.1001285
- Arsac, J. N., & Baron, T. (2014). Distinct transmissibility features of TSE sources derived from ruminant prion diseases by the oral route in a transgenic mouse model (TgOvPrP4) overexpressing the ovine prion protein. *PLoS One*, *9*(5), e96215. doi: 10.1371/journal.pone.0096215
- Bellingham, S. A., Coleman, B. M., & Hill, A. F. (2012). Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res*, *40*(21), 10937-10949. doi: 10.1093/nar/gks832
- Beringue, V., Herzog, L., Jaumain, E., Reine, F., Sibille, P., Le Dur, A., . . . Laude, H. (2012). Facilitated cross-species transmission of prions in extraneural tissue. *Science*, *335*(6067), 472-475. doi: 10.1126/science.1215659
- Boese, A. S., Saba, R., Campbell, K., Majer, A., Medina, S., Burton, L., . . . 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
- Cassard, H., Torres, J. M., Lacroux, C., Douet, J. Y., Benestad, S. L., Lantier, F., . . . Andreoletti, O. (2014). Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. *Nat Commun*, *5*, 5821. doi: 10.1038/ncomms6821
- Colby, D. W., & Prusiner, S. B. (2011). Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *3*(1), a006833. doi: 10.1101/cshperspect.a006833
- Comoy, E. E., Mikol, J., Luccantoni-Freire, S., Correia, E., Lescoutra-Etchegaray, N., Durand, V., . . . Deslys, J. P. (2015). Transmission of scrapie prions to primate after an extended silent incubation period. *Sci Rep*, *5*, 11573. doi: 10.1038/srep11573

- Chim, S. S., Shing, T. K., Hung, E. C., Leung, T. Y., Lau, T. K., Chiu, R. W., & Lo, Y. M. (2008). Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*, *54*(3), 482-490. doi: 10.1373/clinchem.2007.097972
- EFSA, P. o. B. H. (2014). Scientific Opinion on the scrapie situation in the EU after 10 years of monitoring and control in sheep and goats. *EFSA Journal*, *12*:3781, 3155 pp.
- Filali, H., Martin-Burriel, I., Harders, F., Varona, L., Lyahyai, J., Zaragoza, P., . . . Bolea, R. (2011). Gene expression profiling and association with prion-related lesions in the medulla oblongata of symptomatic natural scrapie animals. *PLoS One*, *6*(5), e19909. doi: 10.1371/journal.pone.0019909
- Gibbings, D., Leblanc, P., Jay, F., Pontier, D., Michel, F., Schwab, Y., . . . Voinnet, O. (2012). Human prion protein binds Argonaute and promotes accumulation of microRNA effector complexes. *Nat Struct Mol Biol*, *19*(5), 517-524, S511. doi: 10.1038/nsmb.2273
- Hebert, S. S., & De Strooper, B. (2009). Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. *Trends Neurosci*, *32*(4), 199-206. doi: 10.1016/j.tins.2008.12.003
- Houston, F., Goldmann, W., Foster, J., Gonzalez, L., Jeffrey, M., & Hunter, N. (2015). Comparative Susceptibility of Sheep of Different Origins, Breeds and PRNP Genotypes to Challenge with Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie. *PLoS One*, *10*(11), e0143251. doi: 10.1371/journal.pone.0143251
- 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
- Kubler, E., Oesch, B., & Raeber, A. J. (2003). Diagnosis of prion diseases. *Br Med Bull*, *66*, 267-279.
- Langevin, C., Andreoletti, O., Le Dur, A., Laude, H., & Beringue, V. (2011). Marked influence of the route of infection on prion strain apparent phenotype in a scrapie transgenic mouse model. *Neurobiol Dis*, *41*(1), 219-225. doi: 10.1016/j.nbd.2010.09.010
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, *25*(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lukiw, W. J., Dua, P., Pogue, A. I., Eicken, C., & Hill, J. M. (2011). Upregulation of micro RNA-146a (miRNA-146a), a marker for inflammatory neurodegeneration, in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) and Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) syndrome. *J Toxicol Environ Health A*, *74*(22-24), 1460-1468. doi: 10.1080/15287394.2011.618973

- Majer, A., Medina, S. J., Niu, Y., Abrenica, B., Manguiat, K. J., Frost, K. 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
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogossova-Agadjanyan, E. L., . . . Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(30), 10513-10518. doi: 10.1073/pnas.0804549105
- 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
- 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
- Saugstad, J. A. (2010). MicroRNAs as effectors of brain function with roles in ischemia and injury, neuroprotection, and neurodegeneration. *J Cereb Blood Flow Metab*, *30*(9), 1564-1576. doi: 10.1038/jcbfm.2010.101
- Schreuder, B. E., van Keulen, L. J., Vromans, M. E., Langeveld, J. P., & Smits, M. A. (1998). Tonsillar biopsy and PrPSc detection in the preclinical diagnosis of scrapie. *Vet Rec*, *142*(21), 564-568.
- Sheedy, F. J. (2015). Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Front Immunol*, *6*, 19. doi: 10.3389/fimmu.2015.00019

**Circulating exosomes as biomarkers in
natural ovine scrapie**

Manuscrito preliminar

*Óscar López Pérez, David Sanz Rubio, Sara Gómez Redrado, Alicia Otero,
Belén Marín, Pilar Zaragoza, Juan José Badiola, Olivier Andréoletti,
Rosa Bolea, Janne Markus Toivonen, Inmaculada Martín Burriel*

Circulating exosomes as biomarkers in natural ovine scrapie

ABSTRACT

Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies (TSE), or prion diseases, is based on the detection of proteinase K (PK)-resistant PrP^{Sc} in post-mortem tissues as indication of infection and disease. Since PrP^{Sc} detection is not considered a reliable method for *in vivo* diagnosis in most TSE, like scrapie of sheep and goats, it is of crucial importance to identify an easily accessible source of biomarkers to provide useful alternatives for current diagnostic methodology. Previously, we demonstrated the alteration of circulating miRNAs in blood plasma of naturally scrapie-infected sheep. Here, using the same natural model, we further investigate the levels of a battery of miRNAs in exosomes derived from plasma and cerebrospinal fluid (CSF) and the presence of PrP^{Sc} to determine the relevance of these vesicles to be potential biomarkers for TSE diagnosis. Significant scrapie-associated increase was found for miR-21-5p in plasma-derived exosomes. We did not observe detectable changes in miRNA expression of exosomes derived from CSF, even though miR-342-3p, miR-146a-5p, miR-128-3p and miR-21-5p displayed higher levels in CSF from scrapie-infected sheep. Although exosomes did not display any enrichment of miRNA levels, the analysis of overexpressed miRNAs in the total biofluid could help in scrapie diagnosis once the presence of the disease is suspected. PrP^{Sc} was not detected in any sample of exosomes derived from plasma, but we found the presence of PrP^{Sc} in most CSF-derived exosomes from clinically-affected sheep, which may represent a potential source of biomarkers for TSEs and may facilitate *in vivo* diagnosis, at least during the clinical stage of the disease.

INTRODUCTION

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are fatal neurodegenerative diseases that affect humans and animals (Prusiner, 1982). TSEs result from misfolding of a native cellular prion protein (PrP^c) to an infectious and pathological conformation (PrP^{Sc}) in a self-propagating reaction (Cohen *et al.*, 1994). Scrapie is a prion disease that affects sheep and goats and it was the first TSE described (Pattison & Jones, 1967). As in other TSEs like bovine spongiform encephalopathy in cattle or variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) and Kuru in humans, in natural scrapie prions enter the body through infection of the gastrointestinal tract, then accumulates in the lymphoreticular system and

access the enteric nervous system (ENS) that seems to be the entry to neural tissues (van Keulen *et al.*, 2000). However, the precise mechanisms that explain prion spread to the central nervous system (CNS) are still not well known.

Exosomes are small vesicles surrounded by membrane with a variable size ranging from 40 to 100 nm (Livshits *et al.*, 2015). These particles are secreted by cells and have been found in body fluids such as urine, breast milk, saliva, blood or cerebrospinal fluid (CSF) (Raposo & Stoorvogel, 2013). Exosomes originate from endosomes, are released by cells and can reprogram surrounding or distant cells after selective taking up (Kalani *et al.*, 2014). Their “cargo”, as it is called the exosome content of proteins, lipids, non-coding RNAs, mRNAs and microRNAs (miRNAs), can be different according to their origin. They contain membrane transport and fusion proteins, tetraspanins and heat-shock proteins that are used as positive markers for exosome characterization (Vlassov *et al.*, 2012).

In vitro studies have demonstrated the release of PrP^c and infectious PrP^{Sc} by different types of infected cells in association with exosomes (Fevrier *et al.*, 2004; Vella *et al.*, 2007; Mattei *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2016), suggesting a potential role of these particles in intercellular transmission, prion spreading and neuroinvasion. The presence of PrP^c among the protein cargo of blood circulating exosomes has been demonstrated in humans (Ritchie *et al.*, 2013) and sheep (Berrone *et al.*, 2015). PrP^{Sc} was first detected by protein misfolding cyclic amplification (PMCA) in extracellular vesicles (EV) isolated from blood plasma of mice infected with mouse-adapted vCJD (Saa *et al.*, 2014) and from 263K scrapie-infected hamsters (Properzi *et al.*, 2015). Besides the demonstration of infectivity in exosomes isolated from murine models infected with prions, to our knowledge, it has never been described in the natural disease, even though the presence of the pathological form of the protein in plasma-derived exosomes was investigated in natural scrapie using Western blot (Berrone *et al.*, 2015). Other techniques more sensitive like PMCA or murine bioassays could elucidate if plasma exosomes harbour the aberrant prion protein in natural scrapie.

Brain pathophysiology is reflected in CSF and the presence of EV in this biofluid represents a potential source of biomarkers for neurological diseases (Chiasserini *et al.*, 2014). The levels of PrP^c in CSF have been considered to be a potential biomarker for several neurodegenerative diseases (Meyne *et al.*, 2009), including total PrP levels in

ovine scrapie (Llorens *et al.*, 2018), as its concentration seems to decrease in CJD affected individuals (Torres *et al.*, 2012; Dorey *et al.*, 2015). It has been reported that ovine CSF-derived exosomes are enriched in PrP^c (Vella *et al.*, 2008) but, to our knowledge the presence of PrP^{Sc} in EV form CSF has not been previously described.

The interest of exosomes in TSEs is not limited to the determination of PrP^{Sc}, which could facilitate diagnosis and be crucial for prion transmission. Proteins and miRNAs are molecular constituents of exosomes and promising biomarkers for many diseases, including neurodegenerative diseases (Toivonen *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017). Exosomes released *in vitro* by prion-infected neuronal cells have altered miRNAs profiles compared to non-infected exosomes (Bellingham *et al.*, 2012). In a previous work, we demonstrated the alteration of circulating miRNAs in plasma of scrapie-infected sheep (Sanz Rubio *et al.*, 2017). If these biomarkers are free in plasma or included in the exosomal fraction is still unknown.

We present here the isolation and characterization of plasma and CSF-derived exosomes obtained from naturally scrapie infected sheep. We analysed, by quantitative PCR, the levels of a battery of miRNAs described to be altered in scrapie and other TSEs (Sanz Rubio *et al.*, 2017), and we compared these levels with those of plasma and CSF. Finally, we determined the presence of PrP^{Sc} in exosomes by PMCA and bioassay.

MATERIALS AND METHODS

Aim, design and setting of the study

The relevance of exosomes as potential biomarkers of prion diseases has only been analysed *in vitro* and in murine models of TSE. The aim of this work was to analyse exosomes from blood and CSF in sheep naturally infected with scrapie, as an animal model of natural TSE. First, we evaluated the presence of PrP^{Sc}, which would facilitate *in vivo* diagnosis. Then, their infectivity was evaluated by bioassay using Tg338 transgenic mice overexpressing the highly susceptible VRQ variant of the ovine *PRNP* gene (Laude *et al.*, 2002). Finally, as miRNA profile in exosomes could change with the pathological status of the individual, we evaluated the presence of a battery of miRNAs described to be altered in CNS of different prion models (Sanz Rubio *et al.*, 2017) in exosomes from control and scrapie sheep as a source of biomarkers.

Animals and sample collection

A total of 60 sheep were used in this study. Most of them were female Rasa Aragonesa sheep, aged between 2 and 9 years and displaying the ARQ/ARQ genotype, which is the most frequently found genotype in scrapie-affected animals of this breed (Acin *et al.*, 2004). This group of animals included 15 negative control sheep, 6 animals at preclinical stage of scrapie disease, 31 at clinical stage and 8 at terminal stage. Table 1 shows the identification, breed, sex, *PRNP* genotype, age, disease status and experimental use of each one of the animals studied.

Plasma was obtained from 15 to 20 ml of blood, which was collected by jugular venepuncture from each animal. Blood was centrifuged 10 min at 1300 g at room temperature (RT) to separate plasma and it was aliquoted and stored at -80°C until analysis. A volume of approximately 15 ml of CSF was obtained from each sheep immediately after sacrifice, using a 10 ml syringe inserted into the cisterna magna and avoiding blood contamination. CSF was also aliquoted and stored at -80°C until analysis.

EV isolation from plasma and CSF

Two commercial kits were used for exosome isolation from plasma: Total Exosome Isolation (from plasma) (Invitrogen) and miRCURY™ Exosome Isolation Kit - Serum and plasma (Exiqon). The initial amount of plasma used for exosome isolation was 250 µl for the first kit and 500 µl for the second one. We followed manufacturer's instructions, with a final resuspension of exosome pellets in 100 µl of PBS (Invitrogen) or 270 µl of Resuspension Buffer (Exiqon). Exosomes isolated with the first kit were subjected to PMCA for PrP^{Sc} detection ($n=24$), whereas those obtained with miRCURY™ kit were used for further RNA extraction and miRNA profiling ($n=16$).

Total Exosome Isolation kit (from other body fluids) (Invitrogen) was used for exosome isolation from CSF for further PMCA analysis ($n=19$), and miRCURY™ Exosome Isolation Kit - Cells, Urine & CSF (Exiqon) was used to isolate exosomes for miRNA profiling ($n=12$). Both kits used a starting sample of 1 ml CSF to precipitate exosomes, with a final resuspension step in 50-75 µl of PBS (Invitrogen) or 100 µl of Resuspension Buffer (Exiqon). In all cases, the purified exosome samples were stored at -20°C until their use.

Table 1: Animals used in this study. Table includes animal ID, breed (Ra: Rasa Aragonesa; O: Ojinegra), sex (M: male; F: female), *PRNP* genotype, age (years), disease status and experimental use of each one (miRNAs analysis of plasma-derived exosomes, miRNAs analysis of CSF-derived exosomes, PMCA of plasma-derived exosomes, PMCA of CSF-derived exosomes and bioassay in Tg338 transgenic mice)

Animal ID	Breed	Sex	<i>PRNP</i> Genotype	Age	Disease status	miRNAs plasma	miRNAs CSF	PMCA plasma	PMCA CSF	Tg338 bioassay
O-1293	Mixed	M	VRQ/VRQ	4	Clinical			Yes		
O-1303	Ra	F	ARQ/ARQ	4	Clinical			Yes		
O-1341	Mixed	F	AHQ/VRQ	3	Negative			Yes	Yes	Yes
O-1342	Mixed	F	ARQ/VRQ	3	Negative			Yes	Yes	
O-1679	Ra	F	(ARQ/ARQ)	5	Clinical			Yes		
O-1680	Ra	F	(ARQ/ARH)	2	Terminal			Yes	Yes	
O-1682	Ra	F	(ARQ/ARQ)	4	Terminal			Yes	Yes	Yes
O-1683	Ra	F	(ARQ/ARH)	2	Clinical			Yes		
O-1690	Ra	F	(ARQ/ARQ)	5	Clinical			Yes		
O-1690	Ra	F	(ARQ/ARQ)	5	Clinical			Yes		
O-1691	Ra	F	(ARQ/ARQ)	5	Terminal			Yes		
O-1692	Ra	F	(ARQ/ARQ)	8	Clinical			Yes	Yes	
O-1694	Ra	F	(ARQ/ARQ)	5	Terminal	Yes		Yes		
O-1695	Ra	F	(ARQ/ARQ)	4	Clinical	Yes		Yes		
O-1696	Ra	F	(ARQ/ARH)	2	Terminal			Yes	Yes	
O-1697	Ra	F	(ARQ/ARQ)	3	Clinical			Yes		
O-1697	Ra	F	(ARQ/ARQ)	3	Clinical			Yes		
O-1701	Ra	F	(ARQ/ARH)	2	Clinical			Yes		
O-1702	Ra	F	(ARQ/ARQ)	3	Clinical	Yes		Yes		
O-1715	Ra	F	(ARQ/ARQ)	4	Clinical			Yes		
O-1735	Ra	F	ARQ/ARQ	9	Clinical			Yes		
O-1769	Ra	F	(ARQ/ARQ)	5	Clinical			Yes		
O-1770	Ra	F	(ARQ/ARQ)	5	Clinical			Yes		
O-1785	Ra	F	(ARQ/ARQ)	4	Clinical			Yes		
O-326	Ra	F	ARQ/ARQ _{141L} /F	5	Preclinical				Yes	
O-580	Ra	F	ARQ/ARQ	3	Preclinical				Yes	
O-400	Ra	F	ARQ/ARQ	4	Preclinical				Yes	
O-868	Ra	F	ARQ/ARQ	2	Preclinical				Yes	
O-895	Ra	F	ARQ/ARQ	4	Preclinical				Yes	
O-931	Ra	F	ARQ/ARQ	1	Preclinical				Yes	
O-992	Ra	F	ARQ/ARQ	7	Clinical				Yes	Yes
O-941	Ra	F	ARQ/ARQ	4	Clinical				Yes	
O-1053	Ra	F	ARQ/ARQ	7	Clinical				Yes	
O-1111	Ra	F	ARQ/ARQ _{143H} /R	3	Clinical				Yes	
O-1112	Ra	F	ARQ/ARQ	3	Clinical				Yes	
O-1404	Ra	F	VRQ/VRQ	4	Clinical				Yes	
O-1685	Ra	F	ARQ/ARQ	2	Clinical	Yes			Yes	
O-647	Ra	F	ARQ/ARQ	8	Clinical		Yes			
O-508	Ra	F	ARQ/ARQ _{143H} /R	13	Clinical		Yes			
O-201	Ra	F	ARQ/ARQ	5	Clinical		Yes			
O-673	O	F	ARQ/ARQ	6	Terminal		Yes			
O-602	Ra	F	ARQ/ARQ	6	Clinical		Yes			
O-520	Ra	F	ARQ/ARQ	5	Clinical		Yes			
O-1753	Ra	F	-----	8	Negative		Yes			
O-1760	Ra	F	-----	8	Negative		Yes			
O-1761	Ra	F	-----	8	Negative	Yes	Yes			
O-1762	Ra	F	-----	7	Negative	Yes	Yes			

O-1751	Ra	F	-----	8	Negative	Yes	Yes			
O-1754	Ra	F	-----	6	Negative		Yes			
O-1767	Ra	F	-----	8	Negative					
O-1768	Ra	F	-----	8	Negative					
O-1684	Ra	F	ARQ/ARQ	2	Terminal	Yes				
O-1667	Ra	F	ARQ/ARQ	2	Clinical	Yes				
O-1681	Ra	F	ARQ/ARQ	2	Terminal	Yes				
O-1669	Ra	F	ARQ/ARQ	5	Clinical	Yes				
O-1752	Ra	F	-----	8	Negative	Yes				
O-1757	Ra	F	-----	6	Negative	Yes				
O-1763	Ra	F	-----	8	Negative	Yes				
O-1756	Ra	F	-----	8	Negative	Yes				
O-1758	Ra	F	-----	7	Negative	Yes				

Exosome characterization

Transmission electron microscopy

Exosome morphology was analysed in two exosome samples obtained from plasma (Animal ID: O-1767 and O-1768) and two from CSF (Animal ID: O-1753 and O-1761). The morphology was evaluated by transmission electron microscopy (TEM) using the methodology previously described by Lasser *et al.* (Lasser *et al.*, 2012; Sanz-Rubio *et al.*, 2018). A volume of resuspended exosomes was fixed in 2.5% glutaraldehyde and then washed with deionized water. Samples were contrasted with 2% uranyl acetate, embedded in 0.13% methyl cellulose and 0.4% uranyl acetate and then visualized using a Tecnai T20 microscope (FEI Company), with a filament of LaB6. The voltage used during the visualization was 200 KV, and acquiring images was performed with a CCD 2 K × 2 K Veleta model (Olympus).

Dynamic light scattering

The size distribution of nanoparticles was evaluated using dynamic light scattering (DLS) assays as previously described (Sanz-Rubio *et al.*, 2018). An aliquot of 25 µl of exosome precipitate was diluted in PBS to a final volume of 500 µl and measured in the NanoBrook 90Plus PALS Particle Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation). Samples were hit by a diode laser of 35 mW, which allowed discrimination of particle sizes between 0.3 nm and 6 µm.

RNA purification and miRNA quantification

Exosomal RNA extraction

After exosome precipitation from plasma ($n=16$, 8 from healthy and 8 from scrapie-infected sheep) using miRCURY™ Exosome Isolation Kit, total exosomal RNA extraction was carried out using miRCURY™ RNA Exosome Isolation Kit-Biofluids (Exiqon). RNA from CSF-derived exosomes ($n=12$, 6 from healthy and 6 from scrapie-infected sheep) was extracted using miRCURY™ RNA Isolation Kit- Cell & Plant (Exiqon). In both cases, we followed the manufacturer's recommendations. Precipitated exosomes were lysed with the appropriate volume of Lysis Solution and subsequently spiked in with a 5.7 μ l of a carrier/spike solution containing 0.5 μ g MS2 RNA and 25 fmol cel-miR-16. At the end of the process, RNA was eluted to 100 μ l Elution Buffer and stored at -80°C for miRNA expression analysis.

Total RNA extraction from CSF

Total RNA was purified from 200 μ l of CSF and 200 μ l of CSF after exosome purification (exosome-depleted CSF) using Total RNA Purification Kit (Norgen) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the samples were lysed with 600 μ l of Lysis Buffer and carrier/spike solution was added as above. After adding 600 μ l ethanol the lysate was passed through RNA binding columns, the bound RNA was washed and eluted to 50 μ l Elution Solution and stored at -80°C for miRNA expression analysis.

Retrotranscription and miRNA amplification

Retrotranscription was performed using specific stem-loop TaqMan MicroRNA Assays (Applied biosystems) for each miRNA and TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems). For each sample, retrotranscription for seven miRNAs and cel-miR-16, used as a "spike-in" normalizer, was performed in a pooled reaction containing 9 μ l of template RNA. Individual miRNAs were quantified using the previously described methodology (Sanz Rubio *et al.*, 2017). Briefly, qPCR was performed in three technical replicate reactions consisting of 2.5 μ l $2\times$ TaqMan Fast Universal PCR Master Mix, no AmpErase UNG (Life Technologies), 0.25 μ l TaqMan miRNA Assay probe (Life Technologies) and 2.25 μ l of complementary DNA diluted 1:5

in nuclease-free water. Cycling conditions were 95°C for 20 s followed by 40 cycles of 95°C for 1 s and 60°C for 20 s. Sample/probe combinations where Ct values exceeded 34 cycles were omitted. For each sample, the mean Ct of technical replicates for each miRNA was normalized using the mean Ct of spiked-in cel-miR-16. Relative miRNA expression was determined with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen, 2001) using healthy control sheep as calibrators. Differences between groups were statistically evaluated using the Student's *t*-test.

PrP^{Sc} determination by PMCA

Presence of PrP^{Sc} in exosomes isolated from plasma (*n*=24: 17 scrapie-infected sheep at clinical stage, 5 at terminal stage and 2 negative controls) and CSF (*n*=19: 8 scrapie-infected sheep at clinical stage, 6 at preclinical stage, 3 at terminal stage and 2 negative controls) was analysed by PMCA, which is aimed at replicating PrP^{Sc} conversion *in vitro*, allowing amplification of minute amounts of prions (Saborio *et al.*, 2001).

We first identified PMCA substrate and conditions that allow highly efficient and specific amplification of the scrapie prions. Uninfected transgenic Tg338 mice expressing ovine PrP^c were used to prepare substrates for PrP^{Sc} amplification of plasma and CSF-derived exosomes. The PrP^c substrate (10% brain lysate) was prepared using a Dounce tissue grinder to completely homogenize the brain tissue in cold PMCA buffer (50 mM tris-HCl, pH 7.4, 5mM EDTA, 300 mM NaCl, 1% Triton X-100). The substrate was left at 4°C for 30 min and then aliquoted and stored at -80°C. To determine the detection limit and sensitivity of the PMCA method used to amplify the PrP^{Sc} present in our samples, we analyse the presence of PrP^{res} in a 10-fold dilution series of brain homogenate from 3 ARQ/ARQ ovine scrapie sheep (Animal ID: O-1680, O-1682 and O-1692) after 3 rounds of PMCA. Brain homogenates were prepared in PBS (10% weight/volume) from medulla oblongata in single-use micro tubes and filtered using a syringe.

PMCA was performed by mixing 5 µl of the seed with 45 µl of substrate per well in a 96-well PCR microplate (Axygen Scientific, USA). One teflon bead (diameter, 2.381 mm) was added to each well. Each sample was run in duplicate in PMCA buffer (1/5, 1/10 and 1/50 dilutions). Amplification was performed in a modified sonicator (QSonica Q700), using a water recirculation system (39.5°C) (Lacroux *et al.*, 2012). Microplates were then submitted to 96 cycles of 10 s sonication (75% power) followed by a 14 min

and 50 s incubation period. After the PMCA round, 5 μ l of the reaction product were added to a new microplate containing 45 μ l of fresh substrate and a new round (96 cycles) was performed. In order to limit the cross-contamination risks that are linked to serial PMCA, lines of unseeded substrate were included on each run and procedures were performed in different rooms using dedicated material. On each PMCA run, a 1/10 dilution series (10^{-3} to 10^{-9} diluted) of one ovine brain homogenate previously described was included to check the amplification performance. A total of 4 rounds of PMCA (24 h each) were performed in this study.

On completion of the PMCA procedure, Dot blot was used to analyse the presence of PrP^{Sc} in each PMCA round. PMCA products (18 μ l) were supplemented with 2 μ l of 3% SDS and treated with proteinase K (PK) (final concentration, 50 μ g/ml) for 1 h at 37°C. Digestion was stopped by adding an equal volume of Laemmli buffer and heating at 95°C for 5 min. A 5- μ l volume of sample was mixed with 25 μ l of 1% SDS. The samples were then vacuum transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was rinsed once with PBS (0.1% Tween 20) and incubated for 30 min in PBST containing 2% BSA. The monoclonal antibody (mAb) Sha31 (1:8000 dilution in PBST+2% BSA), which recognize residues 145-152 (YEDRYYYRE) of PrP, was used for PrP^{res} immunodetection (Feraudet *et al.*, 2005). Antibody binding was detected by incubating the membranes for 20 min with HRP-conjugated anti-mouse (1:5000 dilution; Bio-rad). Immunoblots were developed by enhanced chemiluminescence using ECL reagent (Pierce) and visualized using the Versa Doc Quantity One image analysis system (Bio-Rad).

TeSeE Western blot kit (Bio-Rad, France) was used following the manufacturer's recommendations to analyse the presence of PrP^{res} in the last round of each PMCA procedure. A volume of 20 μ l of PMCA reaction product was mixed with 180 μ l of 10% negative brain sheep homogenate before PrP^{res} extraction, as previously described (Lacroux *et al.*, 2012). PrP^{res} detection was performed using Sha31 mAb conjugated to horseradish peroxidase (0,06 μ g/ml), and ECL substrate (Pierce) was used to reveal peroxidase activity.

Bioassay in Tg338 mice

Exosomes isolated from CSF using both commercial kits were stored at 4°C and used as inocula for the bioassay in transgenic Tg338 mice within the next 48 h. Intracerebral inoculations were performed under gaseous anesthesia using 50- μ l syringes and 25-gauge hypodermic needles inserted into the right parietal lobe, delivering 20 μ l of the inoculum to each animal. Mice were inoculated with CSF derived exosomes obtained with Exiqon kit ($n=9$), CSF derived exosomes obtained with Invitrogen kit ($n=9$) and total CSF ($n=9$). In each group, mice were inoculated with exosomes from a negative-scrapie sheep ($n=3$) and exosomes from two positive-scrapie sheep ($n=6$). To reduce post-inoculation pain, a subcutaneous injection of buprenorphine (0.3 mg/kg) was administered to each mouse before recovery to consciousness. After inoculation, mice were housed in filtered cages and their clinical status was monitored three times a week.

RESULTS**Exosome isolation and characterization**

We successfully isolated exosomes from plasma and CSF using both commercial kits [miRCURY™ Exosome Isolation Kit (Exiqon) and Total Exosome Isolation Kit (Invitrogen)]. Exosomes were visualized using TEM. Figure 1 shows the presence of small spheres with diameters between 30 and 120 nm in samples obtained from both biofluids, CSF (Figure 1A-1D) using both isolation kits, and plasma (Figure 1E-1F) using Exiqon kit. We could not analyse plasma exosomes isolated with Invitrogen kit due to incompatibility between the dilution buffer and fixation reactive. Consistently, DLS assays showed that vesicles isolated from plasma displayed a mean diameter ranging between 43 and 64 nm (Figure 2). DLS intensity profiles showed that the major exosome population obtained with Invitrogen kit was approximately 50-120 nm in diameter. Size of the particles obtained with Exiqon kit was smaller, with a pick in approximately 30 nm. The amount of exosomes isolated from CSF was not high enough to be analysed by DLS.

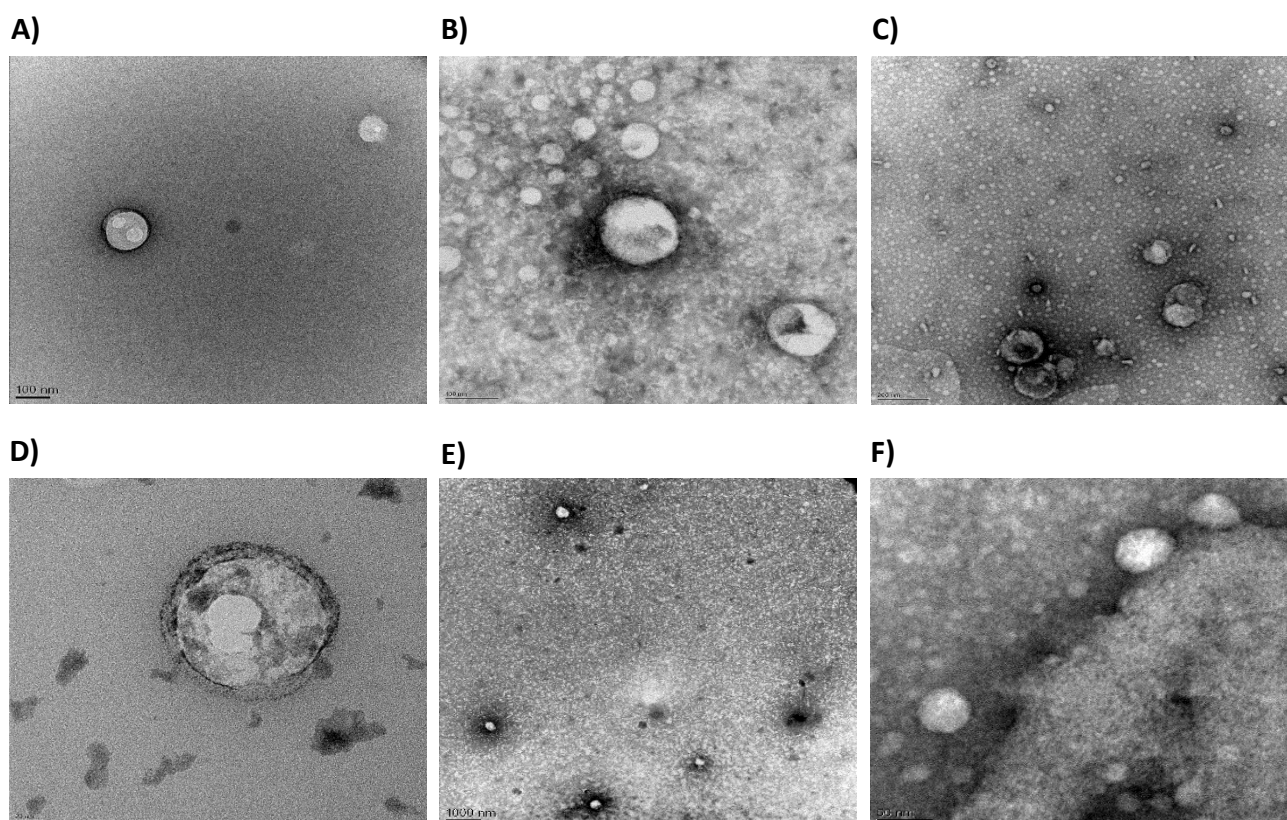


Figure 1. Characterization of exosomes by transmission electron microscopy. (A-D) Exosomes derived from cerebrospinal fluid using Invitrogen isolation kit (A-B) (100 nm) and Exiqon isolation kit (C-D) (200 nm and 20 nm). (E-F) Exosomes derived from blood plasma using Exiqon kit (1000 nm and 50 nm). Images show the presence of small spheres with diameters between 30 and 120 nm.

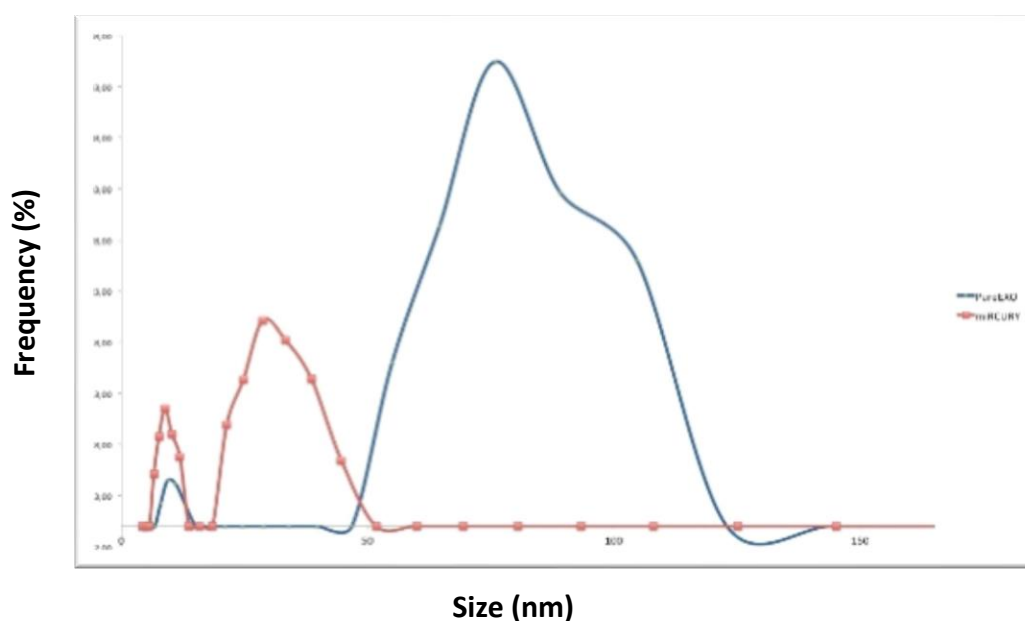


Figure 2. Characterization of exosomes derived from blood plasma by dynamic light scattering. Graph shows that vesicles isolated from plasma displayed a mean diameter ranging between 43 and 64 nm. Intensity profiles showed that the major exosome population obtained with Invitrogen kit (blue line) was approximately 50-120 nm in diameter. Size of the particles obtained with Exiqon kit (red line) was smaller, with a pick in approximately 30 nm. The amount of exosomes isolated from CSF was not high enough to be analysed by DLS.

miRNA profiles in plasma-derived exosomes

We recently described alterations in miRNA profile in plasma from scrapie-infected sheep (Sanz Rubio *et al.*, 2017). In the present work, we have analysed the same set of miRNAs in exosomes isolated from plasma of sheep naturally infected with scrapie. Nine miRNAs were successfully amplified in plasma by qPCR. miR-146a-5p displayed a close-to-significant increase ($P=0.069$) and miR-21-5p was presented in a significant higher amount ($P=0.022$) in exosomes obtained from scrapie-infected sheep (Figure 3).

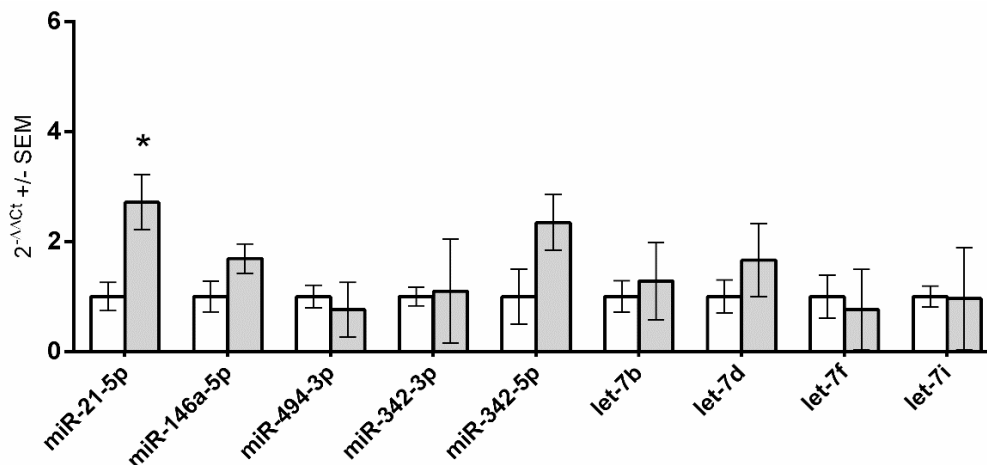


Figure 3. miRNA profiles in plasma-derived exosomes. Relative expression of miRNAs in exosomes derived from blood plasma of scrapie sheep (grey bars) compared with control sheep (white bars) as measured by qPCR. Nine miRNAs were found at detectable levels. miR-146a-5p showed a close-to-significant increase ($P=0.069$) and miR-21-5p ($P=0.022$) was significantly increased in plasma-derived exosomes from scrapie sheep. Samples were normalized (ΔCt) using spiked-in cel-miR-16, and data are expressed as a relative expression value after $2^{-\Delta\Delta Ct}$ conversion using healthy control sheep as calibrators. Statistical significance was assessed by Student's *t*-test (* $P < 0.05$).

miRNA profiles in CSF and CSF-derived exosomes

Six miRNAs were successfully amplified in CSF with a Ct value lower than 34, which was set as a limit for reliable detection. Four of these (i.e. miR-342-3p, miR-146a-5p, miR-128-3p and miR-21-5p) displayed a level significantly higher ($P < 0.05$) in CSF from scrapie-infected sheep compared to healthy control sheep (Figure 4). Moreover, miR-132-3p was detected in 4 out of 6 scrapie CSF whereas it was not detected in CSF from controls (data not shown). With the methodology previously described, we were able to amplify only two miRNAs in exosomes derived from CSF. miR-342-3p was expressed in relatively high levels and miR-486-5p was present in low levels and not detectable in all samples. No changes were detected in exosomal miRNAs between scrapie and control samples.

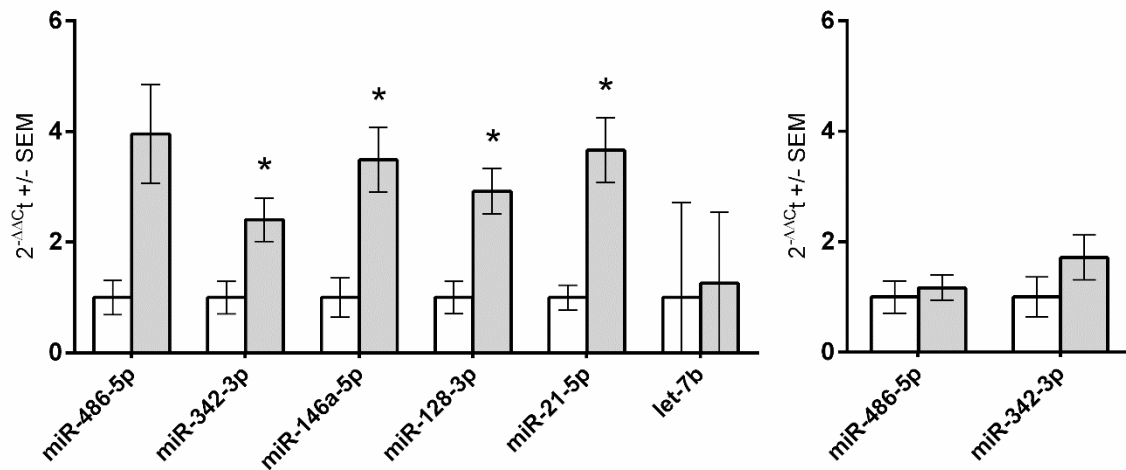


Figure 4. miRNA profiles in cerebrospinal fluid and CSF-derived exosomes. Relative expression of miRNAs in total CSF (left) and exosomes derived from CSF (right) of scrapie sheep (grey bars) compared with control sheep (white bars) as measured by qPCR. Six miRNAs were successfully amplified in CSF with a Ct value lower than 34. miR-342-3p, miR-146a-5p, miR-128-3p and miR-21-5p displayed a level significantly higher ($P < 0.05$) in scrapie-infected sheep compared to healthy control sheep. Only two miRNAs were amplified in exosomes derived from CSF. No changes were detected in exosomal miRNAs between scrapie and control samples. Samples were normalized (ΔCt) using spiked-in cel-miR-16, and data are expressed as a relative expression value after $2^{-\Delta\Delta Ct}$ conversion using healthy control sheep as calibrators. Statistical significance was assessed by Student's *t*-test (* $P < 0.05$).

Detection of PrP^{Sc} in exosomes by PMCA

We performed *in vitro* amplification by PMCA since this method allows amplification of minimal amounts of prion. To assess the utility of this method for amplifying the scrapie prion strain in samples, a 10-fold dilution series of brain homogenate from three scrapie-affected sheep was subjected to 3 successive rounds of PMCA using brain homogenate from transgenic mice expressing the ovine VRQ PrP as a substrate. After 3 rounds of PMCA, PrP^{res} was detected in reactions seeded with a 10^{-7} dilution of the brain homogenate (Figure 5). A 1/10 dilution series of one of these ovine brain homogenates was subsequently included on each PMCA run to check the amplification performance.

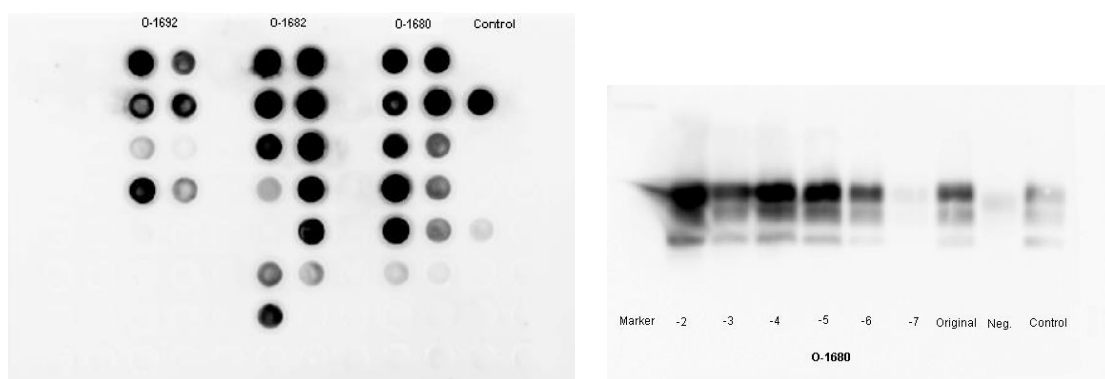


Figure 5 (See legend on next page).

(See figure on previous page).

Figure 5. PrP^{res} detection by Dot blot (left) and Western blot (right) in PMCA reactions seeded with serially diluted (10⁻²-10⁻⁹) brain homogenate from three scrapie-infected sheep. After 3 rounds of PMCA, PrP^{res} was amplified in reactions seeded with a 10⁻⁷ dilution of the original brain homogenate from scrapie-infected sheep, demonstrating the sensitivity of the PMCA protocol used to detect ovine scrapie prions. The monoclonal Sha31 antibody was used for immunodetection. A PK digested classical scrapie isolate (Dawson strain) was used as positive control (Control).

A total of 24 exosomal samples derived from plasma were analysed by PMCA. After 4 rounds of amplification, no PK-resistant abnormal PrP could be detected by Dot blot or Western blot in any sample, whereas the original brain homogenate displayed positivity in a 10⁻⁷ to 10⁻⁸ dilution, suggesting that the presence of PrP^{Sc} of plasma-derived exosomes, if any, is at least 8 log₁₀-fold lower than that detected in sheep brains (Figure 6). Positivity was detected in one unseeded control and one seeded well. The Western blot PrP^{res} pattern (glycoprofile and mobility) in positive reactions was typical of scrapie prion and identical to that observed in the original brain homogenate. The experiment was repeated for the positive seeded sample, and no PrP^{res} was detected after 4 PMCA rounds, making a cross contamination between wells a likely explanation (Figure 7).

On the contrary, after 4 rounds of PMCA, PrP^{res} was detected in reactions seeded with CSF-derived exosomes in 6 out of 8 samples from clinically-affected sheep and 3 out of 3 samples from sheep at terminal stage (Figure 7). However, PrP^{res} was detected only in 1 out of 6 exosome samples obtained from CSF of preclinical scrapie sheep. No PrP^{res} signal was detected in reactions seeded with CSF-derived exosomes from the negative control sheep, confirming the specificity of the technique. The Western blot electrophoretic PrP^{res} pattern observed after PMCA amplification was indistinguishable from that observed in the original brain homogenate, displaying a PrP^{res} molecular signature consistent with classical scrapie prions characterized by a three-banded pattern with a 21 kDa unglycosylated band.

After PMCA, CSF-derived exosomes from one negative control sheep and two scrapie-infected sheep were also tested for infectivity by bioassay in transgenic mice expressing ovine PrP (Tg338 mice), and to date, these experiments are still ongoing.

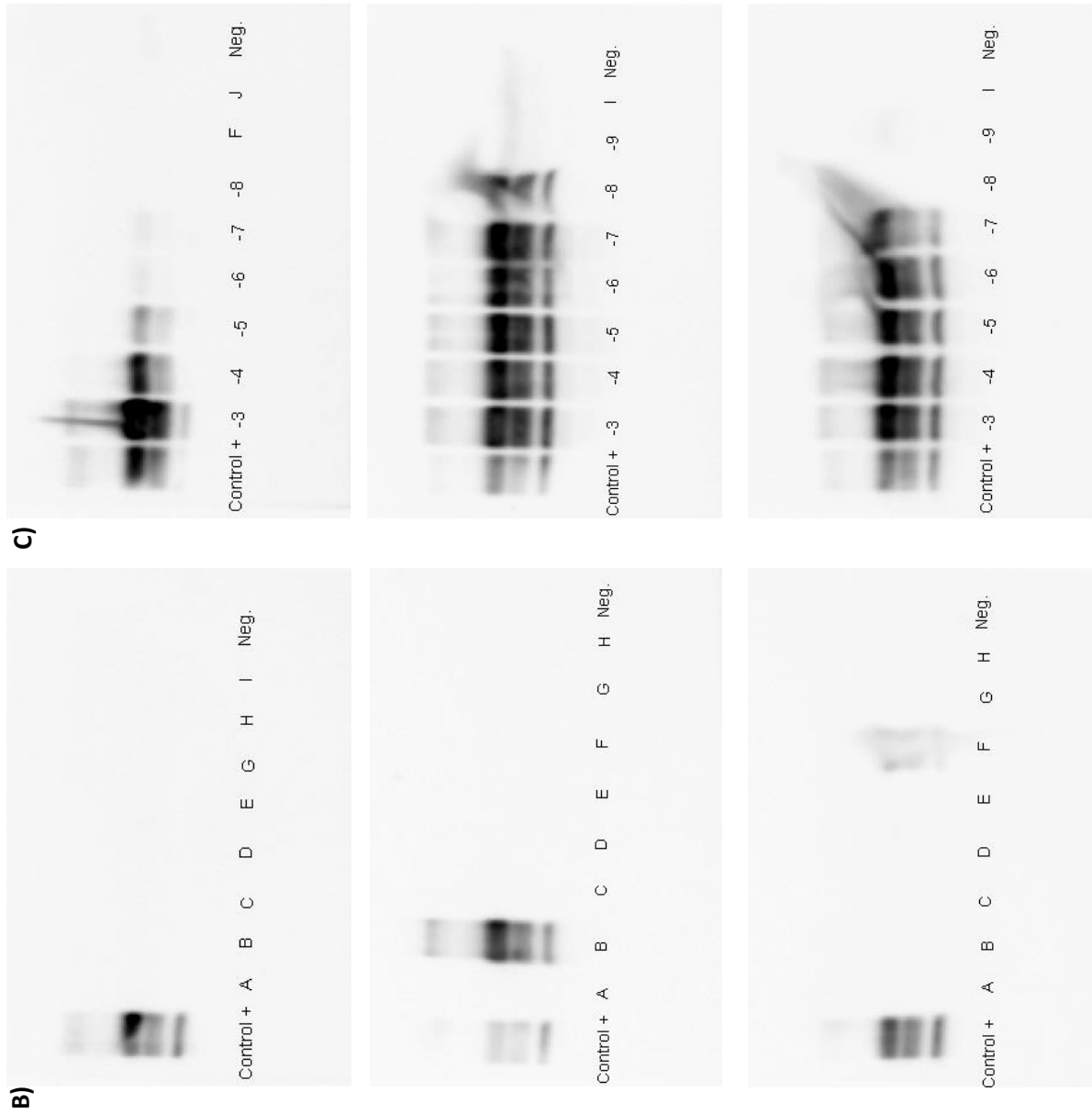
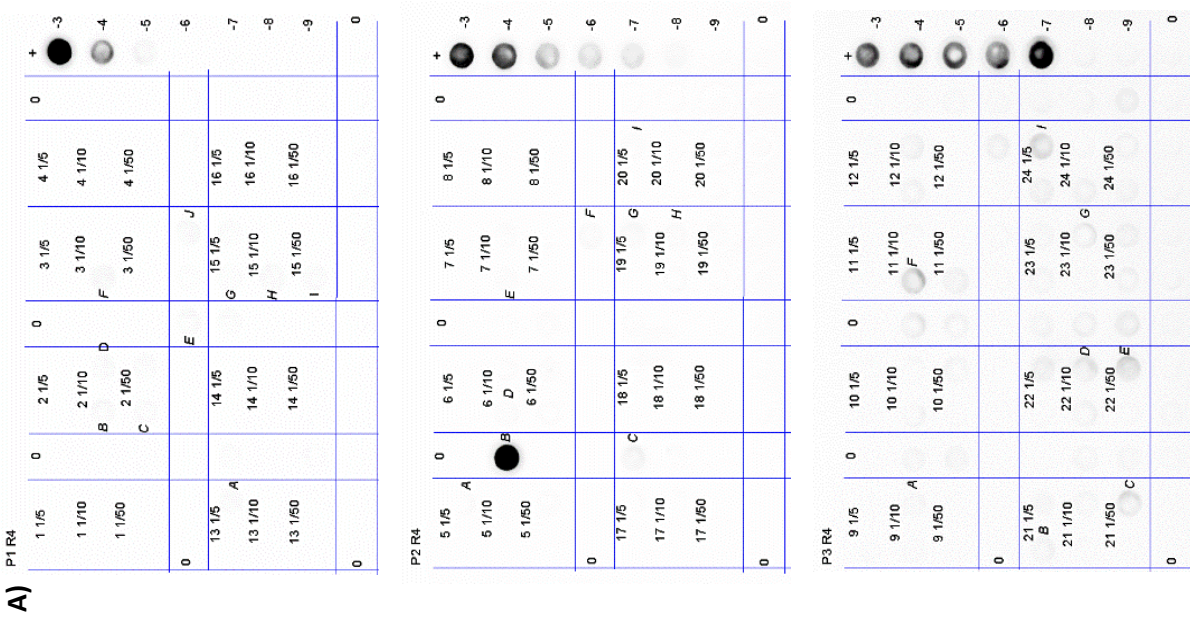


Figure 6. Detection of the proteinase K-resistant core fragment (PrP^{res}) of the pathologic prion by Dot blot (A) and Western blot (B-C) in PMCA reactions seeded with serially diluted (1/5, 1/10 and 1/50) plasma-derived exosomes obtained from scrapie-affected sheep. (A) Some dots (A-I) were subjected to Western blot for PrP^{res} detection. (B) Some dots (A-I) were subjected to Western blot for PrP^{res} detection. (C) PrP^{res} Western blot profile from the original samples of plasma-derived exosomes. (B) Some dots (A-I) were subjected to Western blot for PrP^{res} detection. No PrP^{res} was detected in plasma-derived exosomes. Immunodetection was performed using the monoclonal Sha31 antibody. A PK-digested classical scrapie isolate (Dawson strain) was used as positive control (Control +).

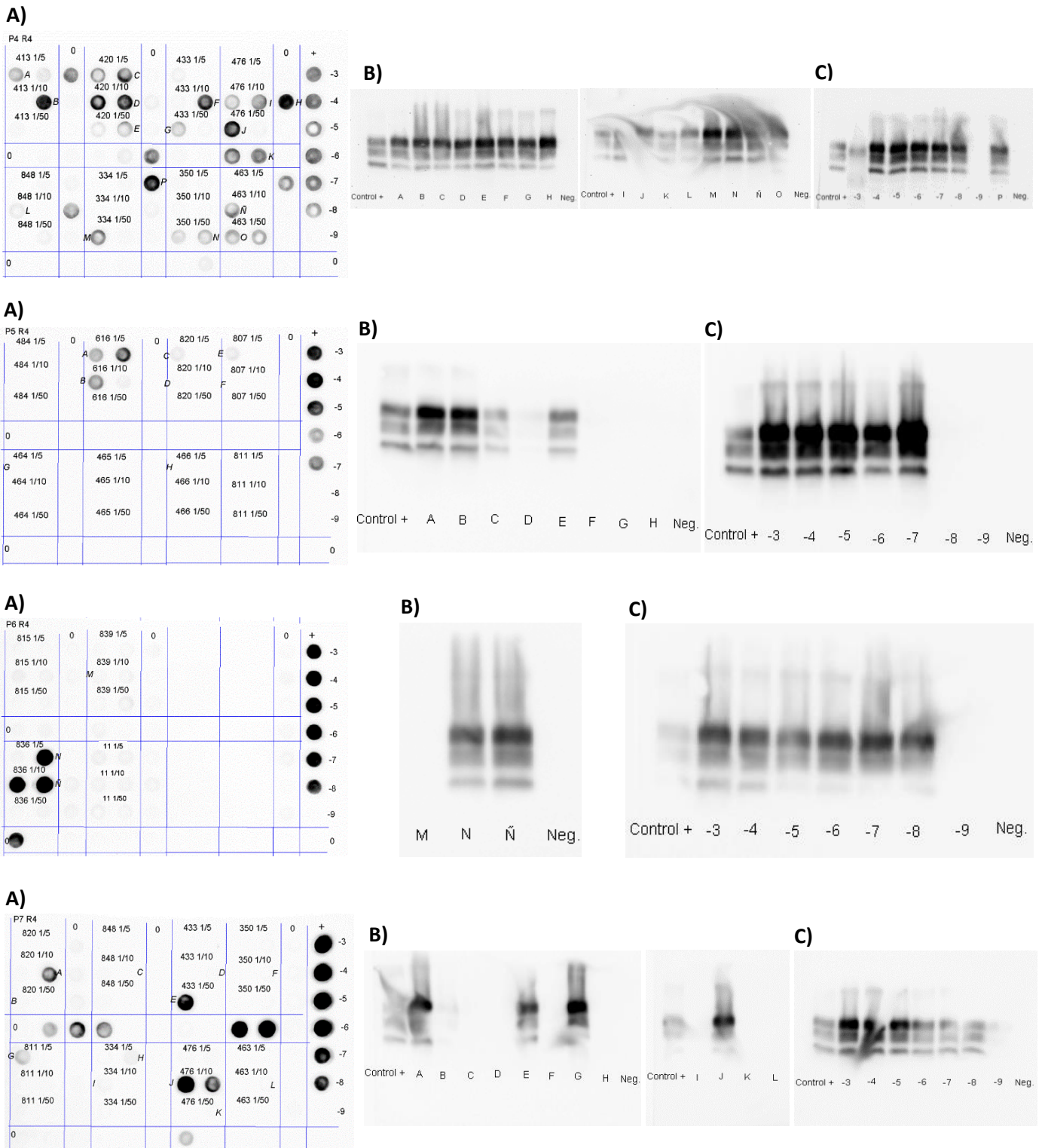


Figure 7. Detection of the proteinase K-resistant core fragment (PrP^{res}) of the pathologic prion by Dot blot (A) and Western blot (B-C) in PMCA reactions seeded with serially diluted (1/5, 1/10 and 1/50) CSF-derived exosomes obtained from scrapie-affected sheep. (A) Dot blot after 4 PMCA rounds of CSF-derived exosomes. (B) Some dots (A-O) were subjected to Western blot for PrP^{res} detection. (C) PrP^{res} Western blot profile from the original scrapie sheep brain homogenate from 10⁻³ to 10⁻⁹ dilution is shown for comparison. PrP^{res} was detected in reactions seeded with CSF-derived exosomes in 6 out of 8 samples from clinically-affected sheep (P4 R4 413, 420, 433, 476; P5 R4 616; P5 R4 and P7 R4 820) and 3 out of 3 samples from sheep at terminal stage (P5 R4 807; P6 R4 836; P7 R4 811). PrP^{res} was detected only in 1 out of 6 exosome samples obtained from CSF of preclinical scrapie sheep (P4 R4 and P7 R4 350). No PrP^{res} signal was detected in reactions seeded with CSF-derived exosomes from the negative control sheep (P6 R4 839; P7 R4 848). In addition, one sample of plasma-derived exosomes (P6 R4 sample 11) was repeated and no PrP^{res} was detected. Immunodetection was performed using the monoclonal Sha31 antibody. A PK-digested classical scrapie isolate (Dawson strain) was used as positive control (Control +).

DISCUSSION

Exosomes are microvesicles secreted by cells under physiological and pathological conditions. Their protein and nucleic acid content, or cargo, is altered in disease and have been postulated as a source of potential biomarkers in many diseases, including neurodegenerative diseases (Kanninen *et al.*, 2016). miRNAs are small RNA molecules that produce a post-transcriptional regulation of target genes (Lee *et al.*, 1993), they are present in exosomal cargo and it seems that loading of miRNAs into exosomes is not a random process (Bhome *et al.*, 2018). Altered miRNA profiles in CSF or blood exosomes associated with neurodegenerative disorders have revealed new biomarkers in the diagnosis of Alzheimer's disease (AD) (Liu *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017), amyotrophic lateral sclerosis (Toivonen *et al.*, 2014) or Parkinson's disease (PD) (Khoo *et al.*, 2012). We have investigated here the potentiality of circulating exosomes for the diagnosis of ovine scrapie.

miRNA profiles are changed in the CNS of different TSE models (Saba *et al.*, 2008; Saba *et al.*, 2012) and in brains from CJD patients (Montag *et al.*, 2009; Lukiw *et al.*, 2011). In a previous work, we identified two altered miRNAs in plasma from sheep showing clinical signs of scrapie (Sanz Rubio *et al.*, 2017). Here, we analysed the same set of miRNAs that were previously reported to be altered in prion infected animals in plasma-derived exosomes. First, we isolated exosomes using commercial kits. The presence of exosomes in the precipitate was confirmed by TEM. In general, bilipid layer-enclosed vesicles with a size range that matches with the one described for these particles were observed in the samples (Livshits *et al.*, 2015). We did not observe any enrichment of miRNA levels in exosomes and only the amount of miR-21-5p differed between control and scrapie plasma. Exosome-shuttling miR-21 has been proposed as a potential biomarker for many diseases including a prognostic biomarker for esophageal cancer patients (Liao *et al.*, 2016), or even as a universal biomarker to identify cancers (J. Shi, 2016). Due to its effects on cardiac contractility and calcium handling, exosomal miRNA secreted by mesenchymal stem cells have been proposed as possible therapy for future stem cell-based cardiotherapies (Mayourian *et al.*, 2018). However, neurotoxicity for exosomal miR-21-5p linked to simian immunodeficiency virus has also been proposed (Yelamanchili *et al.*, 2015). miR-21-5p is one of the most abundant miRNAs in all kind of exosomes and the increase of this miRNA associated to different cancers could be

linked to the increment in exosome production of cancer cells (Ren *et al.*, 2017). It could be plausible that the overexpression observed here was also due to an increment in exosome release linked to the disease and not to specific packaging of this miRNA by scrapie infected or reactive cells.

Changes in CSF circulating miRNAs have also been associated with different neurodegenerative diseases, being miRNA profiles able to discriminate AD from control patients (Lusardi *et al.*, 2017). Analysing the same set of markers, we show here for the first time a different miRNA profile in CSF of sheep naturally infected with scrapie. The levels of four miRNAs were significantly increased in scrapie-CSF. This higher number of changes could be expected due to the direct interaction between CSF and brain extracellular space. Once again, miR-21-5p appeared to be upregulated in scrapie. miR-21-5p levels have been shown to be increased, among others, in CSF of acute encephalitis patients infected with Japanese Encephalitis virus (Goswami *et al.*, 2017), temporal lobe epilepsy (Raouf *et al.*, 2017) and glioma (Baraniskin *et al.*, 2012). Its increase in a wide range of pathologies makes miR-21-5p lose its potential as a biomarker.

Another miRNA, miR-342-3p was upregulated in scrapie CSF. Similarly, miR-342-3p levels are increased in encephalitis patients (Goswami *et al.*, 2017), but it is downregulated in plasma from AD patients (Kumar & Reddy, 2016). The expression of this miRNA is also increased in brains from CJD patients and murine models of prion disease, which may be a general phenomenon in the late stage of prion infection and might be used as a novel biomarker for animal and human TSEs (Montag *et al.*, 2009). Our studies, both in plasma and CSF, confirm the potentiality of this miRNA as scrapie biomarker. Accordingly, the levels of miR-146a-5p augmented in CSF of AD patients (Kumar & Reddy, 2016). This miRNA, which is overexpressed in murine brain tissues infected with prions, seems to modulate microglial activation state (Saba *et al.*, 2012). However, it has also been shown to play a role on inflammation, myeloid cell proliferation and oncogenic transformation (Boldin *et al.*, 2011). In addition, high levels of miR-128-3p have also been related with other neuropathologies like patients with acute ischemic stroke (Sorensen *et al.*, 2017). This miRNA is released in exosomes from prion-infected neuronal cells (Bellingham *et al.*, 2012) and targets ATG1 to activate autophagy in brain cells after ischemia reperfusion (L. Shi *et al.*, 2016). Finally, miR-132-3p, which was amplified only in scrapie sheep, regulates neuronal differentiation and functioning, and

participates in axon growth, neuronal migration and plasticity (Qian *et al.*, 2017). This miRNA is in significant decline in the CNS of AD patients in early stages of the disease (Luikart *et al.*, 2011) and in patients with progressive supranuclear palsy, a tauopathy disorder (Smith *et al.*, 2011). On the contrary, a significant increase of miR-132-3p has been observed in a rat model of PD (Lungu *et al.*, 2013). An abnormal transcription of miR-132-3p is observed at early phases of infection of hippocampal CA1 neurons infected with prions (Majer *et al.*, 2012). Our results indicate that this miRNA can play a role in the pathogenesis of prion diseases *in vivo*.

Isolation of CSF-derived exosomes for further miRNA quantification did not ameliorate amplification signals. Only two miRNAs were properly amplified and no differences were detected between scrapie and control exosomes. Although the amount of exosomes in CSF was very low, we could visualize them by TEM, showing the expecting size. A previous concentration of CSF could ameliorate exosome isolation. Although it is difficult to compare levels of miRNAs in total CSF and CSF-derived exosomes, we used four times the volume of CSF used for RNA extraction to isolate exosomes. Then, for this set of miRNAs, the amount of cell-free miRNAs was much higher than EV-incorporated miRNAs.

Taken our results and those of others together, overexpressed miRNAs analysed in this work could be biomarkers of brain damage but they are not specific of prion diseases. The analysis of this battery of miRNAs could help in scrapie diagnosis once the presence of the disease is suspected. The study of this battery in preclinical stages of sheep experimentally inoculated with scrapie could validate the reliability of these biomarkers. Although the use of CSF is not a choice for scrapie diagnosis, our results could help in CJD diagnosis.

Since the spread of prion infection from peripheral tissues to the CNS follows neuroanatomical pathways (Glatzel *et al.*, 2004), it is important to deciphering the neuronal transport mechanisms. *In vitro* studies have suggested that PrP^{Sc} can be released from cells in exosome-infectious vesicles, providing a potential mechanism for the spread of infectivity between cells (Fevrier *et al.*, 2004; Leblanc *et al.*, 2006; Veith *et al.*, 2009). However, the mechanisms underlying PrP^{Sc} trafficking between and within neuronal cells are not well defined *in vivo*. Blood has been shown to contain disease-associated PrP^{Sc} in naturally and experimentally infected sheep (Bannach *et al.*, 2012; Lacroux *et al.*, 2012;

Halliez *et al.*, 2014; Dassanayake *et al.*, 2016), and in humans infected with vCJD (Edgeworth *et al.*, 2011; Lacroux *et al.*, 2014). Moreover, PrP^{Sc} has been detected in EV preparations containing exosomes from plasma of mice infected with mouse-adapted prions by PMCA, suggesting that exosomes may have a relevant role in carrying PrP^{Sc} in blood (Cervenakova *et al.*, 2016). Here, the presence of the pathological form of the protein in plasma-derived exosomes has been investigated in the natural disease. After 4 rounds of PMCA, no PrP^{res} could be detected in any sample, whereas the original brain homogenate displayed positivity in a 10⁻⁷ to 10⁻⁸ dilution, suggesting that the presence of PrP^{Sc} of plasma-derived exosomes, if any, is at least 8 log₁₀-fold lower than that detected in sheep brains. Our results certainly indicate that plasma-derived exosomes do not seem to represent a useful tool for natural scrapie diagnosis. In addition, although the haematogenous route has been proposed to represent a parallel or alternative pathway to ascending infection via the ENS/autonomic nervous system (Siso *et al.*, 2009), the data present herein show that the exosome fraction of blood plasma may not be involved in this route of neuroinvasion. Further experiments using samples from preclinical animals are needed to clarify whether these vesicles participate in this pathway during the early stages of prion infection.

On the other hand, ovine CSF-derived exosomes seem to be enriched in PrP^c (Vella *et al.*, 2008), but the presence of PrP^{Sc} in these vesicles has not been described. In this work, we detected the pathological form of the protein in CSF-derived exosomes after 4 rounds of amplification, in 6 out of 8 samples from clinically-affected sheep and 3 out of 3 samples from sheep at terminal stage. Unfortunately, PrP^{res} was detected only in 1 out of 6 exosome samples obtained from CSF of preclinical scrapie sheep. Our findings suggest that the presence of PrP^{Sc} in exosomes derived from CSF may represent a potential source of biomarkers for TSEs and may facilitate *in vivo* diagnosis, at least during the clinical stage of the disease. Further studies are required, involving the amplification of PrP^{Sc} also in total CSF to compare it with that of enriched exosome fraction in order to elucidate the potential of CSF-derived exosomes to be feasible biomarkers, which in the end is likely to contribute in providing useful alternatives for current TSE diagnosis methodology.

Ethics statement: All experimental procedures performed in animals were approved by the Ethics Committee for Animal Experiments of the University of Zaragoza (Permit

Number: PI03/12). The care and use of experimental animals were performed in strict accordance with the national law (R.D. 53/2013).

REFERENCES

- Acin, C., Martin-Burriel, I., Goldmann, W., Lyahyai, J., Monzon, M., Bolea, R., . . . Zaragoza, P. (2004). Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. *J Gen Virol*, *85*(Pt 7), 2103-2110. doi: 10.1099/vir.0.80047-0
- Bannach, O., Birkmann, E., Reinartz, E., Jaeger, K. E., Langeveld, J. P., Rohwer, R. G., . . . Riesner, D. (2012). Detection of prion protein particles in blood plasma of scrapie infected sheep. *PLoS One*, *7*(5), e36620. doi: 10.1371/journal.pone.0036620
- Baraniskin, A., Kuhnhen, J., Schlegel, U., Maghnouj, A., Zollner, H., Schmiegel, W., . . . Schroers, R. (2012). Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as biomarker for the diagnosis of glioma. *Neuro Oncol*, *14*(1), 29-33. doi: 10.1093/neuonc/nor169
- Bellingham, S. A., Coleman, B. M., & Hill, A. F. (2012). Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res*, *40*(21), 10937-10949. doi: 10.1093/nar/gks832
- Berrone, E., Corona, C., Mazza, M., Vallino Costassa, E., Faro, M. L., Properzi, F., . . . Casalone, C. (2015). Detection of cellular prion protein in exosomes derived from ovine plasma. *J Gen Virol*, *96*(12), 3698-3702. doi: 10.1099/jgv.0.000291
- Bhome, R., Del Vecchio, F., Lee, G. H., Bullock, M. D., Primrose, J. N., Sayan, A. E., & Mirnezami, A. H. (2018). Exosomal microRNAs (exomiRs): Small molecules with a big role in cancer. *Cancer Lett*, *420*, 228-235. doi: 10.1016/j.canlet.2018.02.002
- Boldin, M. P., Taganov, K. D., Rao, D. S., Yang, L., Zhao, J. L., Kalwani, M., . . . Baltimore, D. (2011). miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med*, *208*(6), 1189-1201. doi: 10.1084/jem.20101823
- Cervenakova, L., Saa, P., Yakovleva, O., Vasilyeva, I., de Castro, J., Brown, P., & Dodd, R. (2016). Are prions transported by plasma exosomes? *Transfus Apher Sci*, *55*(1), 70-83. doi: 10.1016/j.transci.2016.07.013
- Cohen, F. E., Pan, K. M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R. J., & Prusiner, S. B. (1994). Structural clues to prion replication. *Science*, *264*(5158), 530-531.
- Chen, J. J., Zhao, B., Zhao, J., & Li, S. (2017). Potential Roles of Exosomal MicroRNAs as Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Application in Alzheimer's Disease. *Neural Plast*, *2017*, 7027380. doi: 10.1155/2017/7027380
- Chiasserini, D., van Weering, J. R., Piersma, S. R., Pham, T. V., Malekzadeh, A., Teunissen, C. E., . . . Jimenez, C. R. (2014). Proteomic analysis of cerebrospinal fluid extracellular

- vesicles: a comprehensive dataset. *J Proteomics*, 106, 191-204. doi: 10.1016/j.jprot.2014.04.028
- Dassanayake, R. P., Madsen-Bouterse, S. A., Truscott, T. C., Zhuang, D., Mousel, M. R., Davis, W. C., & Schneider, D. A. (2016). Classical scrapie prions are associated with peripheral blood monocytes and T-lymphocytes from naturally infected sheep. *BMC Vet Res*, 12, 27. doi: 10.1186/s12917-016-0651-6
- Dorey, A., Tholance, Y., Vighetto, A., Perret-Liaudet, A., Lachman, I., Krolak-Salmon, P., . . . 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
- Edgeworth, J. A., Farmer, M., Sicilia, A., Tavares, P., Beck, J., Campbell, T., . . . Jackson, G. S. (2011). Detection of prion infection in variant Creutzfeldt-Jakob disease: a blood-based assay. *Lancet*, 377(9764), 487-493. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62308-2
- Feraudet, C., Morel, N., Simon, S., Volland, H., Frobert, Y., Creminon, C., . . . 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
- Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., . . . Raposo, G. (2004). Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(26), 9683-9688. doi: 10.1073/pnas.0308413101
- Glatzel, M., Giger, O., Braun, N., & Aguzzi, A. (2004). The peripheral nervous system and the pathogenesis of prion diseases. *Curr Mol Med*, 4(4), 355-359.
- Goswami, S., Banerjee, A., Kumari, B., Bandopadhyay, B., Bhattacharya, N., Basu, N., . . . Banerjee, A. (2017). Differential Expression and Significance of Circulating microRNAs in Cerebrospinal Fluid of Acute Encephalitis Patients Infected with Japanese Encephalitis Virus. *Mol Neurobiol*, 54(2), 1541-1551. doi: 10.1007/s12035-016-9764-y
- Guo, B. B., Bellingham, S. A., & Hill, A. F. (2016). Stimulating the Release of Exosomes Increases the Intercellular Transfer of Prions. *J Biol Chem*, 291(10), 5128-5137. doi: 10.1074/jbc.M115.684258
- Halliez, S., Jaumain, E., Huor, A., Douet, J. Y., Lugan, S., Cassard, H., . . . Vilette, D. (2014). White blood cell-based detection of asymptomatic scrapie infection by ex vivo assays. *PLoS One*, 9(8), e104287. doi: 10.1371/journal.pone.0104287
- Kalani, A., Tyagi, A., & Tyagi, N. (2014). Exosomes: mediators of neurodegeneration, neuroprotection and therapeutics. *Mol Neurobiol*, 49(1), 590-600. doi: 10.1007/s12035-013-8544-1

- Kanninen, K. M., Bister, N., Koistinaho, J., & Malm, T. (2016). Exosomes as new diagnostic tools in CNS diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1862(3), 403-410. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.09.020
- Khoo, S. K., Petillo, D., Kang, U. J., Resau, J. H., Berryhill, B., Linder, J., . . . Tan, A. C. (2012). Plasma-based circulating MicroRNA biomarkers for Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*, 2(4), 321-331. doi: 10.3233/JPD-012144
- Kumar, S., & Reddy, P. H. (2016). Are circulating microRNAs peripheral biomarkers for Alzheimer's disease? *Biochim Biophys Acta*, 1862(9), 1617-1627. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.06.001
- Lacroux, C., Vilette, D., Fernandez-Borges, N., Litaise, C., Lugan, S., Morel, N., . . . 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
- Lacroux, C., Comoy, E., Moudjou, M., Perret-Liaudet, A., Lugan, S., Litaise, C., . . . Andreoletti, O. (2014). Preclinical detection of variant CJD and BSE prions in blood. *PLoS Pathog*, 10(6), e1004202. doi: 10.1371/journal.ppat.1004202
- Lasser, C., Eldh, M., & Lotvall, J. (2012). Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp*(59), e3037. doi: 10.3791/3037
- Laude, H., Vilette, D., Le Dur, A., Archer, F., Soulier, S., Besnard, N., . . . Vilotte, J. L. (2002). New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives. *C R Biol*, 325(1), 49-57.
- Leblanc, P., Alais, S., Porto-Carreiro, I., Lehmann, S., Grassi, J., Raposo, G., & Darlix, J. L. (2006). Retrovirus infection strongly enhances scrapie infectivity release in cell culture. *EMBO J*, 25(12), 2674-2685. doi: 10.1038/sj.emboj.7601162
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854.
- Liao, J., Liu, R., Shi, Y. J., Yin, L. H., & Pu, Y. P. (2016). Exosome-shuttling microRNA-21 promotes cell migration and invasion-targeting PDCD4 in esophageal cancer. *Int J Oncol*, 48(6), 2567-2579. doi: 10.3892/ijo.2016.3453
- Liu, C. G., Song, J., Zhang, Y. Q., & Wang, P. C. (2014). MicroRNA-193b is a regulator of amyloid precursor protein in the blood and cerebrospinal fluid derived exosomal microRNA-193b is a biomarker of Alzheimer's disease. *Mol Med Rep*, 10(5), 2395-2400. doi: 10.3892/mmr.2014.2484
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

- Livshits, M. A., Khomyakova, E., Evtushenko, E. G., Lazarev, V. N., Kulemin, N. A., Semina, S. E., . . . Govorun, V. M. (2015). Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep*, *5*, 17319. doi: 10.1038/srep17319
- Luikart, B. W., Bensen, A. L., Washburn, E. K., Perederiy, J. V., Su, K. G., Li, Y., . . . Westbrook, G. L. (2011). miR-132 mediates the integration of newborn neurons into the adult dentate gyrus. *PLoS One*, *6*(5), e19077. doi: 10.1371/journal.pone.0019077
- Lukiw, W. J., Dua, P., Pogue, A. I., Eicken, C., & Hill, J. M. (2011). Upregulation of micro RNA-146a (miRNA-146a), a marker for inflammatory neurodegeneration, in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) and Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) syndrome. *J Toxicol Environ Health A*, *74*(22-24), 1460-1468. doi: 10.1080/15287394.2011.618973
- Lungu, G., Stoica, G., & Ambrus, A. (2013). MicroRNA profiling and the role of microRNA-132 in neurodegeneration using a rat model. *Neurosci Lett*, *553*, 153-158. doi: 10.1016/j.neulet.2013.08.001
- Lusardi, T. A., Phillips, J. I., Wiedrick, J. T., Harrington, C. A., Lind, B., Lapidus, J. A., . . . Saugstad, J. A. (2017). MicroRNAs in Human Cerebrospinal Fluid as Biomarkers for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, *55*(3), 1223-1233. doi: 10.3233/JAD-160835
- Llorens, F., Barrio, T., Correia, A., Villar-Pique, A., Thune, K., Lange, P., . . . Zerr, I. (2018). Cerebrospinal Fluid Prion Disease Biomarkers in Pre-clinical and Clinical Naturally Occurring Scrapie. *Mol Neurobiol*. doi: 10.1007/s12035-018-1014-z
- Majer, A., Medina, S. J., Niu, Y., Abrenica, B., Manguiat, K. J., Frost, K. 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
- Mattei, V., Barenco, M. G., Tasciotti, V., Garofalo, T., Longo, A., Boller, K., . . . Sorice, M. (2009). Paracrine diffusion of PrP(C) and propagation of prion infectivity by plasma membrane-derived microvesicles. *PLoS One*, *4*(4), e5057. doi: 10.1371/journal.pone.0005057
- Mayourian, J., Ceholski, D. K., Gorski, P. A., Mathiyalagan, P., Murphy, J. F., Salazar, S. I., . . . Costa, K. D. (2018). Exosomal microRNA-21-5p Mediates Mesenchymal Stem Cell Paracrine Effects on Human Cardiac Tissue Contractility. *Circ Res*, *122*(7), 933-944. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312420
- Meyne, F., Gloeckner, S. F., Ciesielczyk, B., Heinemann, U., Krasnianski, A., Meissner, B., & Zerr, I. (2009). Total prion protein levels in the cerebrospinal fluid are reduced in patients with various neurological disorders. *J Alzheimers Dis*, *17*(4), 863-873. doi: 10.3233/JAD-2009-1110

- 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
- Pattison, I. H., & Jones, K. M. (1967). The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *Vet Rec*, 80(1), 2-9.
- Properzi, F., Logozzi, M., Abdel-Haq, H., Federici, C., Lugini, L., Azzarito, T., . . . Pocchiari, M. (2015). Detection of exosomal prions in blood by immunochemistry techniques. *J Gen Virol*, 96(Pt 7), 1969-1974. doi: 10.1099/vir.0.000117
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216(4542), 136-144.
- Qian, Y., Song, J., Ouyang, Y., Han, Q., Chen, W., Zhao, X., . . . Fan, C. (2017). Advances in Roles of miR-132 in the Nervous System. *Front Pharmacol*, 8, 770. doi: 10.3389/fphar.2017.00770
- Raof, R., Jimenez-Mateos, E. M., Bauer, S., Tackenberg, B., Rosenow, F., Lang, J., . . . Mooney, C. (2017). Cerebrospinal fluid microRNAs are potential biomarkers of temporal lobe epilepsy and status epilepticus. *Sci Rep*, 7(1), 3328. doi: 10.1038/s41598-017-02969-6
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 200(4), 373-383. doi: 10.1083/jcb.201211138
- Ren, J., Zhou, Q., Li, H., Li, J., Pang, L., Su, L., . . . Liu, B. (2017). Characterization of exosomal RNAs derived from human gastric cancer cells by deep sequencing. *Tumour Biol*, 39(4), 1010428317695012. doi: 10.1177/1010428317695012
- Ritchie, A. J., Crawford, D. M., Ferguson, D. J., Burthem, J., & Roberts, D. J. (2013). Normal prion protein is expressed on exosomes isolated from human plasma. *Br J Haematol*, 163(5), 678-680. doi: 10.1111/bjh.12543
- Saa, P., Yakovleva, O., de Castro, J., Vasilyeva, I., De Paoli, S. H., Simak, J., & Cervenakova, L. (2014). First demonstration of transmissible spongiform encephalopathy-associated prion protein (PrPTSE) in extracellular vesicles from plasma of mice infected with mouse-adapted variant Creutzfeldt-Jakob disease by in vitro amplification. *J Biol Chem*, 289(42), 29247-29260. doi: 10.1074/jbc.M114.589564
- 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

- Saborio, G. P., Permanne, B., & Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, *411*(6839), 810-813. doi: 10.1038/35081095
- Sanz-Rubio, D., Martin-Burriel, I., Gil, A., Cubero, P., Forner, M., Khalyfa, A., & Marin, J. M. (2018). Stability of Circulating Exosomal miRNAs in Healthy Subjects. *Sci Rep*, *8*(1), 10306. doi: 10.1038/s41598-018-28748-5
- Sanz Rubio, D., Lopez-Perez, O., de Andres Pablo, A., Bolea, R., Osta, R., Badiola, J. J., . . . Toivonen, J. M. (2017). Increased circulating microRNAs miR-342-3p and miR-21-5p in natural sheep prion disease. *J Gen Virol*, *98*(2), 305-310. doi: 10.1099/jgv.0.000685
- Shi, J. (2016). Considering Exosomal miR-21 as a Biomarker for Cancer. *J Clin Med*, *5*(4). doi: 10.3390/jcm5040042
- Shi, L., Liu, H., Zhang, M., Guo, Y., Song, C., Song, D., & Xia, J. (2016). MiR-128-3p activates autophagy in rat brain cells after focal cerebral ischemia reperfusion through targeting Atg1. *Int J Clin Exp Med*, *9*(2), 2486-2492.
- 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
- Smith, P. Y., Delay, C., Girard, J., Papon, M. A., Planel, E., Sergeant, N., . . . Hebert, S. S. (2011). MicroRNA-132 loss is associated with tau exon 10 inclusion in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet*, *20*(20), 4016-4024. doi: 10.1093/hmg/ddr330
- Sorensen, S. S., Nygaard, A. B., Carlsen, A. L., Heegaard, N. H. H., Bak, M., & Christensen, T. (2017). Elevation of brain-enriched miRNAs in cerebrospinal fluid of patients with acute ischemic stroke. *Biomark Res*, *5*, 24. doi: 10.1186/s40364-017-0104-9
- Toivonen, J. M., Manzano, R., Oliván, S., Zaragoza, P., Garcia-Redondo, A., & Osta, R. (2014). MicroRNA-206: a potential circulating biomarker candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, *9*(2), e89065. doi: 10.1371/journal.pone.0089065
- Torres, M., Cartier, L., Matamala, J. M., Hernandez, N., Woehlbier, U., & Hetz, C. (2012). Altered Prion protein expression pattern in CSF as a biomarker for Creutzfeldt-Jakob disease. *PLoS One*, *7*(4), e36159. doi: 10.1371/journal.pone.0036159
- van Keulen, L. J., Schreuder, B. E., Vromans, M. E., Langeveld, J. P., & Smits, M. A. (2000). Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch Virol Suppl*(16), 57-71.
- Veith, N. M., Plattner, H., Stuermer, C. A., Schulz-Schaeffer, W. J., & Burkle, A. (2009). Immunolocalisation of PrPSc in scrapie-infected N2a mouse neuroblastoma cells by light and electron microscopy. *Eur J Cell Biol*, *88*(1), 45-63. doi: 10.1016/j.ejcb.2008.08.001
- Vella, L. J., Sharples, R. A., Lawson, V. A., Masters, C. L., Cappai, R., & Hill, A. F. (2007). Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol*, *211*(5), 582-590. doi: 10.1002/path.2145

- Vella, L. J., Greenwood, D. L., Cappai, R., Scheerlinck, J. P., & Hill, A. F. (2008). Enrichment of prion protein in exosomes derived from ovine cerebral spinal fluid. *Vet Immunol Immunopathol*, *124*(3-4), 385-393. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.04.002
- Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R., & Conrad, R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*, *1820*(7), 940-948. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.03.017
- Yelamanchili, S. V., Lamberty, B. G., Rennard, D. A., Morsey, B. M., Hochfelder, C. G., Meays, B. M., . . . Fox, H. S. (2015). MiR-21 in Extracellular Vesicles Leads to Neurotoxicity via TLR7 Signaling in SIV Neurological Disease. *PLoS Pathog*, *11*(7), e1005032. doi: 10.1371/journal.ppat.1005032

IV. DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Desde hace años, el campo de investigación de las EETs ha intentado caracterizar los mecanismos moleculares básicos de los procesos patológicos implicados en la patogénesis y en la neurodegeneración asociada a las enfermedades priónicas. Recientemente se ha propuesto que la alteración de las distintas vías celulares que mantienen la homeostasis proteica interna, entre las que se encuentra la autofagia, es una de las principales causas de toxicidad en estos trastornos (Lindquist & Kelly, 2011; C. Hetz & Mollereau, 2014). La presencia de una actividad autofágica alterada o disfuncional se ha observado con frecuencia en varias enfermedades neurodegenerativas, entre ellas, las EETs (Mok *et al.*, 2007; Wong & Cuervo, 2010; Son *et al.*, 2012). No obstante, pocos estudios se han centrado en analizar la relación de este proceso con las lesiones neuropatológicas asociadas a la enfermedad. El **estudio número 1** se diseñó con el objetivo de analizar la implicación *in vivo* de la autofagia en la neuropatología priónica de un modelo animal natural de la enfermedad, mediante el análisis a nivel genético y proteico de varios marcadores en las regiones neuroanatómicas más relevantes del encéfalo de ovejas infectadas de forma natural con scrapie clásico.

En este estudio, identificamos una disminución en los niveles de mRNA de *ATG5* y *ATG9* en tálamo y cerebelo, respectivamente, de los animales enfermos, y una correlación negativa entre la cantidad de transcritos de *ATG5* y *LC3-B* y las lesiones neuropatológicas de la enfermedad. La expresión génica de *BECN1* también mostró una correlación negativa con los depósitos de PrP^{Sc}, en este caso a nivel del tálamo de las ovejas afectadas con scrapie. En el encéfalo de ratones de tipo *wild-type* infectados con scrapie se ha descrito una disminución en la expresión génica de *beclin-1* y *Atg5* muy similar a la observada en nuestro estudio (Mok *et al.*, 2007). Además, la delección específica del gen *Atg5* en el tejido nervioso provoca acumulación de proteínas ubiquitinadas, orgánulos dañados y sustratos específicos de autofagia, como p62 (Kuma *et al.*, 2017). De acuerdo a esto, el marcador p62, una proteína que se acumula en respuesta al deterioro degradativo autofágico (Bjorkoy *et al.*, 2009), mostró una intensa sobreexpresión en la gran mayoría de zonas del SNC de las ovejas afectadas con scrapie. Esta proteína está presente en inclusiones neuronales y gliales en varias enfermedades neurodegenerativas (Zatloukal *et al.*, 2002; Kuusisto *et al.*, 2008) y se induce en respuesta a la expresión de la forma tóxica de la HTT (Nagaoka *et al.*, 2004). La sobreexpresión de

p62 también ha sido descrita en cultivos de células neuronales tratadas con PrP⁹⁰⁻²³¹, sugiriendo que el péptido estimula la autofagia pero conduce progresivamente a la acumulación de autofagolisosomas con una capacidad degradativa defectuosa (Thellung *et al.*, 2018).

Estos hallazgos, indican que la maquinaria autofágica se encuentra alterada en el SNC durante el curso de la infección priónica natural. Aunque la función biológica de la autofagia bajo la situación de una EET sigue estando abierta a debate, ya que sigue sin estar claro si es completamente beneficiosa o patogénica durante la neurodegeneración, existen amplias evidencias experimentales que demuestran que este proceso desempeña un papel neuroprotector defensivo en respuesta a la infección mediante la degradación de la proteína priónica patológica, y que su mal funcionamiento en las neuronas afectadas puede contribuir a la formación de los cambios espongiiformes (H. Yao *et al.*, 2013). En base a esto, las alteraciones en la autofagia descritas en este estudio podrían perjudicar el control del procesamiento de la PrP^{Sc} y facilitar la acumulación de los agregados proteicos, contribuyendo de esta manera a la neurodegeneración y a las características histopatológicas finales de la zona del SNC.

Por otro lado, en poblaciones neuronales específicas que presentan un menor grado lesional en esta enfermedad, como los ganglios basales y las células de Purkinje del cerebelo, detectamos un aumento de expresión tanto de p62 como de los marcadores de membrana autofagosomal LC3. Aunque de manera general, la acumulación de p62 se utiliza como un marcador de autofagia disfuncional (Bjorkoy *et al.*, 2009), se ha establecido que el análisis comparativo entre los niveles de expresión de LC3-B y p62, los marcadores de autofagia más utilizados en la actualidad, es necesario para una correcta evaluación y monitorización de la actividad de este proceso (Jeong & Park, 2015; Niklaus *et al.*, 2017). La sobreexpresión tanto de p62 como de LC3 ha sido asociada a una inducción de la actividad autofágica, ya que el incremento de autofagosomas en combinación con el aumento de p62 facilita la degradación de la PrP^{Sc} en cultivos celulares infectados con priones (Homma *et al.*, 2014). Por lo tanto, estos resultados indican que el proceso autofágico no sólo mantiene su funcionamiento normal en estas zonas, sino que se encuentra activado probablemente como un mecanismo neuroprotector en respuesta a la toxicidad priónica. De hecho, en las células de Purkinje se ha descrito un incremento de chaperonas involucradas en la eliminación de proteínas alteradas de la

célula en ovejas infectadas de forma natural con scrapie (Serrano *et al.*, 2011) e incluso la formación eficiente de autofagosomas en modelos murinos de scrapie (Xu *et al.*, 2012).

A pesar de que la inmunotinción de p62 no mostró una asociación con los depósitos de PrP^{Sc}, ya que la acumulación del marcador se produjo en regiones con diferentes grados de lesión, los hallazgos del primer estudio implican que parece existir una regulación diferencial de la maquinaria autofágica en función de las características neuropatológicas de la zona del SNC analizada. Para corroborar o descartar esta hipótesis, en el **estudio número 2** nos propusimos complementar estos resultados mediante el análisis inmunohistoquímico de la actividad autofágica en el SNC de ovejas infectadas experimentalmente con scrapie atípico, dado que la distribución neuroanatómica de las lesiones histopatológicas y de los depósitos de PrP^{Sc} en esta forma clínica de la enfermedad es distinta a la presentada por la forma clásica (Benestad *et al.*, 2003; Benestad *et al.*, 2008). Mientras que la proteína ATG5 mostró una distribución similar a la observada en la forma clásica de la enfermedad, la expresión de LC3-B y LC3-A no presentó cambios apreciables en ninguna de las zonas del SNC estudiadas, lo que sugiere que la cantidad de autofagosomas en los animales enfermos es la misma que la de los sanos. A pesar de que se ha descrito un mal funcionamiento de la actividad autofágica en modelos murinos infectados con scrapie, la formación de los autofagosomas parece no encontrarse alterada en el proceso (Mok *et al.*, 2007).

Sin embargo, detectamos una sobreexpresión de la proteína p62 en las estructuras neuroanatómicas más afectadas por la toxicidad priónica en esta enfermedad, y en este caso, la inmunotinción de p62 mostró una clara correlación positiva, y la de ATG5 una correlación negativa, tanto con las lesiones histopatológicas como con los depósitos de PrP^{Sc}. Asumiendo que el nivel de autofagosomas en los animales se mantiene estable, la acumulación de esta proteína sugiere que los autofagosomas de los animales sanos son más eficientes y funcionales que los de los enfermos, dado que los primeros parecen reducir de manera satisfactoria los niveles de p62. De forma similar, en varios modelos de la enfermedad de Huntington se ha detectado un defecto primario en la capacidad de los autofagosomas para reconocer los componentes citosólicos que impide que no puedan atrapar eficazmente la carga en su luz, a pesar de que las vesículas se forman a velocidades normales y se eliminan de manera adecuada por los lisosomas (Martinez-Vicente *et al.*, 2010). El mal funcionamiento degradativo de la autofagia bajo la situación de una

infección priónica probablemente refleje la incapacidad de las neuronas para contrarrestar la infección debido a la presencia de autofagosomas no funcionales con la capacidad degradativa dañada, como se ha descrito en un estudio anteriormente comentado (Thellung *et al.*, 2018), lo que podría contribuir al progreso de la enfermedad. Por otro lado, las zonas con un menor grado lesional no mostraron cambios en los niveles de expresión de p62 ni en los de las proteínas LC3, lo que indica que en estas regiones la actividad autofágica no se encuentra alterada posiblemente por una menor exposición a la neurotoxicidad.

Además, observamos ausencia de inmunotinción de ATG5 y LC3, pero no de p62, en muchas de las células de Purkinje en proceso de neurodegeneración en las ovejas infectadas con scrapie atípico, mientras que las células aparentemente sanas presentes en el mismo tejido presentaban inmunopositividad para los todos los marcadores. A diferencia de lo descrito en el primer estudio, estos resultados indican que estas células son también susceptibles a la neurotoxicidad priónica y no presentan un mecanismo defensivo general basado en la activación autofágica, o al menos, este mecanismo depende en gran medida de la cepa priónica que produce la infección.

Ambos estudios muestran claras diferencias regionales en la regulación autofágica en respuesta a la enfermedad. Independientemente de que las alteraciones descritas sean causa o consecuencia de la toxicidad priónica, los resultados obtenidos demuestran, no sólo que la alteración autofágica parece formar parte del curso neurodegenerativo de la enfermedad, sino también que dicha disfunción está implicada en la neuropatología priónica y parece ser altamente dependiente del área cerebral analizada y de sus características lesionales particulares. Para determinar los posibles cambios o alteraciones durante el curso del proceso patológico, en el **estudio número 3** nos propusimos analizar los mecanismos moleculares de la autofagia y su relación con la neuropatología priónica en el SNC de ratones transgénicos Tg338 infectados con scrapie ovino en diferentes estadios clínicos de la enfermedad. La acumulación inmunohistoquímica de p62 y la disminución de LC3-B en algunas de las áreas del SNC más lesionadas de los ratones en fase clínica, sugirió un descenso de la actividad autofágica en la última etapa de la enfermedad. Los mecanismos moleculares que subyacen a la autofagia en la situación de una EET parecen variar en función de las condiciones experimentales utilizadas, ya que se ha descrito un aumento de LC3 y disminución de p62 en el estadio terminal de modelos

murinos y en enfermedades priónicas de origen genético (Xu *et al.*, 2012), un aumento de LC3 y p62 en modelos murinos infectados con distintas cepas de scrapie y en células neuronales tratadas con el péptido PrP90-231 (Homma *et al.*, 2014; Thellung *et al.*, 2018), e incluso una disminución de ambos marcadores en células neuronales humanas y murinas infectadas con la proteína priónica humana (Moon *et al.*, 2016), discordancias probablemente debidas a los distintos modelos experimentales, cepas priónicas o regiones cerebrales estudiadas.

Además, detectamos una disminución en los niveles de transcritos de *Atg5*, muy similar a la descrita en el modelo natural del primer estudio, y de *Fbxw7* y *Gas5*, cuya expresión se ha relacionado con un incremento de la actividad autofágica (Xu *et al.*, 2016; N. Zhang *et al.*, 2016), en mesencéfalo y médula espinal cervical de los animales en fase clínica. El grupo en fase preclínica, por su parte, no mostró cambios detectables a nivel transcripcional ni a nivel proteico en ninguna de las zonas analizadas. Estos resultados confirman que la alteración de la maquinaria autofágica parece tener lugar durante las últimas etapas de la infección priónica, lo cual debería tenerse en cuenta cuando se diseñen posibles estrategias terapéuticas dirigidas a la estimulación de la autofagia. A pesar de que los mecanismos que subyacen a la disfunción son ligeramente distintos a los presentados por el hospedador natural, la alteración del proceso durante la fase clínica de la enfermedad, la correlación negativa y positiva de LC3-B y p62, respectivamente, con los depósitos de PrP^{Sc}, y la semejanza en los perfiles lesionales entre ambos modelos, sugieren que el uso del modelo murino Tg338 puede ser un método *in vivo* adecuado para estudiar la autofagia y las EETs de manera conjunta y así adquirir más información con respecto al papel de este proceso en la enfermedad natural.

Al comparar la distribución inmunohistoquímica de los marcadores de autofagia en ratones no infectados de tipo *wild-type* con la presentada por los ratones Tg338 inoculados con tejido nervioso procedente de animales sanos, observamos un incremento proteico tanto de LC3-B como de p62 en algunas zonas del SNC del modelo Tg338. Una de las funciones fisiológicas que se le atribuyen a la PrP^c, entre muchas otras, es la capacidad de modular la actividad autofágica (H. Y. Shin *et al.*, 2013). La expresión de PrP^c puede incrementar el flujo autofágico para proteger a las células neuronales de la toxicidad inducida por el péptido PrP106-126 (Jeong & Park, 2015). El incremento de autofagia observado en el modelo murino transgénico Tg338 indica que la sobreexpresión

de la PrP^c ovina en ausencia de infección es suficiente para alterar la actividad autofágica en algunas zonas del SNC. Esta información debe tenerse en cuenta cuando se estudie la implicación de la autofagia en las EETs mediante el uso de modelos transgénicos similares, o incluso, dado que la inducción de la autofagia de manera farmacológica o genética tiene efectos beneficios y da como resultado la disminución de la carga celular de la PrP^{Sc} (Aguib *et al.*, 2009; Heiseke *et al.*, 2010; H. Yao *et al.*, 2013), podría ser de utilidad a la hora de diseñar experimentos dirigidos a la manipulación autofágica con fines terapéuticos.

Aunque en varios estudios se ha observado con frecuencia la acumulación de vacuolas autofágicas en poblaciones neuronales específicas de las regiones del SNC afectadas por varias enfermedades neurodegenerativas (Boellaard *et al.*, 1991; Ravikumar *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2003; Webb *et al.*, 2003; Liberski *et al.*, 2004; Sikorska *et al.*, 2004), existen evidencias directas que indican una disminución de la actividad autofágica, o un deterioro o fallo en el evento degradativo final, como la alteración del transporte retrógrado del autofagosoma (Nixon, 2007; Boland *et al.*, 2008) y la reducción progresiva de los marcadores ATG5, ATG12 y LC3 (J. F. Ma *et al.*, 2010) y *beclin-1* (Pickford *et al.*, 2008) en la enfermedad de Alzheimer, el incorrecto reconocimiento de la carga citosólica en la enfermedad de Huntington (Martinez-Vicente *et al.*, 2010), o la disminución de transcritos de *beclin-1* y *Atg5* en ratones infectados con scrapie (Mok *et al.*, 2007). Los resultados descritos en los tres primeros estudios de esta Tesis Doctoral sugieren que la autofagia también se encuentra alterada en las EETs *in vivo*, y que el deterioro degradativo ocurre durante la etapa final de la infección y depende del grado de toxicidad priónica que presenta cada zona del SNC.

Por otro lado, el diagnóstico actual de las EETs se basa en la detección directa de la PrP^{Sc} de manera *post-mortem* en el tejido cerebral de los individuos enfermos (Aguzzi & Falsig, 2012). Debido a que este método no se considera fiable para el diagnóstico *in vivo*, resulta necesario identificar biomarcadores distintos a la PrP^{Sc} y validar a nivel proteico los potenciales biomarcadores génicos ya identificados, principalmente en el hospedador natural de la enfermedad, para poder proporcionar alternativas útiles a la metodología diagnóstica actual. Mediante el uso de líneas celulares con diferentes susceptibilidades a la infección, se ha descrito recientemente una red génica reguladora que es capaz de modular la resistencia/susceptibilidad a la propagación priónica *in vitro*

(Marbiah *et al.*, 2014). En el **estudio número 4**, evaluamos la implicación *in vivo* de un conjunto de esos genes en la neuropatología asociada al scrapie clásico, y su posible potencial como biomarcadores, mediante su análisis a nivel génico y proteico en el SNC del modelo ovino natural de la enfermedad y del modelo transgénico murino Tg338.

De los diez genes analizados en la médula oblongada de las ovejas con scrapie, observamos un aumento y una disminución en el nivel de mRNA de *BAMBI* y *CHGA*, respectivamente. En el mesencéfalo de los ratones Tg338 infectados con scrapie en fase clínica, pero no en fase preclínica, encontramos una disminución en la expresión de *Bambi* y *Chga*. La disminución del nivel de transcritos de *CHGA* en la zona más lesionada de cada modelo animal, y de *Bambi* en el modelo murino, confirma los cambios observados *in vitro* por Marbiah y colaboradores, ya que los genes descritos se expresaban en líneas celulares resistentes a la infección y su disminución se asoció a un aumento de la replicación priónica en las células (Marbiah *et al.*, 2014). Por otra parte, aunque la sobreexpresión de *BAMBI* en las ovejas con scrapie no se asemeja a los resultados obtenidos *in vitro*, los cambios de expresión observados tanto en el modelo natural como en el transgénico, sugiere que ambos genes podrían desempeñar un papel relevante en la neuropatología de las EETs *in vivo*.

A diferencia del estudio de expresión génica, al analizar la distribución de las proteínas codificadas por los genes expresados diferencialmente mediante inmunohistoquímica, identificamos una sobreexpresión tanto de *BAMBI* como de *CHGA* en algunas zonas del SNC en los dos modelos de scrapie. Las discordancias entre los niveles de transcripción de un gen y la cantidad final de proteína expresada en este tipo de experimentos se suelen asociar a distintos factores, como la estructura secundaria del RNA, su estabilidad o la diferente vida media que presenta el RNA y la proteína (Maier *et al.*, 2009). En ambos modelos, *BAMBI* incrementó su expresión en las áreas más afectadas por la toxicidad priónica y *CHGA* a lo largo del encéfalo, y la inmunotinción de las dos proteínas se correlacionó positivamente con todas las lesiones neuropatológicas de la enfermedad. Varios estudios han sugerido que *CHGA* podría ser un biomarcador útil para varias enfermedades neurodegenerativas, ya que esta proteína se acumula en zonas del SNC con degeneración neuronal (Nishimura *et al.*, 1994; Yasuhara *et al.*, 1994; Willis *et al.*, 2011). Los cambios de *CHGA* observados en este estudio indican que la

expresión de esta proteína también puede ser característica de las EETs, y por tanto, podría ser un potencial biomarcador de estas enfermedades.

Los mecanismos relacionados con la activación crónica de las células gliales, en particular de las células de la microglía, en las EETs, no se comprenden en su totalidad. Algunos estudios sugieren que CHGA es uno de los factores endógenos que estimula y activa la respuesta microglial asociada a la neurodegeneración (Taupenot *et al.*, 1996; Ciesielski-Treska *et al.*, 1998; Willis *et al.*, 2011). De forma similar, BAMBI podría prolongar la activación microglial y contribuir al mantenimiento de la neuroinflamación mediante la inhibición del factor de crecimiento TGF- β y de sus propiedades anti-inflamatorias (Affram *et al.*, 2017). En este estudio, la expresión proteica de ambas proteínas se incrementó en algunas de las zonas del SNC que presentaban reactividad microglial en ambos modelos de scrapie, y en el caso de BAMBI, las áreas neuroanatómicas que mostraron una sobreexpresión de la proteína en los ratones Tg338 coincidieron con las que exhibieron un mayor incremento de reactividad microglial. Además, la correlación de la inmunotinción de BAMBI y CHGA con la microgliosis en los ratones en fase clínica fue más intensa que la obtenida con los depósitos de PrP^{Sc}. Aunque se requieren más estudios para definir la función y el papel preciso de estas proteínas en las condiciones específicas de una infección priónica, los resultados observados, junto con los descritos por otros investigadores, sugieren que, además de participar en la replicación *in vitro* del prion, BAMBI y CHGA podrían estar implicados en la característica respuesta neuroinflamatoria asociada a la patogénesis de las EETs *in vivo*.

Los miRNAs son a menudo secretados por los tejidos afectados a fluidos corporales como la sangre o LCR, donde muestran gran estabilidad debido a la protección conferida por vesículas como los exosomas (Mitchell *et al.*, 2008). Algunos estudios han descrito variaciones en los niveles de expresión de estas moléculas tanto *in vitro* como en el SNC de varios modelos de EET (Saba *et al.*, 2008; Montag *et al.*, 2009; Lukiw *et al.*, 2011; Bellingham, Coleman, *et al.*, 2012; Majer *et al.*, 2012; Saba *et al.*, 2012; Boese *et al.*, 2016). A su vez, los exosomas también se encuentran en la sangre o en el LCR (Yanez-Mo *et al.*, 2015), y además de contener repertorios específicos de miRNAs que muestran un perfil alterado tras la infección priónica *in vitro* (Bellingham, Coleman, *et al.*, 2012), pueden contener tanto PrP^c como PrP^{Sc} (Fevrier *et al.*, 2004; Leblanc *et al.*,

2006; Veith *et al.*, 2009). En los **estudios número 5 y 6**, analizamos la presencia de la PrP^{Sc} en exosomas aislados de fluidos biológicos fácilmente accesibles del hospedador natural en distintas etapas de la infección, así como las posibles alteraciones de un conjunto de miRNAs, tanto en el propio fluido como en los exosomas, para identificar nuevas moléculas que pudieran ser útiles como potenciales biomarcadores de diagnóstico.

A pesar de las alteraciones observadas *in vitro* y en el SNC de modelos murinos de EET (Saba *et al.*, 2008; Montag *et al.*, 2009; Lukiw *et al.*, 2011; Majer *et al.*, 2012; Saba *et al.*, 2012; Boese *et al.*, 2016), en nuestro estudio no encontramos alteraciones de expresión en ninguno de los miRNAs analizados en la médula espinal cervical de las ovejas afectadas con scrapie clásico, probablemente debido a los distintos modelos utilizados, o a que los miRNAs presentan una naturaleza dinámica y sus niveles suelen ser variables a lo largo del periodo de incubación de la enfermedad natural (Majer *et al.*, 2012; Boese *et al.*, 2016). Sin embargo, detectamos un incremento de manera repetida en la expresión de miR-342-3p y miR-21-5p en el plasma sanguíneo de las ovejas con scrapie. De forma similar, miR-342-3p, miR-146a-5p, miR-128-3p y miR-21-5p mostraron una sobreexpresión en el LCR de las ovejas con scrapie. Algunos de estos miRNAs, principalmente miR-342-3p y miR-21-5p, también se encuentran incrementados en varios fluidos y tejidos en modelos tanto de EETs como de otras enfermedades neurodegenerativas (Montag *et al.*, 2009; Bellingham, Coleman, *et al.*, 2012; Saba *et al.*, 2012; Kumar & Reddy, 2016). Aunque la expresión de algunos de ellos no parece ser específica de la infección priónica, los cambios en los perfiles de miRNAs circulantes de LCR permiten diferenciar pacientes con la enfermedad de Alzheimer de pacientes sanos (Lusardi *et al.*, 2017), por lo que el análisis de nuestro conjunto de miRNAs en plasma y LCR podría contribuir al diagnóstico de las EETs una vez exista sospecha clínica de la enfermedad.

A diferencia de los cambios observados en los fluidos completos, en los exosomas aislados del plasma sólo encontramos un incremento en los niveles de miR-21-5p en las ovejas afectadas con scrapie, y ningún cambio detectable en los exosomas aislados de LCR, lo que indica que el aislamiento de la fracción exosomal no proporciona un enriquecimiento en los niveles de miRNAs, al menos del conjunto seleccionado en este estudio, y por lo tanto no parece constituir un método sensible para detectar estas alteraciones en fluidos corporales. Además, a pesar de que la PrP^{Sc} se ha detectado en

exosomas de plasma de modelos murinos de EET (Saa *et al.*, 2014; Properzi *et al.*, 2015; Cervenakova *et al.*, 2016), en este estudio no detectamos la presencia de la proteína patológica en los exosomas de plasma del hospedador natural de la enfermedad, lo que indica que la fracción exosomal del plasma sanguíneo puede no estar implicada en la ruta hematogena propuesta como vía alternativa de neuroinvasión (Siso *et al.*, 2009). Por otro lado, detectamos la presencia de PrP^{Sc} en los exosomas aislados de LCR en la gran mayoría de muestras procedentes de los animales en fase clínica y terminal de la enfermedad natural, lo cual puede representar una fuente potencial de biomarcadores y podría facilitar el diagnóstico *in vivo* de estas enfermedades, al menos durante las últimas etapas de la enfermedad.

Finalmente, para explorar más en profundidad los mecanismos celulares y moleculares implicados en la neuropatología de las EETs, y la búsqueda y validación de nuevos biomarcadores, se necesitarán futuros estudios que amplíen y complementen los resultados obtenidos en el conjunto de la presente Tesis Doctoral. Aunque parece que la autofagia se encuentra estrechamente relacionada con el proceso patológico de la enfermedad priónica, en estudios posteriores resultará necesario determinar su interacción mutua a nivel molecular mediante análisis más complejos que involucren otras partes del sistema autofágico, como los lisosomas o la red de microtúbulos, u otras rutas celulares que participen en el mantenimiento de la homeostasis proteica intracelular, para comprender la magnitud y consecuencias del deterioro autofágico y así poder contribuir al desarrollo de intervenciones terapéuticas basadas en la modulación de la autofagia. Además, el estudio de BAMBI y CHGA en fluidos corporales fácilmente accesibles, y utilizando un mayor número de muestras, podría validar su potencial uso como biomarcadores de la enfermedad o, en última instancia, podría revelar posibles dianas para mejorar la neuroinflamación crónica y así desarrollar tratamientos efectivos que mitiguen el progreso de la enfermedad. Por último, los resultados de estos estudios demuestran por primera vez la presencia de alteraciones en los niveles de miRNAs circulantes en plasma sanguíneo y LCR en una enfermedad priónica de origen natural, y sugieren que estas moléculas pueden ser candidatos adecuados para ser utilizadas como biomarcadores. Igualmente, se necesitarán análisis genómicos adicionales que involucren diferentes modelos experimentales y estadios clínicos de la enfermedad para identificar miRNAs comunes que muestren la suficiente especificidad y sensibilidad como para servir de herramientas útiles para la detección de las EETs.

V. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

1. La disminución de expresión de algunos genes relacionados con la autofagia y la acumulación de p62 en el SNC de ovejas infectadas de forma natural con scrapie clásico indican que la maquinaria autofágica se encuentra alterada durante el curso de la infección priónica natural.
2. La sobreexpresión de p62 y LC3 en poblaciones neuronales con un menor grado lesional en la forma clásica de scrapie, como los ganglios basales y células de Purkinje, indica que la autofagia se encuentra activada probablemente como un mecanismo neuroprotector en respuesta a la toxicidad priónica.
3. La acumulación de p62 en las zonas del SNC más lesionadas y su correlación positiva tanto con las lesiones histopatológicas como con los depósitos de PrP^{Sc} en la forma atípica de scrapie confirman que la alteración autofágica está relacionada con la neuropatología de la enfermedad y su regulación depende del área cerebral analizada y de sus características lesionales particulares.
4. La diferente regulación de la autofagia en las células de Purkinje en las dos formas clínicas de scrapie demuestra que estas células son también susceptibles a la neurotoxicidad priónica y no presentan un mecanismo defensivo general basado en la activación autofágica.
5. La disminución de los niveles de algunos genes involucrados en la regulación de la autofagia y el aumento y disminución de p62 y LC3, respectivamente, en el SNC del modelo murino transgénico Tg338 infectado con scrapie clásico muestran que la disfunción de la maquinaria autofágica tiene lugar durante las fases tardías de la infección priónica.
6. La similitud observada entre el modelo murino Tg338 y el modelo natural ovino con respecto a los perfiles lesionales y los mecanismos que subyacen a la disfunción autofágica valida el uso de este modelo murino como método *in vivo* adecuado para estudiar la autofagia y las EETs de manera conjunta.

7. La sobreexpresión de la PrP^c en ausencia de infección produce un incremento de autofagia en zonas determinadas del SNC del modelo murino Tg338, que deberá tenerse en cuenta al realizar estudios dirigidos a la manipulación autofágica.
8. Los cambios de expresión génica y proteica de los genes involucrados *in vitro* en la replicación priónica *BAMBI* y *CHGA* en el SNC del modelo natural y murino de scrapie confirman el papel de ambos genes en la neuropatología de scrapie *in vivo* y los valida como potenciales biomarcadores de la enfermedad.
9. La intensa correlación de *BAMBI* y *CHGA* con la microgliosis, especialmente en el modelo murino de scrapie, sugiere que estas proteínas podrían estar implicadas en la respuesta neuroinflamatoria asociada a la patogénesis de las EETs *in vivo*.
10. Las alteraciones en los perfiles de un conjunto de miRNAs circulantes en plasma sanguíneo y LCR de ovejas infectadas de forma natural con scrapie indican que estas moléculas pueden ser candidatas adecuadas para ser utilizadas como nuevos biomarcadores de la enfermedad.
11. El aislamiento de exosomas a partir de plasma y LCR no constituye un método más sensible que la cuantificación directa de los niveles de la batería de miRNAs analizada en los propios fluidos biológicos.
12. La ausencia de amplificación de la PrP^{Sc} en exosomas aislados de plasma ovino infectado de forma natural con scrapie sugiere que la fracción exosomal de la sangre no está implicada en la ruta hematógica de neuroinvasión en este hospedador natural.
13. La presencia de la PrP^{Sc} en los exosomas aislados de LCR de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie, principalmente en los animales en fase clínica, puede representar un biomarcador útil para facilitar el diagnóstico *in vivo* de las EETs durante las últimas etapas de la enfermedad.

CONCLUSIONS

1. Downregulation of some autophagy-related genes and accumulation of p62 in the CNS of sheep naturally infected with classical scrapie indicate that the autophagic machinery is altered during the course of the natural prion infection.
2. Overexpression of both p62 and LC3 in minimally prion-affected neuronal populations of the classical form of scrapie, such as the basal ganglia and Purkinje cells, suggests that autophagy may be activated as a neuroprotective mechanism in response to prion toxicity.
3. The accumulation of p62 in highly-affected areas of the CNS and its positive correlation both with the histopathological lesions and PrP^{Sc} deposits in the atypical form of scrapie confirm that autophagy malfunction is implicated in the neuropathology of the disease and its regulation depends on the specific lesion features of the brain area analysed.
4. The different regulation of autophagy in Purkinje cells in both clinical forms of scrapie implies that these cells are also susceptible to prion neurotoxicity and do not exhibit a general defensive mechanism based on autophagy activation.
5. Downregulation of some genes involved in autophagy regulation, and upregulation and downregulation of p62 and LC3, respectively, in the CNS of the transgenic Tg338 murine model infected with mouse-adapted classical scrapie indicate that the impairment of autophagy takes place during the last stage of prion infection.
6. The observed resemblance between Tg338 mouse model and the natural ovine model in terms of lesion profiles and the molecular mechanisms underlying autophagy dysfunction validates the use of Tg338 mice as a reliable *in vivo* model for studying prion infection along with autophagy.
7. PrP^c overexpression without PrP^{Sc} infection upregulates autophagic activity in specific brain areas of the Tg338 murine model, which needs to be taken into

consideration when designing experimental studies aimed at modulating autophagic activity.

8. Dysregulation at the transcript and protein levels of genes involved in prion replication *in vitro*, i.e. *BAMBI* and *CHGA*, in the CNS of both the natural ovine model and the transgenic murine model of scrapie suggests that these genes may play a role in scrapie neuropathology *in vivo*, and indicates them as potential biomarkers of the disease.
9. The strong correlation of *BAMBI* and *CHGA* with microgliosis, mainly in the murine model of scrapie, suggests that these proteins may be involved in the neuroinflammatory response associated to TSEs *in vivo*.
10. Altered profiles of a selected set of circulating miRNAs in blood plasma and CSF of sheep naturally infected with scrapie indicate that these molecules may be feasible candidates to be used as new biomarkers of the disease.
11. Exosome isolation from plasma and CSF does not represent a more sensitive method than direct quantification of the analysed battery of miRNAs in the two biofluids.
12. The absence of PrP^{Sc} amplification in plasma-derived exosomes from sheep naturally infected with scrapie suggests that the exosomal fraction of blood is not involved in the haematogenous pathway of neuroinvasion in this natural host.
13. The presence of PrP^{Sc} in CSF-derived exosomes from sheep naturally infected with scrapie, mainly in animals at clinical stage, may represent a useful biomarker to facilitate TSE diagnosis *in vivo* during the last stage of the disease.

VI. RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs), o enfermedades priónicas, son un grupo de trastornos neurodegenerativos fatales que afectan a los animales y al hombre, caracterizados por la acumulación de una isoforma infecciosa (PrP^{Sc}) de la proteína prion celular (PrP^c) en el sistema nervioso central (SNC). Utilizando el scrapie ovino como modelo animal de EET, en la presente Tesis Doctoral hemos analizado la posible implicación de la autofagia, un proceso intracelular fundamental que evita la acumulación de orgánulos dañados y proteínas mal plegadas, en la neuropatología asociada a estas enfermedades. Mediante estudios de expresión génica y determinación inmunohistoquímica de algunos de los marcadores de autofagia más utilizados en la actualidad, evaluamos la regulación de este proceso en ovino infectado de forma natural con scrapie clásico, en ovejas inoculadas experimentalmente con scrapie atípico y en el modelo murino transgénico Tg338, el cual sobreexpresa el alelo del gen ovino de la proteína prion (*PRNP*) más susceptible al scrapie clásico (VRQ).

En estos modelos hemos identificado una disminución en los niveles de expresión de genes relacionados con la autofagia como *ATG5* y un incremento del marcador p62, una proteína que se acumula en respuesta al deterioro degradativo autofágico, principalmente en las áreas del SNC más afectadas por la enfermedad. El análisis de las dos formas clínicas de scrapie, las cuales difieren en la distribución neuroanatómica tanto de las lesiones histopatológicas como de los depósitos de PrP^{Sc}, nos ha permitido concluir, no sólo que la maquinaria autofágica se encuentra alterada durante el curso de la infección priónica, sino también que dicha alteración está relacionada con la neuropatología de la enfermedad y es en gran medida dependiente de las características lesionales particulares de la región del SNC analizada. Por otro lado, en la línea transgénica murina Tg338 hemos demostrado que la disfunción de la autofagia tiene lugar durante las fases tardías de la infección priónica. Aunque este modelo experimental muestra una regulación autofágica diferencial con respecto a ratones de tipo *wild-type*, probablemente debido a la sobreexpresión de la PrP^c, en general, la línea murina Tg338 presenta una respuesta a la infección con scrapie clásico y una actividad autofágica similares a las observadas en el ovino, por lo que puede considerarse un método *in vivo* adecuado para estudiar la autofagia y las EETs de manera conjunta.

En la actualidad, el único diagnóstico efectivo de las enfermedades priónicas se basa en la detección directa de la PrP^{Sc} en el SNC de manera *post-mortem* o en tejidos y fluidos periféricos mediante técnicas de amplificación *in vitro*. La detección de la PrP^{Sc} no se considera fiable para el diagnóstico *in vivo*, y algunas de las técnicas de amplificación son costosas y requieren de laboratorios especializados. En esta Tesis Doctoral hemos realizado diversos estudios dirigidos a la identificación de biomarcadores distintos a la PrP^{Sc} y a la validación de potenciales biomarcadores génicos ya identificados para proporcionar alternativas útiles a la metodología diagnóstica actual.

Mediante RT-qPCR estudiamos la expresión de diez genes, cuya implicación en la propagación priónica había sido descrita previamente *in vitro*, en la médula oblongada de ovino con scrapie natural. De todos ellos, detectamos una regulación diferencial en *BAMBI* y *CHGA*, por lo que estos dos marcadores se analizaron posteriormente mediante inmunohistoquímica en el modelo ovino y en el modelo murino Tg338. Los cambios de expresión de estos genes tanto a nivel génico como proteico en ambos modelos de scrapie sugieren que podrían desempeñar un papel relevante en la neuropatología de las EETs *in vivo*, validándolos a su vez como potenciales biomarcadores de la enfermedad. Además, las proteínas codificadas por *BAMBI* y *CHGA* muestran una relación, no sólo con la replicación del prion, sino también con la microgliosis reactiva asociada a estas enfermedades.

Por otro lado, los microRNAs (miRNAs) circulantes han sido propuestos como potenciales biomarcadores en una amplia variedad de patologías, incluidas las enfermedades neurodegenerativas. En esta Tesis Doctoral hemos analizado, en plasma sanguíneo y líquido cefalorraquídeo (LCR) de ovino con scrapie, una batería de miRNAs que han mostrado cambios de expresión en otros modelos de EET, demostrando por primera vez alteraciones en los niveles de varios miRNAs circulantes en una enfermedad priónica de origen natural. En los animales infectados con scrapie detectamos un incremento de miR-342-3p y miR-21-5p en plasma, y de miR-342-3p, miR-146a-5p, miR-128-3p y miR-21-5p en LCR, por lo que estas moléculas pueden ser candidatas adecuadas para ser utilizadas como nuevos biomarcadores de la enfermedad. A pesar de que también analizamos sus perfiles de expresión en la fracción exosomal de ambos fluidos biológicos con el fin de concentrar la señal de estos miRNAs y así poder proporcionar un método de diagnóstico más sensible, la purificación de exosomas no

mejoró la señal de amplificación de estas moléculas, o al menos, de la batería de miRNAs seleccionada.

Finalmente, evaluamos la presencia de la PrP^{Sc} en exosomas circulantes mediante PMCA, ya que la circulación del prion a través del organismo podría estar facilitada por estas vesículas y, por tanto, podrían ser en parte responsables de la prionemia descrita en scrapie. En los exosomas aislados de plasma de ovino con scrapie no detectamos la presencia de la proteína patológica, por lo que la fracción exosomal de la sangre no parece estar implicada en la ruta hematogena de neuroinvasión en este hospedador, ni su análisis resulta adecuado para diagnosticar la enfermedad *in vivo*. Por el contrario, la detección de la PrP^{Sc} en los exosomas aislados de LCR podría representar un biomarcador útil para facilitar el diagnóstico *in vivo* de las EETs durante las últimas etapas de la enfermedad, ya que la amplificación de esta proteína fue positiva en la gran mayoría de muestras procedentes de animales en fase clínica.

Mediante un compendio de seis estudios, en esta Tesis Doctoral se ha analizado la implicación de la autofagia en las EETs y se ha profundizado en la validación de potenciales biomarcadores de estas enfermedades mediante el estudio de genes codificantes de proteínas, miRNAs y exosomas circulantes, cumpliendo los objetivos planteados al inicio de la misma.

ABSTRACT

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), or prion diseases, are fatal neurodegenerative disorders affecting both animals and humans, and are characterised by the accumulation of an infectious isoform (PrP^{Sc}) of the cellular prion protein (PrP^c) in the central nervous system (CNS). In this Doctoral Thesis we have analysed the possible implication of autophagy, a fundamental intracellular process that prevents the accumulation of damaged organelles and misfolded proteins, in the neuropathology associated to these diseases using ovine scrapie as an animal model of TSE. Through studies of gene expression and immunohistochemical determination of some of the most widely used autophagy markers, we evaluated the regulation of this process in sheep naturally infected with classical scrapie, in sheep experimentally inoculated with atypical scrapie and in transgenic Tg338 murine model, which overexpresses the most susceptible ovine allele (VRQ) of prion protein gene (*PRNP*) to classical scrapie.

In these models we found a downregulation of autophagy-related genes such as *ATG5* and an overexpression of p62, a protein that accumulates in response to autophagy impairment, mainly in highly-affected CNS areas. The analysis of the classical and atypical forms of scrapie, which differ in the neuroanatomical distribution of both histopathological lesions and PrP^{Sc} deposits, allowed us to conclude not only that the autophagic machinery is altered during the course of the prion infection, but also that such alteration is related to the neuropathology of the disease and largely depends on the specific lesion features of the CNS area analysed. On the other hand, we demonstrated in the transgenic Tg338 murine model that autophagy dysfunction takes place during the last stage of prion infection. Although this experimental model shows a differential autophagy regulation compared to wild-type mice, probably related to PrP^c overexpression, Tg338 murine model displays a similar response to classical scrapie infection and autophagic activity to those observed in sheep. Therefore, it can be considered a reliable *in vivo* method for studying autophagy and TSEs side by side.

Currently, the only effective diagnosis of prion diseases is based on post-mortem PrP^{Sc} detection in the CNS or in tissues and peripheral fluids using *in vitro* amplification assays. Direct detection of PrP^{Sc} is not considered to be reliable for *in vivo* diagnosis, and some of the amplification techniques are expensive and require specialised laboratories.

To provide useful alternatives for current diagnostic methodology, we have in this Doctoral Thesis performed several studies aimed at the identification of new biomarkers not based on PrP^{Sc} and a validation of potential mRNA biomarkers identified earlier.

We investigated by RT-qPCR the expression of ten genes, whose involvement in prion propagation has previously been described *in vitro*, in the medulla oblongata of sheep naturally infected with scrapie. Among the genes analysed, we found a differential regulation of *BAMBI* and *CHGA*, and these two markers were subsequently analysed by immunohistochemistry in sheep and the Tg338 murine model. The observed dysregulation at the transcript and protein levels of these genes in both scrapie models suggests that they could play a relevant role in TSE neuropathology *in vivo*, which validates them as potential biomarkers of the disease. In addition, the proteins encoded by *BAMBI* and *CHGA* show a relationship, not only with prion replication, but also with the reactive microgliosis associated to these pathologies.

On the other hand, circulating microRNAs (miRNAs) have been proposed as potential biomarkers in a wide range of diseases, including neurodegenerative disorders. In this Doctoral Thesis we have analysed in blood plasma and in cerebrospinal fluid (CSF) of scrapie sheep, a set of miRNAs that have been described altered in other TSE models, identifying for the first time altered profiles of several circulating miRNAs in the natural prion disease. In scrapie-affected animals we detected an upregulation of miR-342-3p and miR-21-5p in plasma, and that of miR-342-3p, miR-146a-5p, miR-128-3p and miR-21-5p in CSF, which suggests that these molecules may be feasible candidates to be used as new biomarkers of the disease. In order to concentrate the signal of these miRNAs to provide a more sensitive diagnostic method we also analysed their expression profiles in the exosomal fraction of both biological fluids. However, the purification of exosomes did not improve the amplification signal of these molecules, or at least that of the selected battery of miRNAs.

Finally, we evaluated the presence of PrP^{Sc} in circulating exosomes by PMCA because the circulation of the prion through the organism could be facilitated by these vesicles and, therefore, could be partially responsible for the prionemia described in scrapie. We did not detect the pathological protein in plasma-derived exosomes from scrapie-affected sheep. This suggests that the exosomal fraction of blood seems not to be

involved in the haematogenous pathway of neuroinvasion in this natural host, neither their analysis is adequate to perform an *in vivo* diagnosis of the disease. In contrast, PrP^{Sc} was detected in CSF-derived exosomes and may represent a useful biomarker to facilitate TSE diagnosis *in vivo* during the last stage of the disease, since the amplification of this protein was positive in the large majority of samples from animals at clinical stage.

Through a compendium of six studies, in this Doctoral Thesis we have analysed the implication of autophagy in TSEs and have further studied the validation of potential biomarkers of these diseases based on the evaluation of protein-coding genes and circulating miRNAs and exosomes, fulfilling the objectives described at the beginning of the Thesis.

VII. 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 100º: 4´
4. Alcohol 100º: 4´
5. Alcohol 96º: 1´
6. Alcohol 70º: 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 100º: 1´
2. Alcohol 100º: 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 (3-5 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 100º: 5´
4. Alcohol 100º: 5´
5. Alcohol 96º: 3´
6. Alcohol 70º: 3´

Pasar las preparaciones a agua destilada (H₂O_d).

No dejar secar las preparaciones a partir de este punto.

-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; 8G8, 1:200)
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 (PET) blot

Cortar las muestras de encéfalo (4 micras) 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 Immunoglobulins/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 microglía

Mantener las muestras a 60°C un mínimo de 30 minutos antes de empezar la técnica.

-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 30' en PBS
3. Lavar 10' con agua corriente

-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 goat polyclonal anti-Iba1 1:600 (ab5076; Abcam) en solución de bloqueo durante 24 h a 4°C
6. Lavar 3 veces con PBS
7. Incubar con el anticuerpo secundario (Swine anti-goat/mouse/rabbit immunoglobulin G biotinylated multilink, Dako) 1:200 en solución de bloqueo durante h
8. Lavar 3 veces con PBS
9. Incubar con complejo avidina-biotina (Vectastain ABC kit, Vector Labs Inc.) durante 30´
10. Lavar 3 veces con PBS
11. Teñir las muestras con DAB durante 5´
12. Parar la reacción con agua destilada
13. Contrateñir con hematoxilina 1´
14. Lavar con agua corriente 5´

-Deshidratación y montaje

Anexo 5. Técnica de inmunohistoquímica para la detección de GFAP

Mantener las muestras a 60°C un mínimo de 30 minutos antes de empezar la técnica.

-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 la solución de bloqueo (kit Envision-DAB, Dako, Dinamarca) durante 5´
2. Lavar 3 veces con TBST
3. Incubar con anticuerpo primario anti-GFAP (Dako, Dinamarca) 1:500 durante 30´
4. Lavar 3 veces con TBST
5. Incubar con el polímero marcado Envision goat anti-rabbit (kit Envision DAB, Dako) durante 30´
6. Lavar 3 veces con TBST
7. Teñir las muestras con DAB durante 5´
8. Parar la reacción con agua destilada
9. Contrateñir con hematoxilina 5´ y lavar con agua destilada

-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 6. Técnica de inmunohistoquímica para la detección de marcadores de autofagia (ATG5, LC3-B, LC3-A y p62), BAMBI y CHGA

Mantener las muestras a 60°C un mínimo de 30 minutos antes de empezar la técnica.

-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 monoclonal anti APG5, 1:50, 24 h a 4°C (C-1, sc-133158; Santa Cruz Biotechnology)
 - b. Mouse monoclonal anti MAP-LC3β, 1:200, 1 h a RT (G-2, sc-271625; Santa Cruz Biotechnology)
 - c. Rabbit polyclonal anti MAP-LC3α, 1:50, 24 h a 4°C (R-23, sc-134226; Santa Cruz Biotechnology)
 - d. Rabbit polyclonal anti p62, 1:200, 1 h a RT (PW9860; Enzo Life Sciences)
 - e. Rabbit polyclonal anti BAMBI, 1:1000, 1 h a RT (PA5-38027; ThermoFisher)
 - f. Rabbit polyclonal anti CHGA, 1:200, 1 h a RT (PA5-16685; ThermoFisher)
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 APG5 y MAP-LC3β durante 30´

- b. Goat anti-rabbit (kit Envision DAB, Dako) para MAP-LC3 α , p62, BAMBI y CHGA 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 7. Protocolo de Western blot para la detección de marcadores de autofagia (ATG5, LC3-B, LC3-A y p62), BAMBI, CHGA y PrP^{Sc}

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 (sólo para PrP^{Sc}):

1. Diluir 10,7 μ l de PK (18,6 mg/ml) en 1 ml de Tampón A (Bio-rad), y añadir 200 μ l de esta mezcla a 200 μ l del homogeneizado
2. Incubar a 37°C durante 10'
3. Añadir 200 μ l de butanol y centrifugar a 15000g a 4°C durante 7'
4. Eliminar el sobrenadante, añadir 100 μ l de Laemmli Sample Buffer 2x (Bio-rad) y desnaturizar a 100°C durante 5'
5. 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 μ l de la muestra en 10 μ l del tampón de carga
3. Incubar las muestras a 95°C durante 5'
4. Cargar 25 μ g de proteína en los pocillos del gel
5. Realizar la electroforesis a 120 V durante 80-85'

-Transferencia:

1. Preparar buffer de transferencia (Tris + glicina + metanol + H₂O_d)
2. Activar la membrana de nitrocelulosa, haciendo inmersiones en:
 - a. Metanol: 10''
 - b. H₂O_d: 10''
 - c. Buffer de transferencia: 10'
3. Sumergir el papel Whatman en el buffer de transferencia
4. Poner en contacto el gel con la membrana
5. Realizar la transferencia a 400 mA durante 1 h

-Inmunodetección:

1. Lavar la membrana con TTBS 3 x 5´
2. Bloquear la membrana en una solución de TTBS con leche desnatada al 5% a 4°C durante toda la noche
3. Incubar con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo durante 1 h a RT:
 - a. Mouse monoclonal anti APG5 1:1000 (C-1, sc-133158; Santa Cruz Biotechnology)
 - b. Mouse monoclonal anti MAP-LC3 β 1:8000 (G-2, sc-271625; Santa Cruz Biotechnology)
 - c. Rabbit polyclonal anti MAP-LC3 α , 1:1000 (R-23, sc-134226; Santa Cruz Biotechnology)
 - d. Rabbit polyclonal anti p62, 1:1000 (PW9860; Enzo Life Sciences)
 - e. Rabbit polyclonal BAMBI, 1:1000 (PA5-38027; ThermoFisher)
 - f. Rabbit polyclonal CHGA, 1:1000 (PA5-16685; ThermoFisher)
 - g. 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:
 - a. Goat anti-mouse IgG-HRP 1:4000 (Santa Cruz Biotechnology) para APG5, MAP-LC3 β y Sha31
 - b. Goat anti-rabbit IgG-HRP 1:4000 (Santa Cruz Biotechnology) para MAP-LC3 α , p62, BAMBI y CHGA
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 Dot blot para la detección de PrP^{Sc}**-Digestión:**

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

-Transferencia:

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

-Inmunodetección:

1. Bloqueo de la membrana en 50 ml de PBST 0,1% + BSA 2% durante 30' en agitación lenta
2. Incubación con 30 ml del anticuerpo primario Sha31, diluido 1:8000 en PBST + BSA, durante 30' en agitación lenta
3. Lavado con PBST 1 x 5' y 1 x 10' en agitación rápida
4. Incubación con 40 ml del anticuerpo secundario HRP anti-mouse (Bio-rad), diluido 1:5000 en PBST + BSA durante 20' en agitación lenta
5. Lavado con PBST 1 x 5' y 2 x 10' en agitación rápida
6. Sumergir la membrana en H₂O_d 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 9. Aislamiento de exosomas de plasma

Total Exosome Isolation kit (from plasma) (Invitrogen):

1. Descongelar las muestras en el baño maría a 37°C durante 2'
2. Dar un vórtex y dejar reposar durante 30''
3. Tomar 250 µl y trasvasarlos a otro tubo distinto
4. Centrifugar 22' a 22°C, 2000g
5. Tomar 225 µl de sobrenadante y trasvasarlo a un nuevo tubo de 2 ml
6. Centrifugar 22' a 22°C, 10000g
7. Tomar 200 µl de sobrenadante y trasvasarlo a un nuevo tubo de 2 ml
8. Añadir 100 µl de PBS filtrado
9. Añadir 10 µl de PK y dar un vórtex
10. Incubar los tubos durante 12' a 37°C en baño maría
11. Dar un vórtex a la muestra
12. Añadir 66 µl del precipitante Total Exosome Isolation reagent (ref. 4484450; Invitrogen Life Technologies)
13. Incubar las muestras 35' a 4°C
14. Centrifugar 6' a 22°C, 10000g
15. Eliminar el sobrenadante
16. Resuspender el pellet en 100 µl de PBS

miRCURY™ Exosome Isolation Kit - Serum and plasma (Exiqon):

1. Añadir 6 µl de Trombina a 0.6 ml de plasma, mezclarlos e incubar durante 5' a RT
2. Centrifugar durante 5' a 10000g
3. Transferir 0.5 ml de sobrenadante en un nuevo tubo de 1.5 ml
4. Añadir 200 µl del Buffer de Precipitación A y dar un vórtex durante 5'' para mezclar
5. Incubar durante 60' a 4°C y centrifugar durante 5' a 500g a RT
6. Eliminar todo el sobrenadante
7. Resuspender el pellet en 270 µl de Buffer de Resuspensión utilizando el vórtex

Anexo 10. Aislamiento de exosomas de líquido cefalorraquídeo

Total Exosome Isolation kit (from other body fluids) (Invitrogen):

1. Descongelar las muestras a 25-37°C
2. Centrifugar la muestra durante 30' a 4°C, 2000g
3. Tomar 900 µl de sobrenadante y trasvasarlos a un nuevo tubo de 2 ml
4. Centrifugar 30' a 4°C, 10000g
5. Tomar 700 µl de sobrenadante y trasvasarlo a un nuevo tubo de 2 ml
6. Añadir 700 µl del precipitante Total Exosome Isolation reagent (ref. 4484453; Invitrogen Life Technologies)
7. Depositar los tubos en hielo e incubar 1 h
8. Centrifugar 1 h a 4°C, 10000g
9. Eliminar el sobrenadante y recoger el pellet
10. Centrifugar 5' a 10000g
11. Eliminar el resto de sobrenadante
12. Resuspender el pellet con 75 µl de PBS
13. Centrifugar 5' a 10000g
14. Recoger el sobrenadante en un nuevo tubo de 2 ml

miRCURY™ Exosome Isolation Kit - Cells, Urine & CSF (Exiqon):

1. Centrifugar 1.1 ml de muestra durante 5' a 10000g
2. Transferir 1 ml de sobrenadante en un nuevo tubo de 2 ml
3. Añadir 400 µl del Buffer de Precipitación B, invertir el tubo varias veces y dar un vórtex durante 5'' para mezclar
4. Incubar durante 60' a 4°C
5. Centrifugar durante 30' a 20°C, 10000g
6. Eliminar todo el sobrenadante
7. Resuspender el pellet en 100 µl de Buffer de Resuspensión para obtener exosomas intactos

VIII. REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Affram, K. O., Mitchell, K., & Symes, A. J. (2017). Microglial Activation Results in Inhibition of TGF-beta-Regulated Gene Expression. *J Mol Neurosci*, *63*(3-4), 308-319. doi: 10.1007/s12031-017-0980-3
- Agarraberes, F. A., & Dice, J. F. (2001). A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci*, *114*(Pt 13), 2491-2499.
- Aguib, Y., Gilch, S., Krammer, C., Ertmer, A., Groschup, M. H., & Schatzl, H. M. (2008). Neuroendocrine cultured cells counteract persistent prion infection by down-regulation of PrPc. *Mol Cell Neurosci*, *38*(1), 98-109. doi: 10.1016/j.mcn.2008.02.004
- Aguib, Y., Heiseke, A., Gilch, S., Riemer, C., Baier, M., Schatzl, H. M., & Ertmer, A. (2009). Autophagy induction by trehalose counteracts cellular prion infection. *Autophagy*, *5*(3), 361-369.
- Aguzzi, A., & Haass, C. (2003). Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease. *Science*, *302*(5646), 814-818. doi: 10.1126/science.1087348
- Aguzzi, A., & Polymenidou, M. (2004). Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell*, *116*(2), 313-327.
- Aguzzi, A. (2006). Prion diseases of humans and farm animals: epidemiology, genetics, and pathogenesis. *J Neurochem*, *97*(6), 1726-1739. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03909.x
- Aguzzi, A., Baumann, F., & Bremer, J. (2008). The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci*, *31*, 439-477. doi: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125620
- Aguzzi, A., & Falsig, J. (2012). Prion propagation, toxicity and degradation. *Nat Neurosci*, *15*(7), 936-939. doi: 10.1038/nn.3120
- Aiken, J. M., Williamson, J. L., & Marsh, R. F. (1989). Evidence of mitochondrial involvement in scrapie infection. *J Virol*, *63*(4), 1686-1694.
- Aladzcity, I., Toth, M. L., Sigmond, T., Szabo, E., Bicsak, B., Barna, J., . . . Vellai, T. (2007). Autophagy genes *unc-51* and *bec-1* are required for normal cell size in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *177*(1), 655-660. doi: 10.1534/genetics.107.075762
- Alais, S., Soto-Rifo, R., Balter, V., Gruffat, H., Manet, E., Schaeffer, L., . . . Leblanc, P. (2012). Functional mechanisms of the cellular prion protein (PrP(C)) associated anti-HIV-1 properties. *Cell Mol Life Sci*, *69*(8), 1331-1352. doi: 10.1007/s00018-011-0879-z
- 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.
- Alvarez, L., Arranz, J. J., & San Primitivo, F. (2006). Identification of a new leucine haplotype (ALQ) at codon 154 in the ovine prion protein gene in Spanish sheep. *J Anim Sci*, *84*(2), 259-265.

- Andreoletti, O., Berthon, P., Marc, D., Sarradin, P., Grosclaude, J., van Keulen, L., . . . 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., . . . 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
- Andreoletti, O., Orge, L., Benestad, S. L., Beringue, V., Litaïse, C., Simon, S., . . . Lacroux, C. (2011). Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. *PLoS Pathog*, *7*(2), e1001285. doi: 10.1371/journal.ppat.1001285
- Andreoletti, O., Litaïse, C., Simmons, H., Corbiere, F., Lugan, S., Costes, P., . . . Lacroux, C. (2012). Highly efficient prion transmission by blood transfusion. *PLoS Pathog*, *8*(6), e1002782. doi: 10.1371/journal.ppat.1002782
- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M. T., Michel, P. P., Marquez, J., . . . Agid, Y. (1997). Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol*, *12*(1), 25-31.
- Araki, K., & Nagata, K. (2011). Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *3*(11), a007526. doi: 10.1101/cshperspect.a007526
- Ariosa, A. R., & Klionsky, D. J. (2016). Autophagy core machinery: overcoming spatial barriers in neurons. *J Mol Med (Berl)*, *94*(11), 1217-1227. doi: 10.1007/s00109-016-1461-9
- Ashok, A., & Hegde, R. S. (2009). Selective processing and metabolism of disease-causing mutant prion proteins. *PLoS Pathog*, *5*(6), e1000479. doi: 10.1371/journal.ppat.1000479
- Atarashi, R., Moore, R. A., Sim, V. L., Hughson, A. G., Dorward, D. W., Onwubiko, H. 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
- Atwal, R. S., & Truant, R. (2008). A stress sensitive ER membrane-association domain in Huntingtin protein defines a potential role for Huntingtin in the regulation of autophagy. *Autophagy*, *4*(1), 91-93.
- Avila, J., Lucas, J. J., Perez, M., & Hernandez, F. (2004). Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev*, *84*(2), 361-384. doi: 10.1152/physrev.00024.2003
- Babelhadj, B., Di Bari, M. A., Pirisinu, L., Chiappini, B., Gaouar, S. B. S., Riccardi, G., . . . Vaccari, G. (2018). Prion Disease in Dromedary Camels, Algeria. *Emerg Infect Dis*, *24*(6), 1029-1036. doi: 10.3201/eid2406.172007

- Baixauli, F., Lopez-Otin, C., & Mittelbrunn, M. (2014). Exosomes and autophagy: coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness. *Front Immunol*, 5, 403. doi: 10.3389/fimmu.2014.00403
- Banerjee, R., Beal, M. F., & Thomas, B. (2010). Autophagy in neurodegenerative disorders: pathogenic roles and therapeutic implications. *Trends Neurosci*, 33(12), 541-549. doi: 10.1016/j.tins.2010.09.001
- Bannach, O., Birkmann, E., Reinartz, E., Jaeger, K. E., Langeveld, J. P., Rohwer, R. G., . . . Riesner, D. (2012). Detection of prion protein particles in blood plasma of scrapie infected sheep. *PLoS One*, 7(5), e36620. doi: 10.1371/journal.pone.0036620
- Barlow, R. M. (1972). Transmissible mink encephalopathy: pathogenesis and nature of the aetiological agent. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*, 6, 102-109.
- Bartz, J. C., Kincaid, A. E., & Bessen, R. A. (2002). Retrograde transport of transmissible mink encephalopathy within descending motor tracts. *J Virol*, 76(11), 5759-5768.
- Basu, U., Guan, L. L., & Moore, S. S. (2012). Functional genomics approach for identification of molecular processes underlying neurodegenerative disorders in prion diseases. *Curr Genomics*, 13(5), 369-378. doi: 10.2174/138920212801619223
- Baumann, F., Tolnay, M., Brabeck, C., Pahnke, J., Kloz, U., Niemann, H. H., . . . Aguzzi, A. (2007). Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. *EMBO J*, 26(2), 538-547. doi: 10.1038/sj.emboj.7601510
- Baylis, M., & Goldmann, W. (2004). The genetics of scrapie in sheep and goats. *Curr Mol Med*, 4(4), 385-396.
- Bedford, L., Hay, D., Devoy, A., Paine, S., Powe, D. G., Seth, R., . . . Mayer, R. J. (2008). Depletion of 26S proteasomes in mouse brain neurons causes neurodegeneration and Lewy-like inclusions resembling human pale bodies. *J Neurosci*, 28(33), 8189-8198. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2218-08.2008
- Bedford, L., Paine, S., Sheppard, P. W., Mayer, R. J., & Roelofs, J. (2010). Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol*, 20(7), 391-401. doi: 10.1016/j.tcb.2010.03.007
- 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
- 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(3), 181-184.
- Begara-McGorum, I., Clark, A. M., Martin, S., & Jeffrey, M. (2000). Prevalence of vacuolar lesions consistent with scrapie in the brains of healthy cull sheep of the Shetland Islands. *Vet Rec*, 147(16), 439-441.

- Begara-McGorum, I., Gonzalez, L., Simmons, M., Hunter, N., Houston, F., & Jeffrey, M. (2002). Vacuolar lesion profile in sheep scrapie: factors influencing its variation and relationship to disease-specific PrP accumulation. *J Comp Pathol*, *127*(1), 59-68.
- Belt, P. B., Muileman, I. H., Schreuder, B. E., Bos-de Ruijter, J., Gielkens, A. L., & Smits, M. A. (1995). Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol*, *76* (Pt 3), 509-517. doi: 10.1099/0022-1317-76-3-509
- Bell, J. E., & Ironside, J. W. (1993). Neuropathology of spongiform encephalopathies in humans. *Br Med Bull*, *49*(4), 738-777.
- Bellingham, S. A., Coleman, B. M., & Hill, A. F. (2012). Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res*, *40*(21), 10937-10949. doi: 10.1093/nar/gks832
- Bellingham, S. A., Guo, B. B., Coleman, B. M., & Hill, A. F. (2012). Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front Physiol*, *3*, 124. doi: 10.3389/fphys.2012.00124
- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J., & Mazure, N. M. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol*, *29*(10), 2570-2581. doi: 10.1128/MCB.00166-09
- Bence, N. F., Sampat, R. M., & Kopito, R. R. (2001). Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science*, *292*(5521), 1552-1555. doi: 10.1126/science.292.5521.1552
- 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.
- Benestad, S. L., Arsac, J. N., Goldmann, W., & Noremark, M. (2008). Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet Res*, *39*(4), 19. doi: 10.1051/vetres:2007056
- Benestad, S. L., Mitchell, G., Simmons, M., Ytrehus, B., & Vikoren, T. (2016). First case of chronic wasting disease in Europe in a Norwegian free-ranging reindeer. *Vet Res*, *47*(1), 88. doi: 10.1186/s13567-016-0375-4
- Bennett, M. C., Bishop, J. F., Leng, Y., Chock, P. B., Chase, T. N., & Mouradian, M. M. (1999). Degradation of alpha-synuclein by proteasome. *J Biol Chem*, *274*(48), 33855-33858.
- Benvegna, S., Franciotta, D., Sussman, J., Bachi, A., Zardini, E., Torreri, P., . . . Legname, G. (2009). Prion protein paralog doppel protein interacts with alpha-2-macroglobulin: a plausible mechanism for doppel-mediated neurodegeneration. *PLoS One*, *4*(6), e5968. doi: 10.1371/journal.pone.0005968

- Beranger, F., Mange, A., Goud, B., & Lehmann, S. (2002). Stimulation of PrP(C) retrograde transport toward the endoplasmic reticulum increases accumulation of PrP(Sc) in prion-infected cells. *J Biol Chem*, 277(41), 38972-38977. doi: 10.1074/jbc.M205110200
- Berger, Z., Ravikumar, B., Menzies, F. M., Oroz, L. G., Underwood, B. R., Pangalos, M. N., . . . Rubinsztein, D. C. (2006). Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Hum Mol Genet*, 15(3), 433-442. doi: 10.1093/hmg/ddi458
- Berrone, E., Corona, C., Mazza, M., Vallino Costassa, E., Faro, M. L., Properzi, F., . . . Casalone, C. (2015). Detection of cellular prion protein in exosomes derived from ovine plasma. *J Gen Virol*, 96(12), 3698-3702. doi: 10.1099/jgv.0.000291
- Berry, D. L., & Baehrecke, E. H. (2007). Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell*, 131(6), 1137-1148. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.048
- Berry, D. L., & Baehrecke, E. H. (2008). Autophagy functions in programmed cell death. *Autophagy*, 4(3), 359-360.
- Bhat, K. P., Yan, S., Wang, C. E., Li, S., & Li, X. J. (2014). Differential ubiquitination and degradation of huntingtin fragments modulated by ubiquitin-protein ligase E3A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(15), 5706-5711. doi: 10.1073/pnas.1402215111
- Bialik, S., & Kimchi, A. (2010). Lethal weapons: DAP-kinase, autophagy and cell death: DAP-kinase regulates autophagy. *Curr Opin Cell Biol*, 22(2), 199-205. doi: 10.1016/j.ceb.2009.11.004
- Billinis, C., Psychas, V., Leontides, L., Spyrou, V., Argyroudis, S., Vlemmas, I., . . . Papadopoulos, O. (2004). Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece. *J Gen Virol*, 85(Pt 2), 547-554. doi: 10.1099/vir.0.19520-0
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., . . . Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, 171(4), 603-614. doi: 10.1083/jcb.200507002
- Bjorkoy, G., Lamark, T., & Johansen, T. (2006). p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery. *Autophagy*, 2(2), 138-139.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Overvatn, A., Brech, A., & Johansen, T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*, 452, 181-197. doi: 10.1016/S0076-6879(08)03612-4
- Blennow, K., Johansson, A., & Zetterberg, H. (2005). Diagnostic value of 14-3-3beta immunoblot and T-tau/P-tau ratio in clinically suspected Creutzfeldt-Jakob disease. *Int J Mol Med*, 16(6), 1147-1149.
- Boellaard, J. W., Schlote, W., & Tateishi, J. (1989). Neuronal autophagy in experimental Creutzfeldt-Jakob's disease. *Acta Neuropathol*, 78(4), 410-418.

- Boellaard, J. W., Kao, M., Schlote, W., & Diringer, H. (1991). Neuronal autophagy in experimental scrapie. *Acta Neuropathol*, *82*(3), 225-228.
- Boese, A. S., Saba, R., Campbell, K., Majer, A., Medina, S., Burton, L., . . . 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
- Boland, B., Kumar, A., Lee, S., Platt, F. M., Wegiel, J., Yu, W. H., & Nixon, R. A. (2008). Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, *28*(27), 6926-6937. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0800-08.2008
- Bolea, R., Monleon, E., Schiller, I., Raeber, A. J., Acin, C., Monzon, M., . . . 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
- 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.
- Booth, S., Bowman, C., Baumgartner, R., Sorensen, G., Robertson, C., Coulthart, M., . . . Somorjai, R. L. (2004). Identification of central nervous system genes involved in the host response to the scrapie agent during preclinical and clinical infection. *J Gen Virol*, *85*(Pt 11), 3459-3471. doi: 10.1099/vir.0.80110-0
- Borchelt, D. R., Scott, M., Taraboulos, A., Stahl, N., & Prusiner, S. B. (1990). Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol*, *110*(3), 743-752.
- Borchelt, D. R., Taraboulos, A., & Prusiner, S. B. (1992). Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem*, *267*(23), 16188-16199.
- Borchelt, D. R., Koliatsos, V. E., Guarnieri, M., Pardo, C. A., Sisodia, S. S., & Price, D. L. (1994). Rapid anterograde axonal transport of the cellular prion glycoprotein in the peripheral and central nervous systems. *J Biol Chem*, *269*(20), 14711-14714.
- Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., . . . Aguzzi, A. (1996). Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature*, *379*(6563), 339-343. doi: 10.1038/379339a0
- Brotherston, J. G., Renwick, C. C., Stamp, J. T., Zlotnik, I., & Pattison, I. H. (1968). Spread and scrapie by contact to goats and sheep. *J Comp Pathol*, *78*(1), 9-17.
- Brown, D. R., Schulz-Schaeffer, W. J., Schmidt, B., & Kretzschmar, H. A. (1997). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol*, *146*(1), 104-112. doi: 10.1006/exnr.1997.6505

- Brown, D. R. (2000). PrP^{Sc}-like prion protein peptide inhibits the function of cellular prion protein. *Biochem J*, 352 Pt 2, 511-518.
- Brown, P. (1990). The phantasmagoric immunology of transmissible spongiform encephalopathy. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, 68, 305-313.
- Bruce, M. E., & Fraser, H. (1991). Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol*, 172, 125-138.
- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., . . . 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
- Bruce, M. E. (2003). TSE strain variation. *Br Med Bull*, 66, 99-108.
- Budka, H. (2003). Neuropathology of prion diseases. *Br Med Bull*, 66, 121-130.
- 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.
- Burman, C., & Ktistakis, N. T. (2010). Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Lett*, 584(7), 1302-1312. doi: 10.1016/j.febslet.2010.01.011
- Bursch, W., Hochegger, K., Torok, L., Marian, B., Ellinger, A., & Hermann, R. S. (2000). Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J Cell Sci*, 113 (Pt 7), 1189-1198.
- Bursch, W. (2001). The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ*, 8(6), 569-581. doi: 10.1038/sj.cdd.4400852
- Bursch, W. (2004). Multiple cell death programs: Charon's lifts to Hades. *FEMS Yeast Res*, 5(2), 101-110. doi: 10.1016/j.femsyr.2004.07.006
- Bursch, W., & Ellinger, A. (2005). Autophagy--a basic mechanism and a potential role for neurodegeneration. *Folia Neuropathol*, 43(4), 297-310.
- Caccamo, A., Majumder, S., Richardson, A., Strong, R., & Oddo, S. (2010). Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments. *J Biol Chem*, 285(17), 13107-13120. doi: 10.1074/jbc.M110.100420
- Cammarata, S., & Tabaton, M. (1992). Ubiquitin-reactive axons have a widespread distribution and are unrelated to prion protein plaques in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Sci*, 110(1-2), 32-36.
- Carlson, G. A., Goodman, P. A., Lovett, M., Taylor, B. A., Marshall, S. T., Peterson-Torchia, M., . . . Prusiner, S. B. (1988). Genetics and polymorphism of the mouse prion gene complex: control of scrapie incubation time. *Mol Cell Biol*, 8(12), 5528-5540.
- Carlson, G. A., Ebeling, C., Torchia, M., Westaway, D., & Prusiner, S. B. (1993). Delimiting the location of the scrapie prion incubation time gene on chromosome 2 of the mouse. *Genetics*, 133(4), 979-988.

- Cassard, H., Torres, J. M., Lacroux, C., Douet, J. Y., Benestad, S. L., Lantier, F., . . . 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. 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: 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., Race, R. E., Ernst, D., Buchmeier, M. J., & Chesebro, B. (1989). Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol*, *63*(1), 175-181.
- Caughey, B., & Raymond, G. J. (1991). The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem*, *266*(27), 18217-18223.
- Caughey, B., & Race, R. E. (1992). Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red. *J Neurochem*, *59*(2), 768-771.
- Caughey, B., & Raymond, G. J. (1993). Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol*, *67*(2), 643-650.
- Caughey, B., Kocisko, D. A., Raymond, G. J., & Lansbury, P. T., Jr. (1995). Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem Biol*, *2*(12), 807-817.
- Caughey, B., & Chesebro, B. (2001). Transmissible spongiform encephalopathies and prion protein interconversions. *Adv Virus Res*, *56*, 277-311.
- Cervenakova, L., Saa, P., Yakovleva, O., Vasilyeva, I., de Castro, J., Brown, P., & Dodd, R. (2016). Are prions transported by plasma exosomes? *Transfus Apher Sci*, *55*(1), 70-83. doi: 10.1016/j.transci.2016.07.013
- Cianfanelli, V., Fuoco, C., Lorente, M., Salazar, M., Quondamatteo, F., Gherardini, P. F., . . . Cecconi, F. (2015). AMBRA1 links autophagy to cell proliferation and tumorigenesis by promoting c-Myc dephosphorylation and degradation. *Nat Cell Biol*, *17*(5), 706. doi: 10.1038/ncb3171
- Ciesielski-Treska, J., Ulrich, G., Taupenot, L., Chasserot-Golaz, S., Corti, A., Aunis, D., & Bader, M. F. (1998). Chromogranin A induces a neurotoxic phenotype in brain microglial cells. *J Biol Chem*, *273*(23), 14339-14346.
- Clarke, P. G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)*, *181*(3), 195-213.

- Cloucard, C., Beaudry, P., Elsen, J. M., Milan, D., Dussaucy, M., Bounneau, C., . . . Laplanche, J. L. (1995). Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. *J Gen Virol*, *76* (Pt 8), 2097-2101. doi: 10.1099/0022-1317-76-8-2097
- Cohen, E., & Taraboulos, A. (2003). Scrapie-like prion protein accumulates in aggresomes of cyclosporin A-treated cells. *EMBO J*, *22*(3), 404-417. doi: 10.1093/emboj/cdg045
- Cohen, F. E. (1999). Protein misfolding and prion diseases. *J Mol Biol*, *293*(2), 313-320. doi: 10.1006/jmbi.1999.2990
- Colacino, S., Tiana, G., & Colombo, G. (2006). Similar folds with different stabilization mechanisms: the cases of Prion and Doppel proteins. *BMC Struct Biol*, *6*, 17. doi: 10.1186/1472-6807-6-17
- Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J., & Hill, A. F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, *383*(6602), 685-690. doi: 10.1038/383685a0
- Collins, S. J., Sanchez-Juan, P., Masters, C. L., Klug, G. M., van Duijn, C., Poggi, A., . . . Will, R. G. (2006). Determinants of diagnostic investigation sensitivities across the clinical spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain*, *129*(Pt 9), 2278-2287. doi: 10.1093/brain/awl159
- Comoy, E. E., Mikol, J., Luccantoni-Freire, S., Correia, E., Lescoutra-Etcheagaray, N., Durand, V., . . . Deslys, J. P. (2015). Transmission of scrapie prions to primate after an extended silent incubation period. *Sci Rep*, *5*, 11573. doi: 10.1038/srep11573
- 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
- Cortez, L., & Sim, V. (2014). The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases. *Prion*, *8*(2).
- Cosseddu, G. M., Andreoletti, O., Maestrale, C., Robert, B., Ligios, C., Piumi, F., . . . Vaiman, D. (2007). Gene expression profiling on sheep brain reveals differential transcripts in scrapie-affected/not-affected animals. *Brain Res*, *1142*, 217-222. doi: 10.1016/j.brainres.2007.01.033
- Couplier, M., Messiaen, S., Hamel, R., Fernandez de Marco, M., Lilin, T., & Eloit, M. (2006). Bax deletion does not protect neurons from BSE-induced death. *Neurobiol Dis*, *23*(3), 603-611. doi: 10.1016/j.nbd.2006.05.013
- Criollo, A., Maiuri, M. C., Tasdemir, E., Vitale, I., Fiebig, A. A., Andrews, D., . . . Kroemer, G. (2007). Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor. *Cell Death Differ*, *14*(5), 1029-1039. doi: 10.1038/sj.cdd.4402099

- Cuervo, A. M., & Dice, J. F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, *273*(5274), 501-503.
- Cuervo, A. M., & Dice, J. F. (1998). Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J Mol Med (Berl)*, *76*(1), 6-12.
- Cuervo, A. M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T., & Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*, *305*(5688), 1292-1295. doi: 10.1126/science.1101738
- Cuervo, A. M. (2010a). The plasma membrane brings autophagosomes to life. *Nat Cell Biol*, *12*(8), 735-737. doi: 10.1038/ncb0810-735
- Cuervo, A. M. (2010b). Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. *Trends Endocrinol Metab*, *21*(3), 142-150. doi: 10.1016/j.tem.2009.10.003
- Cuervo, A. M. (2011). Chaperone-mediated autophagy: Dice's 'wild' idea about lysosomal selectivity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *12*(8), 535-541. doi: 10.1038/nrm3150
- Cuille, J., & Chelle, P. L. (1936). Pathologie animale – La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable ? *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des Sciences*(203), 1552-1554.
- Cuille, J., & Chelle, P. L. (1938). Le tremblante du mouton est bien inoculable. *Comptes rendus hebdomadaires des sciences de l'Academie des Sciences*(206), 78-79.
- Chakrabarti, O., Ashok, A., & Hegde, R. S. (2009). Prion protein biosynthesis and its emerging role in neurodegeneration. *Trends Biochem Sci*, *34*(6), 287-295. doi: 10.1016/j.tibs.2009.03.001
- Chandler, R. L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *The Lancet*, *277*(7191), 1378-1379.
- Cheng, M., Liu, L., Lao, Y., Liao, W., Liao, M., Luo, X., . . . Xu, N. (2016). MicroRNA-181a suppresses parkin-mediated mitophagy and sensitizes neuroblastoma cells to mitochondrial uncoupler-induced apoptosis. *Oncotarget*, *7*(27), 42274-42287. doi: 10.18632/oncotarget.9786
- Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., LaCasse, R., . . . Oldstone, M. (2005). Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science*, *308*(5727), 1435-1439. doi: 10.1126/science.1110837
- Chesebro, B., Race, B., Meade-White, K., Lacasse, R., Race, R., Klingeborn, M., . . . Jeffrey, M. (2010). Fatal transmissible amyloid encephalopathy: a new type of prion disease associated with lack of prion protein membrane anchoring. *PLoS Pathog*, *6*(3), e1000800. doi: 10.1371/journal.ppat.1000800
- Chiang, H. L., Terlecky, S. R., Plant, C. P., & Dice, J. F. (1989). A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science*, *246*(4928), 382-385.

- Chiesa, R., Piccardo, P., Dossena, S., Nowoslawski, L., Roth, K. A., Ghetti, B., & Harris, D. A. (2005). Bax deletion prevents neuronal loss but not neurological symptoms in a transgenic model of inherited prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(1), 238-243. doi: 10.1073/pnas.0406173102
- Chiesa, R. (2015). The elusive role of the prion protein and the mechanism of toxicity in prion disease. *PLoS Pathog*, *11*(5), e1004745. doi: 10.1371/journal.ppat.1004745
- Chu, C. T. (2011). Autophagy in different flavors: dysregulated protein degradation in neurological diseases. *Neurobiol Dis*, *43*(1), 1-3. doi: 10.1016/j.nbd.2011.03.020
- da Luz, M. H., Peres, I. T., Santos, T. G., Martins, V. R., Icimoto, M. Y., & Lee, K. S. (2015). Dopamine induces the accumulation of insoluble prion protein and affects autophagic flux. *Front Cell Neurosci*, *9*, 12. doi: 10.3389/fncel.2015.00012
- Dandoy-Dron, F., Guillo, F., Benboudjema, L., Deslys, J. P., Lasmezas, C., Dormont, D., . . . Dron, M. (1998). Gene expression in scrapie. Cloning of a new scrapie-responsive gene and the identification of increased levels of seven other mRNA transcripts. *J Biol Chem*, *273*(13), 7691-7697.
- Dandoy-Dron, F., Benboudjema, L., Guillo, F., Jaegly, A., Jasmin, C., Dormont, D., . . . Dron, M. (2000). Enhanced levels of scrapie responsive gene mRNA in BSE-infected mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res*, *76*(1), 173-179.
- Dassanayake, R. P., Madsen-Bouterse, S. A., Truscott, T. C., Zhuang, D., Mousel, M. R., Davis, W. C., & Schneider, D. A. (2016). Classical scrapie prions are associated with peripheral blood monocytes and T-lymphocytes from naturally infected sheep. *BMC Vet Res*, *12*, 27. doi: 10.1186/s12917-016-0651-6
- Dawson, M., Hoinville, L. J., Hosie, B. D., & Hunter, N. (1998). Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Scrapie Information Group. *Vet Rec*, *142*(23), 623-625.
- De Duve, C. (1963). The lysosome. *Sci Am*, *208*, 64-72.
- De Duve, C., & Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol*, *28*, 435-492. doi: 10.1146/annurev.ph.28.030166.002251
- DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1993). The neurochemistry of prion diseases. *J Neurochem*, *61*(5), 1589-1601.
- Dearmond, S. J., & Bajsarowicz, K. (2010). PrPSc accumulation in neuronal plasma membranes links Notch-1 activation to dendritic degeneration in prion diseases. *Mol Neurodegener*, *5*, 6. doi: 10.1186/1750-1326-5-6
- Debnath, J., Baehrecke, E. H., & Kroemer, G. (2005). Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy*, *1*(2), 66-74.

- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., . . . Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*, *1*(2), 112-119. doi: 10.1038/nchembio711
- Denton, D., Xu, T., & Kumar, S. (2015). Autophagy as a pro-death pathway. *Immunol Cell Biol*, *93*(1), 35-42. doi: 10.1038/icb.2014.85
- Deretic, V., & Levine, B. (2009). Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe*, *5*(6), 527-549. doi: 10.1016/j.chom.2009.05.016
- Deretic, V., Saitoh, T., & Akira, S. (2013). Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, *13*(10), 722-737. doi: 10.1038/nri3532
- Deriziotis, P., Andre, R., Smith, D. M., Goold, R., Kinghorn, K. J., Kristiansen, M., . . . Tabrizi, S. J. (2011). Misfolded PrP impairs the UPS by interaction with the 20S proteasome and inhibition of substrate entry. *EMBO J*, *30*(15), 3065-3077. doi: 10.1038/emboj.2011.224
- DeSilva, U., Guo, X., Kupfer, D. M., Fernando, S. C., Pillai, A. T., Najjar, F. Z., . . . Roe, B. A. (2003). Allelic variants of ovine prion protein gene (PRNP) in Oklahoma sheep. *Cytogenet Genome Res*, *102*(1-4), 89-94. doi: 75731
- Deslys, J. P., Lasmezas, C. I., Comoy, E., & Domont, D. (2001). Diagnosis of bovine spongiform encephalopathy. *Vet J*, *161*(1), 1-3. doi: 10.1053/tvj.2000.0530
- Detwiler, L. A., & Baylis, M. (2003). The epidemiology of scrapie. *Rev Sci Tech*, *22*(1), 121-143.
- Di Bartolomeo, S., Nazio, F., & Cecconi, F. (2010). The role of autophagy during development in higher eukaryotes. *Traffic*, *11*(10), 1280-1289. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01103.x
- Diaz, C., Vitezica, Z. G., Rupp, R., Andreoletti, O., & Elsen, J. M. (2005). Polygenic variation and transmission factors involved in the resistance/susceptibility to scrapie in a Romanov flock. *J Gen Virol*, *86*(Pt 3), 849-857. doi: 10.1099/vir.0.80412-0
- Dice, J. F. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci*, *15*(8), 305-309.
- Dickinson, A. G., Stamp, J. T., & Renwick, C. C. (1974). Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. *J Comp Pathol*, *84*(1), 19-25.
- Dickinson, A. G. (1975). Host-pathogen interactions in scrapie. *Genetics*, *79 Suppl*, 387-395.
- Dickinson, A. G., & Outram, G. (1979). The scrapie replication-site hypothesis and its implications for pathogenesis. In S. B. Prusiner & W. J. Hadlow (Eds.), *Slow transmissible diseases of the nervous system* (Vol. 2, pp. 13-31): Academic Press.
- Ding, W. X., Ni, H. M., Gao, W., Yoshimori, T., Stolz, D. B., Ron, D., & Yin, X. M. (2007). Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol*, *171*(2), 513-524. doi: 10.2353/ajpath.2007.070188
- Diringer, H. (1992). Hidden amyloidoses. *Exp Clin Immunogenet*, *9*(4), 212-229.

- Djeddi, A., Michelet, X., Culetto, E., Alberti, A., Barois, N., & Legouis, R. (2012). Induction of autophagy in ESCRT mutants is an adaptive response for cell survival in *C. elegans*. *J Cell Sci*, *125*(Pt 3), 685-694. doi: 10.1242/jcs.091702
- Dorandeu, A., Wingertsmann, L., Chretien, F., Delisle, M. B., Vital, C., Parchi, P., . . . Gray, F. (1998). Neuronal apoptosis in fatal familial insomnia. *Brain Pathol*, *8*(3), 531-537.
- Drisaldi, B., Stewart, R. S., Adles, C., Stewart, L. R., Quaglio, E., Biasini, E., . . . Harris, D. A. (2003). Mutant PrP is delayed in its exit from the endoplasmic reticulum, but neither wild-type nor mutant PrP undergoes retrotranslocation prior to proteasomal degradation. *J Biol Chem*, *278*(24), 21732-21743. doi: 10.1074/jbc.M213247200
- Dron, M., Bailly, Y., Beringue, V., Haeblerle, A. M., Griffond, B., Risold, P. Y., . . . Dandoy-Dron, F. (2005). Scrg1 is induced in TSE and brain injuries, and associated with autophagy. *Eur J Neurosci*, *22*(1), 133-146. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04172.x
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H. U., & Kimchi, A. (2009). Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ*, *16*(7), 966-975. doi: 10.1038/cdd.2009.33
- Eloit, M., Adjou, K., Couplier, M., Fontaine, J. J., Hamel, R., Lilin, T., . . . Sarradin, P. (2005). BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec*, *156*(16), 523-524.
- Epple, U. D., Suriapranata, I., Eskelinen, E. L., & Thumm, M. (2001). Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole. *J Bacteriol*, *183*(20), 5942-5955. doi: 10.1128/JB.183.20.5942-5955.2001
- Ertmer, A., Gilch, S., Yun, S. W., Flechsig, E., Klebl, B., Stein-Gerlach, M., . . . Schatzl, H. M. (2004). The tyrosine kinase inhibitor STI571 induces cellular clearance of PrPSc in prion-infected cells. *J Biol Chem*, *279*(40), 41918-41927. doi: 10.1074/jbc.M405652200
- Ertmer, A., Huber, V., Gilch, S., Yoshimori, T., Erfle, V., Duyster, J., . . . Schatzl, H. M. (2007). The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia*, *21*(5), 936-942. doi: 10.1038/sj.leu.2404606
- Eskelinen, E. L. (2005). Doctor Jekyll and Mister Hyde: autophagy can promote both cell survival and cell death. *Cell Death Differ*, *12 Suppl 2*, 1468-1472. doi: 10.1038/sj.cdd.4401721
- Fader, C. M., & Colombo, M. I. (2006). Multivesicular bodies and autophagy in erythrocyte maturation. *Autophagy*, *2*(2), 122-125.
- Fader, C. M., Sanchez, D., Furlan, M., & Colombo, M. I. (2008). Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. *Traffic*, *9*(2), 230-250. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00677.x
- Fairbairn, D. W., Carnahan, K. G., Thwaites, R. N., Grigsby, R. V., Holyoak, G. R., & O'Neill, K. L. (1994). Detection of apoptosis induced DNA cleavage in scrapie-infected sheep brain. *FEMS Microbiol Lett*, *115*(2-3), 341-346.

- Farre, J. C., Krick, R., Subramani, S., & Thumm, M. (2009). Turnover of organelles by autophagy in yeast. *Curr Opin Cell Biol*, *21*(4), 522-530. doi: 10.1016/j.ceb.2009.04.015
- Fast, C., & Groschup, M. H. (2013). Classical and atypical scrapie in sheep and goats *Prions and Diseases* (pp. 15-44): Springer.
- Feng, Y., He, D., Yao, Z., & Klionsky, D. J. (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Res*, *24*(1), 24-41. doi: 10.1038/cr.2013.168
- Fernandez-Funez, P., Casas-Tinto, S., Zhang, Y., Gomez-Velazquez, M., Morales-Garza, M. A., Cepeda-Nieto, A. C., . . . Rincon-Limas, D. E. (2009). In vivo generation of neurotoxic prion protein: role for hsp70 in accumulation of misfolded isoforms. *PLoS Genet*, *5*(6), e1000507. doi: 10.1371/journal.pgen.1000507
- Ferrer, I. (1999). Nuclear DNA fragmentation in Creutzfeldt-Jakob disease: does a mere positive in situ nuclear end-labeling indicate apoptosis? *Acta Neuropathol*, *97*(1), 5-12.
- Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., . . . Raposo, G. (2004). Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(26), 9683-9688. doi: 10.1073/pnas.0308413101
- Filali, H., Martin-Burriel, I., Harders, F., Varona, L., Lyahyai, J., Zaragoza, P., . . . Bolea, R. (2011). Gene expression profiling and association with prion-related lesions in the medulla oblongata of symptomatic natural scrapie animals. *PLoS One*, *6*(5), e19909. doi: 10.1371/journal.pone.0019909
- Filali, H., Martin-Burriel, I., Harders, F., Varona, L., Serrano, C., Acin, C., . . . Bolea, R. (2012). Medulla oblongata transcriptome changes during presymptomatic natural scrapie and their association with prion-related lesions. *BMC Genomics*, *13*, 399. doi: 10.1186/1471-2164-13-399
- Filali, H., Vidal, E., Bolea, R., Marquez, M., Marco, P., Vargas, A., . . . Badiola, J. J. (2013). Gene and protein patterns of potential prion-related markers in the central nervous system of clinical and preclinical infected sheep. *Vet Res*, *44*, 14. doi: 10.1186/1297-9716-44-14
- Fimia, G. M., & Piacentini, M. (2010). Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, *67*(10), 1581-1588. doi: 10.1007/s00018-010-0284-z
- Ford, M. J., Burton, L. J., Li, H., Graham, C. H., Frobert, Y., Grassi, J., . . . Morris, R. J. (2002). A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS. *Neuroscience*, *111*(3), 533-551.
- Fortun, J., Dunn, W. A., Jr., Joy, S., Li, J., & Notterpek, L. (2003). Emerging role for autophagy in the removal of aggregates in Schwann cells. *J Neurosci*, *23*(33), 10672-10680.
- 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.
- Frake, R. A., Ricketts, T., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2015). Autophagy and neurodegeneration. *J Clin Invest*, *125*(1), 65-74. doi: 10.1172/JCI73944

- Franch, H. A., Sooparb, S., Du, J., & Brown, N. S. (2001). A mechanism regulating proteolysis of specific proteins during renal tubular cell growth. *J Biol Chem*, *276*(22), 19126-19131. doi: 10.1074/jbc.M101777200
- 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.
- Fraser, H. (1993). Diversity in the neuropathology of scrapie-like diseases in animals. *Br Med Bull*, *49*(4), 792-809.
- Fraser, J. R. (2002). What is the basis of transmissible spongiform encephalopathy induced neurodegeneration and can it be repaired? *Neuropathol Appl Neurobiol*, *28*(1), 1-11.
- Fruhbeis, C., Frohlich, D., Kuo, W. P., Amphornrat, J., Thilemann, S., Saab, A. S., . . . Kramer-Albers, E. M. (2013). Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol*, *11*(7), e1001604. doi: 10.1371/journal.pbio.1001604
- Fuertes, G., Martin De Llano, J. J., Villarroya, A., Rivett, A. J., & Knecht, E. (2003). Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions. *Biochem J*, *375*(Pt 1), 75-86. doi: 10.1042/BJ20030282
- Fuertes, G., Villarroya, A., & Knecht, E. (2003). Role of proteasomes in the degradation of short-lived proteins in human fibroblasts under various growth conditions. *Int J Biochem Cell Biol*, *35*(5), 651-664.
- Funderburk, S. F., Marcellino, B. K., & Yue, Z. (2010). Cell "self-eating" (autophagy) mechanism in Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med*, *77*(1), 59-68. doi: 10.1002/msj.20161
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., . . . Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*, *19*(1), 107-120. doi: 10.1038/cdd.2011.96
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., . . . Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, *25*(3), 486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4
- Gambetti, P., Dong, Z., Yuan, J., Xiao, X., Zheng, M., Alshekhlee, A., . . . Zou, W. Q. (2008). A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Ann Neurol*, *63*(6), 697-708. doi: 10.1002/ana.21420
- Garcia-Mata, R., Gao, Y. S., & Sztul, E. (2002). Hassles with taking out the garbage: aggravating aggresomes. *Traffic*, *3*(6), 388-396.

- Gibbins, D., Mostowy, S., Jay, F., Schwab, Y., Cossart, P., & Voinnet, O. (2012). Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity. *Nat Cell Biol*, *14*(12), 1314-1321. doi: 10.1038/ncb2611
- Giese, A., Groschup, M. H., Hess, B., & Kretzschmar, H. A. (1995). Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol*, *5*(3), 213-221.
- 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.
- Gilch, S., Winklhofer, K. F., Groschup, M. H., Nunziante, M., Lucassen, R., Spielhauer, C., . . . Schatzl, H. M. (2001). Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP(Sc) and delays onset of prion disease. *EMBO J*, *20*(15), 3957-3966. doi: 10.1093/emboj/20.15.3957
- Glatzel, M., Giger, O., Braun, N., & Aguzzi, A. (2004). The peripheral nervous system and the pathogenesis of prion diseases. *Curr Mol Med*, *4*(4), 355-359.
- Glatzel, M., Stoeck, K., Seeger, H., Luhrs, T., & Aguzzi, A. (2005). Human prion diseases: molecular and clinical aspects. *Arch Neurol*, *62*(4), 545-552. doi: 10.1001/archneur.62.4.545
- Goetzl, E. J., Boxer, A., Schwartz, J. B., Abner, E. L., Petersen, R. C., Miller, B. L., & Kapogiannis, D. (2015). Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease. *Neurology*, *85*(1), 40-47. doi: 10.1212/WNL.0000000000001702
- Goldmann, W., Hunter, N., Foster, J. D., Salbaum, J. M., Beyreuther, K., & Hope, J. (1990). Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(7), 2476-2480.
- Goldmann, W., Hunter, N., Benson, G., Foster, J. D., & Hope, J. (1991). Different scrapie-associated fibril proteins (PrP) are encoded by lines of sheep selected for different alleles of the Sip gene. *J Gen Virol*, *72* (Pt 10), 2411-2417. doi: 10.1099/0022-1317-72-10-2411
- 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., 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., 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. *Vet Rec*, *162*(13), 397-403.

- Gonzalez, L., Jeffrey, M., Dagleish, M. P., Goldmann, W., Siso, S., Eaton, S. L., . . . 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., Pitarch, J. L., Martin, S., Thurston, L., Simmons, H., Acin, C., & Jeffrey, M. (2014). Influence of polymorphisms in the prion protein gene on the pathogenesis and neuropathological phenotype of sheep scrapie after oral infection. *J Comp Pathol*, *150*(1), 57-70. doi: 10.1016/j.jcpa.2013.10.001
- Goold, R., Rabbanian, S., Sutton, L., Andre, R., Arora, P., Moonga, J., . . . Tabrizi, S. J. (2011). Rapid cell-surface prion protein conversion revealed using a novel cell system. *Nat Commun*, *2*, 281. doi: 10.1038/ncomms1282
- 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. *Mol Cell Neurosci*, *66*(Pt A), 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.
- Gozuacik, D., & Kimchi, A. (2007). Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol*, *78*, 217-245. doi: 10.1016/S0070-2153(06)78006-1
- Graeber, M. B., & Moran, L. B. (2002). Mechanisms of cell death in neurodegenerative diseases: fashion, fiction, and facts. *Brain Pathol*, *12*(3), 385-390.
- Gray, F., Chretien, F., Adle-Biassette, H., Dorandeu, A., Ereau, T., Delisle, M. B., . . . Vital, C. (1999). Neuronal apoptosis in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, *58*(4), 321-328.
- Green, A. J., Thompson, E. J., Stewart, G. E., Zeidler, M., McKenzie, J. M., MacLeod, M. A., . . . Knight, R. S. (2001). Use of 14-3-3 and other brain-specific proteins in CSF in the diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *70*(6), 744-748.
- Grenier, C., Bissonnette, C., Volkov, L., & Roucou, X. (2006). Molecular morphology and toxicity of cytoplasmic prion protein aggregates in neuronal and non-neuronal cells. *J Neurochem*, *97*(5), 1456-1466. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03837.x
- Griffith, J. S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature*, *215*(5105), 1043-1044.
- 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
- Guduric-Fuchs, J., O'Connor, A., Camp, B., O'Neill, C. L., Medina, R. J., & Simpson, D. A. (2012). Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics*, 13, 357. doi: 10.1186/1471-2164-13-357
- Guo, B. B., Bellingham, S. A., & Hill, A. F. (2016). Stimulating the Release of Exosomes Increases the Intercellular Transfer of Prions. *J Biol Chem*, 291(10), 5128-5137. doi: 10.1074/jbc.M115.684258
- Guo, J. L., & Lee, V. M. (2014). Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nat Med*, 20(2), 130-138. doi: 10.1038/nm.3457
- Halliez, S., Jaumain, E., Huor, A., Douet, J. Y., Lugan, S., Cassard, H., . . . Vilette, D. (2014). White blood cell-based detection of asymptomatic scrapie infection by ex vivo assays. *PLoS One*, 9(8), e104287. doi: 10.1371/journal.pone.0104287
- Han, J., Back, S. H., Hur, J., Lin, Y. H., Gildersleeve, R., Shan, J., . . . 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
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., . . . Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441(7095), 885-889. doi: 10.1038/nature04724
- Harada, M., Hanada, S., Toivola, D. M., Ghori, N., & Omary, M. B. (2008). Autophagy activation by rapamycin eliminates mouse Mallory-Denk bodies and blocks their proteasome inhibitor-mediated formation. *Hepatology*, 47(6), 2026-2035. doi: 10.1002/hep.22294
- Haraguchi, T., Fisher, S., Olofsson, S., Endo, T., Groth, D., Tarentino, A., . . . et al. (1989). Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys*, 274(1), 1-13.
- Harris, D. A. (2003). Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br Med Bull*, 66, 71-85.
- Hartmann, A., Muth, C., Dabrowski, O., Krasemann, S., & Glatzel, M. (2017). Exosomes and the Prion Protein: More than One Truth. *Front Neurosci*, 11, 194. doi: 10.3389/fnins.2017.00194
- Hebert, D. N., & Molinari, M. (2007). In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev*, 87(4), 1377-1408. doi: 10.1152/physrev.00050.2006

- Hebert, S. S., & De Strooper, B. (2009). Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. *Trends Neurosci*, 32(4), 199-206. doi: 10.1016/j.tins.2008.12.003
- Hegde, R. S., Mastrianni, J. A., Scott, M. R., DeFea, K. A., Tremblay, P., Torchia, M., . . . Lingappa, V. R. (1998). A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science*, 279(5352), 827-834.
- Heiseke, A., Schobel, S., Lichtenthaler, S. F., Vorberg, I., Groschup, M. H., Kretzschmar, H., . . . Nunziante, M. (2008). The novel sorting nexin SNX33 interferes with cellular PrP formation by modulation of PrP shedding. *Traffic*, 9(7), 1116-1129. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00750.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.
- Heitz, S., Grant, N. J., Leschiera, R., Haerberle, A. M., Demais, V., Bombarde, G., & Bailly, Y. (2010). Autophagy and cell death of Purkinje cells overexpressing Doppel in Ngsk Prnp-deficient mice. *Brain Pathol*, 20(1), 119-132. doi: 10.1111/j.1750-3639.2008.00245.x
- Hemelaar, J., Lelyveld, V. S., Kessler, B. M., & Ploegh, H. L. (2003). A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *J Biol Chem*, 278(51), 51841-51850. doi: 10.1074/jbc.M308762200
- 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
- Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Walchli, S., Carboni, S., Vial-Knecht, E., Maundrell, K., . . . Soto, C. (2005). The disulfide isomerase Grp58 is a protective factor against prion neurotoxicity. *J Neurosci*, 25(11), 2793-2802. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4090-04.2005
- Hetz, C., Castilla, J., & Soto, C. (2007). Perturbation of endoplasmic reticulum homeostasis facilitates prion replication. *J Biol Chem*, 282(17), 12725-12733. doi: 10.1074/jbc.M611909200
- Hetz, C., Lee, A. H., Gonzalez-Romero, D., Thielen, P., Castilla, J., Soto, C., & Glimcher, L. H. (2008). Unfolded protein response transcription factor XBP-1 does not influence prion replication or pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(2), 757-762. doi: 10.1073/pnas.0711094105
- Hetz, C., & Mollereau, B. (2014). Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 15(4), 233-249. doi: 10.1038/nrn3689

- Hetz, C. A., & Soto, C. (2006). Stressing out the ER: a role of the unfolded protein response in prion-related disorders. *Curr Mol Med*, 6(1), 37-43.
- Hochstrasser, M. (1995). Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol*, 7(2), 215-223.
- Hoinville, L. J. (1996). A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev Sci Tech*, 15(3), 827-852.
- 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
- Houston, F., McCutcheon, S., Goldmann, W., Chong, A., Foster, J., Siso, S., . . . Hunter, N. (2008). Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood*, 112(12), 4739-4745. doi: DOI 10.1182/blood-2008-04-152520
- 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
- Huang, J., & Klionsky, D. J. (2007). Autophagy and human disease. *Cell Cycle*, 6(15), 1837-1849. doi: 10.4161/cc.6.15.4511
- Hunter, N. (2007). Scrapie: uncertainties, biology and molecular approaches. *Biochim Biophys Acta*, 1772(6), 619-628. doi: 10.1016/j.bbadis.2007.04.007
- 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
- Iannuzzi, L., Palomba, R., Di Meo, G. P., Perucatti, A., & Ferrara, L. (1998). Comparative FISH-mapping of the prion protein gene (PRNP) on cattle, river buffalo, sheep and goat chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, 81(3-4), 202-204. doi: 10.1159/000015030
- Ichimura, Y., Imamura, Y., Emoto, K., Umeda, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2004). In vivo and in vitro reconstitution of Atg8 conjugation essential for autophagy. *J Biol Chem*, 279(39), 40584-40592. doi: 10.1074/jbc.M405860200
- Ikegami, Y., Ito, M., Isomura, H., Momotani, E., Sasaki, K., Muramatsu, Y., . . . Shinagawa, M. (1991). Pre-clinical and clinical diagnosis of scrapie by detection of PrP protein in tissues of sheep. *Vet Rec*, 128(12), 271-275.
- Imran, M., & Mahmood, S. (2011a). An overview of human prion diseases. *Virol J*, 8, 559. doi: 10.1186/1743-422X-8-559
- Imran, M., & Mahmood, S. (2011b). An overview of animal prion diseases. *Virol J*, 8, 493. doi: 10.1186/1743-422X-8-493
- Institute of Medicine, U. (2003). Advancing Prion Science: Guidance for the National Prion Research Program: Interim Report. . In R. Erdtmann & L. Sivitz (Eds.), *Advancing Prion*

- Science: Guidance for the National Prion Research Program*. Washington DC: National Academies Press (US).
- Iwata, A., Riley, B. E., Johnston, J. A., & Kopito, R. R. (2005). HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem*, *280*(48), 40282-40292. doi: 10.1074/jbc.M508786200
- Jaeger, P. A., Pickford, F., Sun, C. H., Lucin, K. M., Masliah, E., & Wyss-Coray, T. (2010). Regulation of amyloid precursor protein processing by the Beclin 1 complex. *PLoS One*, *5*(6), e11102. doi: 10.1371/journal.pone.0011102
- Jahreiss, L., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2008). The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic*, *9*(4), 574-587. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00701.x
- Jamieson, E., Jeffrey, M., Ironside, J. W., & Fraser, J. R. (2001). Apoptosis and dendritic dysfunction precede prion protein accumulation in 87V scrapie. *Neuroreport*, *12*(10), 2147-2153.
- Jarrett, J. T., & Lansbury, P. T., Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, *73*(6), 1055-1058.
- 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.
- Jeffrey, M., Goodbrand, I. A., & Goodsir, C. M. (1995). Pathology of the transmissible spongiform encephalopathies with special emphasis on ultrastructure. *Micron*, *26*(3), 277-298.
- 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.
- 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., 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*(Pt 4), 1033-1045. doi: 10.1099/vir.0.18825-0
- Jeffrey, M., Martin, S., Gonzalez, L., Foster, J., Langeveld, J. P., van Zijderveld, F. G., . . . Hunter, N. (2006). Immunohistochemical features of PrP(d) accumulation in natural and experimental goat transmissible spongiform encephalopathies. *J Comp Pathol*, *134*(2-3), 171-181. doi: S0021-9975(05)00121-0 [pii]

10.1016/j.jcpa.2005.10.003

Jeffrey, M., & Gonzalez, L. (2007). Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 33(4), 373-394. doi: 10.1111/j.1365-2990.2007.00868.x

Jeong, J. K., & Park, S. Y. (2015). Neuroprotective effect of cellular prion protein (PrPC) is related with activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor (alpha7nAChR)-mediated autophagy flux. *Oncotarget*, 6(28), 24660-24674. doi: 10.18632/oncotarget.4953

Jesionek-Kupnicka, D., Buczynski, J., Kordek, R., & Liberski, P. P. (1999). Neuronal loss and apoptosis in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *Folia Neuropathol*, 37(4), 283-286.

Jesionek-Kupnicka, D., Kordek, R., Buczynski, J., & Liberski, P. P. (2001). Apoptosis in relation to neuronal loss in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 61(1), 13-19.

Jiang, P., & Mizushima, N. (2014). Autophagy and human diseases. *Cell Res*, 24(1), 69-79. doi: 10.1038/cr.2013.161

Jin, M., & Klionsky, D. J. (2014). Regulation of autophagy: modulation of the size and number of autophagosomes. *FEBS Lett*, 588(15), 2457-2463. doi: 10.1016/j.febslet.2014.06.015

Jin, S., & White, E. (2007). Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy*, 3(1), 28-31.

Jin, T., Gu, Y., Zanusso, G., Sy, M., Kumar, A., Cohen, M., . . . Singh, N. (2000). The chaperone protein BiP binds to a mutant prion protein and mediates its degradation by the proteasome. *J Biol Chem*, 275(49), 38699-38704. doi: 10.1074/jbc.M005543200

Johnston, J. A., Ward, C. L., & Kopito, R. R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*, 143(7), 1883-1898.

Johnston, J. A., Illing, M. E., & Kopito, R. R. (2002). Cytoplasmic dynein/dynactin mediates the assembly of aggresomes. *Cell Motil Cytoskeleton*, 53(1), 26-38. doi: 10.1002/cm.10057

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., . . . Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 19(21), 5720-5728. doi: 10.1093/emboj/19.21.5720

Kabuta, T., Suzuki, Y., & Wada, K. (2006). Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant Cu,Zn-superoxide dismutase proteins by macroautophagy and the proteasome. *J Biol Chem*, 281(41), 30524-30533. doi: 10.1074/jbc.M603337200

Kalani, A., Tyagi, A., & Tyagi, N. (2014). Exosomes: mediators of neurodegeneration, neuroprotection and therapeutics. *Mol Neurobiol*, 49(1), 590-600. doi: 10.1007/s12035-013-8544-1

- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol*, *150*(6), 1507-1513.
- Kang, S. C., Brown, D. R., Whiteman, M., Li, R., Pan, T., Perry, G., . . . Wong, B. S. (2004). Prion protein is ubiquitinated after developing protease resistance in the brains of scrapie-infected mice. *J Pathol*, *203*(1), 603-608. doi: 10.1002/path.1555
- Katz, J. B., Pedersen, J. C., Jenny, A. L., & Taylor, W. D. (1992). Assessment of western immunoblotting for the confirmatory diagnosis of ovine scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *J Vet Diagn Invest*, *4*(4), 447-449. doi: 10.1177/104063879200400414
- Kawaguchi, Y., Kovacs, J. J., McLaurin, A., Vance, J. M., Ito, A., & Yao, T. P. (2003). The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*, *115*(6), 727-738.
- Kegel, K. B., Kim, M., Sapp, E., McIntyre, C., Castano, J. G., Aronin, N., & DiFiglia, M. (2000). Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci*, *20*(19), 7268-7278.
- Kenward, N., Hope, J., Landon, M., & Mayer, R. J. (1994). Expression of polyubiquitin and heat-shock protein 70 genes increases in the later stages of disease progression in scrapie-infected mouse brain. *J Neurochem*, *62*(5), 1870-1877.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, *26*(4), 239-257.
- Khaminets, A., Behl, C., & Dikic, I. (2016). Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends Cell Biol*, *26*(1), 6-16. doi: 10.1016/j.tcb.2015.08.010
- Khosravani, H., Zhang, Y., Tsutsui, S., Hameed, S., Altier, C., Hamid, J., . . . Zamponi, G. W. (2008). Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *J Cell Biol*, *181*(3), 551-565. doi: 10.1083/jcb.200711002
- Kim, J., Huang, W. P., Stromhaug, P. E., & Klionsky, D. J. (2002). Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation. *J Biol Chem*, *277*(1), 763-773. doi: 10.1074/jbc.M109134200
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K. L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, *13*(2), 132-141. doi: 10.1038/ncb2152
- Kim, J., Fiesel, F. C., Belmonte, K. C., Hudec, R., Wang, W. X., Kim, C., . . . Kim, J. (2016). miR-27a and miR-27b regulate autophagic clearance of damaged mitochondria by targeting PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1). *Mol Neurodegener*, *11*(1), 55. doi: 10.1186/s13024-016-0121-4

- Kim, S. J., & Hegde, R. S. (2002). Cotranslational partitioning of nascent prion protein into multiple populations at the translocation channel. *Mol Biol Cell*, *13*(11), 3775-3786. doi: 10.1091/mbc.e02-05-0293
- Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2013). Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu Rev Biochem*, *82*, 323-355. doi: 10.1146/annurev-biochem-060208-092442
- Kimberlin, R. H. (1982). Reflections on the nature of scrapie agent. *Trends Biochem Sci*, *7*(11), 392-394.
- Kingsbury, D. T., Kasper, K. C., Stites, D. P., Watson, J. D., Hogan, R. N., & Prusiner, S. B. (1983). Genetic control of scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *J Immunol*, *131*(1), 491-496.
- Kiryama, Y., & Nochi, H. (2015). The Function of Autophagy in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*, *16*(11), 26797-26812. doi: 10.3390/ijms161125990
- Klionsky, D. J., & Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, *290*(5497), 1717-1721.
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., . . . Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell*, *5*(4), 539-545.
- Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., . . . Chiba, T. (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol*, *169*(3), 425-434. doi: 10.1083/jcb.200412022
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., . . . Tanaka, K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, *441*(7095), 880-884. doi: 10.1038/nature04723
- Komatsu, M., Wang, Q. J., Holstein, G. R., Friedrich, V. L., Jr., Iwata, J., Kominami, E., . . . Yue, Z. (2007). Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(36), 14489-14494. doi: 10.1073/pnas.0701311104
- Kopito, R. R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*, *10*(12), 524-530.
- Korkut, C., Ataman, B., Ramachandran, P., Ashley, J., Barria, R., Gherbesi, N., & Budnik, V. (2009). Trans-synaptic transmission of vesicular Wnt signals through Evi/Wntless. *Cell*, *139*(2), 393-404. doi: 10.1016/j.cell.2009.07.051
- Korolchuk, V. I., Mansilla, A., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2009). Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol Cell*, *33*(4), 517-527. doi: 10.1016/j.molcel.2009.01.021

- Korolchuk, V. I., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2010). Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett*, *584*(7), 1393-1398. doi: 10.1016/j.febslet.2009.12.047
- Kovacs, G. G., Preusser, M., Strohschneider, M., & Budka, H. (2005). Subcellular localization of disease-associated prion protein in the human brain. *Am J Pathol*, *166*(1), 287-294. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62252-3
- Kovacs, G. G., & Budka, H. (2008). Prion diseases: from protein to cell pathology. *Am J Pathol*, *172*(3), 555-565. doi: 10.2353/ajpath.2008.070442
- Kovacs, J., Fellingner, E., Karpati, P. A., Kovacs, A. L., & Laszlo, L. (1986). The turnover of autophagic vacuoles: evaluation by quantitative electron microscopy. *Biomed Biochim Acta*, *45*(11-12), 1543-1547.
- Kowal, J., Tkach, M., & Thery, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol*, *29*, 116-125. doi: 10.1016/j.ceb.2014.05.004
- 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.
- Kristiansen, M., Messenger, M. J., Klohn, P. C., Brandner, S., Wadsworth, J. D., Collinge, J., & Tabrizi, S. J. (2005). Disease-related prion protein forms aggresomes in neuronal cells leading to caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem*, *280*(46), 38851-38861. doi: 10.1074/jbc.M506600200
- Kristiansen, M., Deriziotis, P., Dimcheff, D. E., Jackson, G. S., Ovaa, H., Naumann, H., . . . Tabrizi, S. J. (2007). Disease-associated prion protein oligomers inhibit the 26S proteasome. *Mol Cell*, *26*(2), 175-188. doi: 10.1016/j.molcel.2007.04.001
- Kroemer, G., & Jaattela, M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer*, *5*(11), 886-897. doi: 10.1038/nrc1738
- Kroemer, G., & Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *9*(12), 1004-1010. doi: 10.1038/nrm2529
- Kroemer, G., Marino, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, *40*(2), 280-293. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.023
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., . . . Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, *432*(7020), 1032-1036. doi: 10.1038/nature03029
- Kuma, A., Komatsu, M., & Mizushima, N. (2017). Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice. *Autophagy*, *13*(10), 1619-1628. doi: 10.1080/15548627.2017.1343770
- Kumar, S., & Reddy, P. H. (2016). Are circulating microRNAs peripheral biomarkers for Alzheimer's disease? *Biochim Biophys Acta*, *1862*(9), 1617-1627. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.06.001

- Kunz, J. B., Schwarz, H., & Mayer, A. (2004). Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro. *J Biol Chem*, 279(11), 9987-9996. doi: 10.1074/jbc.M307905200
- Kuusisto, E., Kauppinen, T., & Alafuzoff, I. (2008). Use of p62/SQSTM1 antibodies for neuropathological diagnosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 34(2), 169-180. doi: 10.1111/j.1365-2990.2007.00884.x
- Lacroux, C., Vilette, D., Fernandez-Borges, N., Litaise, C., Lugan, S., Morel, N., . . . 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
- Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., Sze, N. S., Choo, A., Chen, T. S., . . . Lim, S. K. (2010). Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res*, 4(3), 214-222. doi: 10.1016/j.scr.2009.12.003
- Langeveld, J. P., Jacobs, J. G., Erkens, J. H., Bossers, A., van Zijderveld, F. G., & van Keulen, L. J. (2006). Rapid and discriminatory diagnosis of scrapie and BSE in retro-pharyngeal lymph nodes of sheep. *BMC Vet Res*, 2, 19. doi: 10.1186/1746-6148-2-19
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274-293. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017
- Lauren, J., Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Gilbert, J. W., & Strittmatter, S. M. (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature*, 457(7233), 1128-1132. doi: 10.1038/nature07761
- Le Dur, A., Beringue, V., Andreoletti, O., Reine, F., Lai, T. L., Baron, T., . . . Laude, H. (2005). A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(44), 16031-16036. doi: 10.1073/pnas.0502296102
- Leblanc, P., Alais, S., Porto-Carreiro, I., Lehmann, S., Grassi, J., Raposo, G., & Darlix, J. L. (2006). Retrovirus infection strongly enhances scrapie infectivity release in cell culture. *EMBO J*, 25(12), 2674-2685. doi: 10.1038/sj.emboj.7601162
- Lee, J. A., Beigneux, A., Ahmad, S. T., Young, S. G., & Gao, F. B. (2007). ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol*, 17(18), 1561-1567. doi: 10.1016/j.cub.2007.07.029
- Lee, P. C., Sowa, M. E., Gygi, S. P., & Harper, J. W. (2011). Alternative ubiquitin activation/conjugation cascades interact with N-end rule ubiquitin ligases to control degradation of RGS proteins. *Mol Cell*, 43(3), 392-405. doi: 10.1016/j.molcel.2011.05.034
- Leggett, M. M., Dukes, J., & Pirie, H. M. (1990). A spongiform encephalopathy in a cat. *Vet Rec*, 127(24), 586-588.

- Levine, B., & Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 6(4), 463-477.
- Levine, B., & Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*, 115(10), 2679-2688. doi: 10.1172/JCI26390
- Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), 27-42. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018
- Levine, B., Sinha, S., & Kroemer, G. (2008). Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 4(5), 600-606.
- Li, A., Christensen, H. M., Stewart, L. R., Roth, K. A., Chiesa, R., & Harris, D. A. (2007). Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105-125. *EMBO J*, 26(2), 548-558. doi: 10.1038/sj.emboj.7601507
- Li, X., Wang, C. E., Huang, S., Xu, X., Li, X. J., Li, H., & Li, S. (2010). Inhibiting the ubiquitin-proteasome system leads to preferential accumulation of toxic N-terminal mutant huntingtin fragments. *Hum Mol Genet*, 19(12), 2445-2455. doi: 10.1093/hmg/ddq127
- 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.
- Liberski, P. P., & Mori, S. (1997). The Echigo-1: a panencephalopathic strain of Creutzfeldt-Jakob disease: a passage to hamsters and ultrastructural studies. *Folia Neuropathol*, 35(4), 250-254.
- Liberski, P. P., Gajdusek, D. C., & Brown, P. (2002). How do neurons degenerate in prion diseases or transmissible spongiform encephalopathies (TSEs): neuronal autophagy revisited. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 62(3), 141-147.
- 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., 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., 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., Hauw, J. J., Kopp, N., Streichenberger, N., Giraud, P., . . . 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
- Ligios, 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.
- Ligios, C., Dexter, G., Spiropoulos, J., Maestrone, C., Carta, A., & Simmons, M. M. (2004). Distribution of vascular amyloid in scrapie-affected sheep with different genotypes. *J Comp Pathol*, 131(4), 271-276. doi: 10.1016/j.jcpa.2003.10.008
- Ligios, C., Sigurdson, C. J., Santucci, C., Carcassola, G., Manco, G., Basagni, M., . . . 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
- Linden, R., Martins, V. R., Prado, M. A., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Brentani, R. R. (2008). Physiology of the prion protein. *Physiol Rev*, 88(2), 673-728. doi: 10.1152/physrev.00007.2007
- Lindmo, K., & Stenmark, H. (2006). Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *J Cell Sci*, 119(Pt 4), 605-614. doi: 10.1242/jcs.02855
- Lindquist, S. L., & Kelly, J. W. (2011). Chemical and biological approaches for adapting proteostasis to ameliorate protein misfolding and aggregation diseases: progress and prognosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(12). doi: 10.1101/cshperspect.a004507
- Ling, D., & Salvaterra, P. M. (2009). A central role for autophagy in Alzheimer-type neurodegeneration. *Autophagy*, 5(5), 738-740.
- Ling, D., Song, H. J., Garza, D., Neufeld, T. P., & Salvaterra, P. M. (2009). Abeta42-induced neurodegeneration via an age-dependent autophagic-lysosomal injury in Drosophila. *PLoS One*, 4(1), e4201. doi: 10.1371/journal.pone.0004201
- Lipinski, M. M., Zheng, B., Lu, T., Yan, Z., Py, B. F., Ng, A., . . . Yuan, J. (2010). Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(32), 14164-14169. doi: 10.1073/pnas.1009485107
- Lucassen, P. J., Williams, A., Chung, W. C., & Fraser, H. (1995). Detection of apoptosis in murine scrapie. *Neurosci Lett*, 198(3), 185-188.
- Luhken, G., Buschmann, A., Brandt, H., Eiden, M., Groschup, M. H., & Erhardt, G. (2007). Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Vet Res*, 38(1), 65-80. doi: 10.1051/vetres:2006046
- Lukiw, W. J., Dua, P., Pogue, A. I., Eicken, C., & Hill, J. M. (2011). Upregulation of micro RNA-146a (miRNA-146a), a marker for inflammatory neurodegeneration, in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) and Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) syndrome. *J Toxicol Environ Health A*, 74(22-24), 1460-1468. doi: 10.1080/15287394.2011.618973

- Lum, J. J., Bauer, D. E., Kong, M., Harris, M. H., Li, C., Lindsten, T., & Thompson, C. B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, *120*(2), 237-248. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.046
- Lum, J. J., DeBerardinis, R. J., & Thompson, C. B. (2005). Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*(6), 439-448. doi: 10.1038/nrm1660
- Lusardi, T. A., Phillips, J. I., Wiedrick, J. T., Harrington, C. A., Lind, B., Lapidus, J. A., . . . Saugstad, J. A. (2017). MicroRNAs in Human Cerebrospinal Fluid as Biomarkers for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, *55*(3), 1223-1233. doi: 10.3233/JAD-160835
- Lyahyai, J., Bolea, R., Serrano, C., Monleon, E., Moreno, C., Osta, R., . . . Martin-Burriel, I. (2006). Correlation between Bax overexpression and prion deposition in medulla oblongata from natural scrapie without evidence of apoptosis. *Acta Neuropathol*, *112*(4), 451-460. doi: 10.1007/s00401-006-0094-4
- Lyahyai, J., Bolea, R., Serrano, C., Vidal, E., Pumarola, M., Badiola, J. J., . . . Martin-Burriel, I. (2007). Differential expression and protein distribution of Bax in natural scrapie. *Brain Res*, *1180*, 111-120. doi: 10.1016/j.brainres.2007.08.085
- Llorens, F., Thune, K., Sikorska, B., Schmitz, M., Tahir, W., Fernandez-Borges, N., . . . Zerr, I. (2017). Altered Ca(2+) homeostasis induces Calpain-Cathepsin axis activation in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol Commun*, *5*(1), 35. doi: 10.1186/s40478-017-0431-y
- Llorens, F., Barrio, T., Correia, A., Villar-Pique, A., Thune, K., Lange, P., . . . Zerr, I. (2018). Cerebrospinal Fluid Prion Disease Biomarkers in Pre-clinical and Clinical Naturally Occurring Scrapie. *Mol Neurobiol*. doi: 10.1007/s12035-018-1014-z
- Lloyd, S. E., Onwuazor, O. N., Beck, J. A., Mallinson, G., Farrall, M., Targonski, P., . . . Fisher, E. M. (2001). Identification of multiple quantitative trait loci linked to prion disease incubation period in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(11), 6279-6283. doi: 10.1073/pnas.101130398
- Lloyd, S. E., Rossor, M., Fox, N., Mead, S., & Collinge, J. (2009). HECTD2, a candidate susceptibility gene for Alzheimer's disease on 10q. *BMC Med Genet*, *10*, 90. doi: 10.1186/1471-2350-10-90
- Ma, J., & Lindquist, S. (2001). Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(26), 14955-14960. doi: 10.1073/pnas.011578098
- Ma, J. F., Huang, Y., Chen, S. D., & Halliday, G. (2010). Immunohistochemical evidence for macroautophagy in neurones and endothelial cells in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *36*(4), 312-319. doi: 10.1111/j.1365-2990.2010.01067.x
- 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

- Magalhaes, A. C., Baron, G. S., Lee, K. S., Steele-Mortimer, O., Dorward, D., Prado, M. A., & Caughey, B. (2005). Uptake and neuritic transport of scrapie prion protein coincident with infection of neuronal cells. *J Neurosci*, *25*(21), 5207-5216. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0653-05.2005
- Maier, T., Guell, M., & Serrano, L. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett*, *583*(24), 3966-3973. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.036
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., & Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *8*(9), 741-752. doi: 10.1038/nrm2239
- Majer, A., Medina, S. J., Niu, Y., Abrenica, B., Manguiat, K. J., Frost, K. 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
- Majeski, A. E., & Dice, J. F. (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, *36*(12), 2435-2444. doi: 10.1016/j.biocel.2004.02.013
- 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
- Mann, S. S., & Hammarback, J. A. (1994). Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J Biol Chem*, *269*(15), 11492-11497.
- 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.
- Manuelidis, L. (2007). A 25 nm virion is the likely cause of transmissible spongiform encephalopathies. *J Cell Biochem*, *100*(4), 897-915. doi: 10.1002/jcb.21090
- Marbiah, M. M., Harvey, A., West, B. T., Louzolo, A., Banerjee, P., Alden, J., . . . Klohn, P. C. (2014). Identification of a gene regulatory network associated with prion replication. *EMBO J*, *33*(14), 1527-1547. doi: 10.15252/embj.201387150
- Marcos-Carcavilla, A., Calvo, J. H., Gonzalez, C., Moazami-Goudarzi, K., Laurent, P., Bertaud, M., . . . Serrano, M. (2007). IL-1 family members as candidate genes modulating scrapie susceptibility in sheep: localization, partial characterization, and expression. *Mamm Genome*, *18*(1), 53-63. doi: 10.1007/s00335-006-0095-6
- Marcos-Carcavilla, A., Calvo, J. H., Gonzalez, C., Moazami-Goudarzi, K., Laurent, P., Bertaud, M., . . . Serrano, M. (2008). Structural and functional analysis of the HSP90AA1 gene: distribution of polymorphisms among sheep with different responses to scrapie. *Cell Stress Chaperones*, *13*(1), 19-29. doi: 10.1007/s12192-007-0004-2

- Marcos-Carcavilla, A., Moreno, C., Serrano, M., Laurent, P., Cribiu, E. P., Andreoletti, O., . . . Moazami-Goudarzi, K. (2010). Polymorphisms in the HSP90AA1 5' flanking region are associated with scrapie incubation period in sheep. *Cell Stress Chaperones*, *15*(4), 343-349. doi: 10.1007/s12192-009-0149-2
- Marella, M., Lehmann, S., Grassi, J., & Chabry, J. (2002). Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. *J Biol Chem*, *277*(28), 25457-25464. doi: 10.1074/jbc.M203248200
- Mari, M., Griffith, J., Rieter, E., Krishnappa, L., Klionsky, D. J., & Reggiori, F. (2010). An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *J Cell Biol*, *190*(6), 1005-1022. doi: 10.1083/jcb.200912089
- Marijanovic, Z., Caputo, A., Campana, V., & Zurzolo, C. (2009). Identification of an intracellular site of prion conversion. *PLoS Pathog*, *5*(5), e1000426. doi: 10.1371/journal.ppat.1000426
- Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., & Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *15*(2), 81-94. doi: 10.1038/nrm3735
- Martin-Aparicio, E., Yamamoto, A., Hernandez, F., Hen, R., Avila, J., & Lucas, J. J. (2001). Proteasomal-dependent aggregate reversal and absence of cell death in a conditional mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci*, *21*(22), 8772-8781.
- Martinez-Vicente, M., & Cuervo, A. M. (2007). Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol*, *6*(4), 352-361. doi: 10.1016/S1474-4422(07)70076-5
- Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., . . . Cuervo, A. M. (2010). Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci*, *13*(5), 567-576. doi: 10.1038/nn.2528
- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., & White, E. (2007). Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*, *7*(12), 961-967. doi: 10.1038/nrc2254
- Mays, C. E., Kim, C., Haldiman, T., van der Merwe, J., Lau, A., Yang, J., . . . Safar, J. G. (2014). Prion disease tempo determined by host-dependent substrate reduction. *J Clin Invest*, *124*(2), 847-858. doi: 10.1172/JCI72241
- Mays, C. E., & Soto, C. (2016). The stress of prion disease. *Brain Res*, *1648*(Pt B), 553-560. doi: 10.1016/j.brainres.2016.04.009
- McKinnon, C., Goold, R., Andre, R., Devoy, A., Ortega, Z., Moonga, J., . . . Tabrizi, S. J. (2016). Prion-mediated neurodegeneration is associated with early impairment of the ubiquitin-proteasome system. *Acta Neuropathol*, *131*(3), 411-425. doi: 10.1007/s00401-015-1508-y

- McNaught, K. S., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P., & Olanow, C. W. (2003). Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp Neurol*, *179*(1), 38-46.
- McNaught, K. S., Perl, D. P., Brownell, A. L., & Olanow, C. W. (2004). Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, *56*(1), 149-162. doi: 10.1002/ana.20186
- McPhee, C. K., Logan, M. A., Freeman, M. R., & Baehrecke, E. H. (2010). Activation of autophagy during cell death requires the engulfment receptor Draper. *Nature*, *465*(7301), 1093-1096. doi: 10.1038/nature09127
- Mead, S., Poulter, M., Uphill, J., Beck, J., Whitfield, J., Webb, T. E., . . . Collinge, J. (2009). Genetic risk factors for variant Creutzfeldt-Jakob disease: a genome-wide association study. *Lancet Neurol*, *8*(1), 57-66. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70265-5
- Mehmet, H. (2000). Caspases find a new place to hide. *Nature*, *403*(6765), 29-30. doi: 10.1038/47377
- Meijer, A. J., & Codogno, P. (2006). Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Mol Aspects Med*, *27*(5-6), 411-425. doi: 10.1016/j.mam.2006.08.002
- Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M., & Iqbal, K. (1981). Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol*, *54*(1), 63-74.
- Meydan, H., Yuceer, B., Degirmenci, R., Ozkan, M. M., & Yildiz, M. A. (2012). Prion protein gene polymorphism and genetic risk evaluation for scrapie in all Turkish native sheep breeds. *Virus Genes*, *45*(1), 169-175. doi: 10.1007/s11262-012-0744-7
- Migheli, A., Cavalla, P., Marino, S., & Schiffer, D. (1994). A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after in situ end-labeling of DNA strand breaks. *J Neuropathol Exp Neurol*, *53*(6), 606-616.
- Migheli, A., Attanasio, A., Lee, W. H., Bayer, S. A., & Ghetti, B. (1995). Detection of apoptosis in weaver cerebellum by electron microscopic in situ end-labeling of fragmented DNA. *Neurosci Lett*, *199*(1), 53-56.
- Mijaljica, D., Prescott, M., & Devenish, R. J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, *7*(7), 673-682.
- Mijaljica, D., Nazarko, T. Y., Brumell, J. H., Huang, W. P., Komatsu, M., Prescott, M., . . . Devenish, R. J. (2012). Receptor protein complexes are in control of autophagy. *Autophagy*, *8*(11), 1701-1705. doi: 10.4161/auto.21332
- 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. doi: 10.1177/104063879300500301
- Mironov, A., Jr., Latawiec, D., Wille, H., Bouzamondo-Bernstein, E., Legname, G., Williamson, R. A., . . . Peters, P. J. (2003). Cytosolic prion protein in neurons. *J Neurosci*, *23*(18), 7183-7193.

- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., . . . Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(30), 10513-10518. doi: 10.1073/pnas.0804549105
- Mitra, S., Tsvetkov, A. S., & Finkbeiner, S. (2009). Protein turnover and inclusion body formation. *Autophagy*, *5*(7), 1037-1038.
- Mittelbrunn, M., Gutierrez-Vazquez, C., Villarroya-Beltri, C., Gonzalez, S., Sanchez-Cabo, F., Gonzalez, M. A., . . . Sanchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*, *2*, 282. doi: 10.1038/ncomms1285
- Mittelbrunn, M., & Sanchez-Madrid, F. (2012). Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *13*(5), 328-335. doi: 10.1038/nrm3335
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., . . . Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol*, *152*(4), 657-668.
- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., . . . Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci*, *116*(Pt 9), 1679-1688.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2003). Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, *35*(5), 553-561.
- Mizushima, N., & Hara, T. (2006). Intracellular quality control by autophagy: how does autophagy prevent neurodegeneration? *Autophagy*, *2*(4), 302-304.
- Mizushima, N., & Klionsky, D. J. (2007). Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr*, *27*, 19-40. doi: 10.1146/annurev.nutr.27.061406.093749
- Mizushima, N., & Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, *3*(6), 542-545.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, *451*(7182), 1069-1075. doi: 10.1038/nature06639
- Mizushima, N., & Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol*, *12*(9), 823-830. doi: 10.1038/ncb0910-823
- Mohri, S., Farquhar, C. F., Somerville, R. A., Jeffrey, M., Foster, J., & Hope, J. (1992). Immunodetection of a disease specific PrP fraction in scrapie-affected sheep and BSE-affected cattle. *Vet Rec*, *131*(23), 537-539.

- Mok, S. W., Riemer, C., Madela, K., Hsu, D. K., Liu, F. T., Gultner, S., . . . 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
- Monari, L., Chen, S. G., Brown, P., Parchi, P., Petersen, R. B., Mikol, J., . . . et al. (1994). Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: different prion proteins determined by a DNA polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(7), 2839-2842.
- 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
- 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., Garza, M. C., Sarasa, R., Alvarez-Rodriguez, J., Bolea, R., Monzon, M., . . . Acin, C. (2011). An assessment of the efficiency of PrPsc detection in rectal mucosa and third-eyelid biopsies from animals infected with scrapie. *Vet Microbiol*, 147(3-4), 237-243. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.06.028
- 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., . . . 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
- Moore, R. C., Lee, I. Y., Silverman, G. L., Harrison, P. M., Strome, R., Heinrich, C., . . . Westaway, D. (1999). Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol*, 292(4), 797-817. doi: 10.1006/jmbi.1999.3108
- Moore, S. J., Simmons, M., Chaplin, M., & Spiropoulos, J. (2008). Neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in naturally occurring atypical scrapie cases in Great Britain. *Acta Neuropathol*, 116(5), 547-559. doi: 10.1007/s00401-008-0433-8
- 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, C. R., Lantier, F., Lantier, I., Sarradin, P., & Elsen, J. M. (2003). Detection of new quantitative trait Loci for susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies in mice. *Genetics*, 165(4), 2085-2091.

- Moreno, J. A., Radford, H., Peretti, D., Steinert, J. R., Verity, N., Martin, M. G., . . . Mallucci, G. R. (2012). Sustained translational repression by eIF2alpha-P mediates prion neurodegeneration. *Nature*, *485*(7399), 507-511. doi: 10.1038/nature11058
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., & Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*, *5*(7), 621-628. doi: 10.1038/nmeth.1226
- 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.
- Myllykangas, L., Tyynela, J., Page-McCaw, A., Rubin, G. M., Haltia, M. J., & Feany, M. B. (2005). Cathepsin D-deficient *Drosophila* recapitulate the key features of neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurobiol Dis*, *19*(1-2), 194-199. doi: 10.1016/j.nbd.2004.12.019
- Nagaoka, U., Kim, K., Jana, N. R., Doi, H., Maruyama, M., Mitsui, K., . . . Nukina, N. (2004). Increased expression of p62 in expanded polyglutamine-expressing cells and its association with polyglutamine inclusions. *J Neurochem*, *91*(1), 57-68. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02692.x
- Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., . . . Otsu, K. (2007). The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med*, *13*(5), 619-624. doi: 10.1038/nm1574
- Nedelsky, N. B., Todd, P. K., & Taylor, J. P. (2008). Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: collaborators in neuroprotection. *Biochim Biophys Acta*, *1782*(12), 691-699. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.10.002
- Nentwig, A., Oevermann, A., Heim, D., Botteron, C., Zellweger, K., Drogemuller, C., . . . Seuberlich, T. (2007). Diversity in neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in atypical scrapie. *PLoS Pathog*, *3*(6), e82. doi: 10.1371/journal.ppat.0030082
- Ness, S. A. (2006). Basic microarray analysis: strategies for successful experiments. *Methods Mol Biol*, *316*, 13-33. doi: 10.1385/1-59259-964-8:13
- Neufeld, T. P. (2003). Body building: regulation of shape and size by PI3K/TOR signaling during development. *Mech Dev*, *120*(11), 1283-1296.
- Niklaus, M., Adams, O., Berezowska, S., Zlobec, I., Graber, F., Slotta-Huspenina, J., . . . 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
- Nishimura, M., Tomimoto, H., Suenaga, T., Nakamura, S., Namba, Y., Ikeda, K., . . . Kimura, J. (1994). Synaptophysin and chromogranin A immunoreactivities of Lewy bodies in Parkinson's disease brains. *Brain Res*, *634*(2), 339-344.

- Nixon, R. A. (2005). Endosome function and dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*, 26(3), 373-382. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.09.018
- Nixon, R. A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W. H., Peterhoff, C., Cataldo, A., & Cuervo, A. M. (2005). Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol*, 64(2), 113-122.
- Nixon, R. A. (2007). Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci*, 120(Pt 23), 4081-4091. doi: 10.1242/jcs.019265
- Nixon, R. A. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med*, 19(8), 983-997. doi: 10.1038/nm.3232
- Nolte-'t Hoen, E. N., Buermans, H. P., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M. H., & t Hoen, P. A. (2012). Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res*, 40(18), 9272-9285. doi: 10.1093/nar/gks658
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebbersold, R., . . . et al. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 40(4), 735-746.
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., . . . Imaizumi, K. (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*, 26(24), 9220-9231. doi: 10.1128/MCB.01453-06
- Oh, J. M., Shin, H. Y., Park, S. J., Kim, B. H., Choi, J. K., Choi, E. K., . . . Kim, Y. S. (2008). The involvement of cellular prion protein in the autophagy pathway in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci*, 39(2), 238-247. doi: 10.1016/j.mcn.2008.07.003
- Oh, J. M., Choi, E. K., Carp, R. I., & Kim, Y. S. (2012). Oxidative stress impairs autophagic flux in prion protein-deficient hippocampal cells. *Autophagy*, 8(10), 1448-1461. doi: 10.4161/auto.21164
- Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(3), 211-216. doi: 10.1038/35056522
- OIE. (2008). *Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines* (4 ed.). París.
- Okamoto, K. (2014). Organellophagy: eliminating cellular building blocks via selective autophagy. *J Cell Biol*, 205(4), 435-445. doi: 10.1083/jcb.201402054
- Olanow, C. W., & McNaught, K. S. (2006). Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's disease. *Mov Disord*, 21(11), 1806-1823. doi: 10.1002/mds.21013
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2016). Número de casos de encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en bovinos de cría, señalados en el mundo, con excepción del Reino Unido. OIE, París. Disponible en: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/situacion-de-la-eeb-en-el-mundo-y-tasa-de-incidencia-anual/00-13-numero-de-casos-en-el-mundo-con-excepcion-del-reino-unido/>. Retrieved 06/09/2017

- Orsi, A., Fioriti, L., Chiesa, R., & Sitia, R. (2006). Conditions of endoplasmic reticulum stress favor the accumulation of cytosolic prion protein. *J Biol Chem*, *281*(41), 30431-30438. doi: 10.1074/jbc.M605320200
- Otto, M., Wiltfang, J., Cepek, L., Neumann, M., Mollenhauer, B., Steinacker, P., . . . Poser, S. (2002). Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*, *58*(2), 192-197.
- Pajak, B., Songin, M., Strosznajder, J. B., & Gajkowska, B. (2009). Alzheimer's disease genetic mutation evokes ultrastructural alterations: correlation to an intracellular Abeta deposition and the level of GSK-3beta-P(Y216) phosphorylated form. *Neurotoxicology*, *30*(4), 581-588. doi: 10.1016/j.neuro.2009.05.008
- Pajak, B., Songin, M., Strosznajder, J. B., Orzechowski, A., & Gajkowska, B. (2009). Ultrastructural evidence of amyloid beta-induced autophagy in PC12 cells. *Folia Neuropathol*, *47*(3), 252-258.
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., . . . 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.
- Pandey, U. B., Nie, Z., Batlevi, Y., McCray, B. A., Ritson, G. P., Nedelsky, N. B., . . . Taylor, J. P. (2007). HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*, *447*(7146), 859-863. doi: 10.1038/nature05853
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., . . . Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, *282*(33), 24131-24145. doi: 10.1074/jbc.M702824200
- Papinski, D., Schuschnig, M., Reiter, W., Wilhelm, L., Barnes, C. A., Maiolica, A., . . . Kraft, C. (2014). Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase. *Mol Cell*, *53*(3), 471-483. doi: 10.1016/j.molcel.2013.12.011
- Park, S. K., Choi, S. I., Jin, J. K., Choi, E. K., Kim, J. I., Carp, R. I., & Kim, Y. S. (2000). Differential expression of Bax and Bcl-2 in the brains of hamsters infected with 263K scrapie agent. *Neuroreport*, *11*(8), 1677-1682.
- Parkin, E. T., Watt, N. T., Turner, A. J., & Hooper, N. M. (2004). Dual mechanisms for shedding of the cellular prion protein. *J Biol Chem*, *279*(12), 11170-11178. doi: 10.1074/jbc.M312105200
- Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, *20*(3), 460-473. doi: 10.1089/ars.2013.5371
- 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.

- Pattison, I. H., & Jones, K. M. (1967). The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *Vet Rec*, *80*(1), 2-9.
- Peters, P. J., Mironov, A., Jr., Peretz, D., van Donselaar, E., Leclerc, E., Erpel, S., . . . 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
- Petersen, A., Larsen, K. E., Behr, G. G., Romero, N., Przedborski, S., Brundin, P., & Sulzer, D. (2001). Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration. *Hum Mol Genet*, *10*(12), 1243-1254.
- Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P. A., . . . Wyss-Coray, T. (2008). The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest*, *118*(6), 2190-2199. doi: 10.1172/JCI33585
- Pivtoraiko, V. N., Harrington, A. J., Mader, B. J., Luker, A. M., Caldwell, G. A., Caldwell, K. A., . . . Shacka, J. J. (2010). Low-dose bafilomycin attenuates neuronal cell death associated with autophagy-lysosome pathway dysfunction. *J Neurochem*, *114*(4), 1193-1204. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06838.x
- Platini, F., Perez-Tomas, R., Ambrosio, S., & Tessitore, L. (2010). Understanding autophagy in cell death control. *Curr Pharm Des*, *16*(1), 101-113.
- Polager, S., Ofir, M., & Ginsberg, D. (2008). E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene*, *27*(35), 4860-4864. doi: 10.1038/onc.2008.117
- Polager, S., & Ginsberg, D. (2009). p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer*, *9*(10), 738-748. doi: 10.1038/nrc2718
- Powers, E. T., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W., & Balch, W. E. (2009). Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem*, *78*, 959-991. doi: 10.1146/annurev.biochem.052308.114844
- Priola, S. A., Raines, A., & Caughey, W. S. (2000). Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science*, *287*(5457), 1503-1506.
- Properzi, F., Ferroni, E., Poggi, A., & Vinci, R. (2015). The regulation of exosome function in the CNS: implications for neurodegeneration. *Swiss Med Wkly*, *145*, w14204. doi: 10.4414/smw.2015.14204
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, *216*(4542), 136-144.
- Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirinda, C., . . . et al. (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, *63*(4), 673-686.
- Prusiner, S. B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science*, *252*(5012), 1515-1522.

- 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.
- Qin, Z. H., Wang, Y., Kegel, K. B., Kazantsev, A., Apostol, B. L., Thompson, L. M., . . . DiFiglia, M. (2003). Autophagy regulates the processing of amino terminal huntingtin fragments. *Hum Mol Genet*, 12(24), 3231-3244. doi: 10.1093/hmg/ddg346
- Rane, N. S., Kang, S. W., Chakrabarti, O., Feigenbaum, L., & Hegde, R. S. (2008). Reduced translocation of nascent prion protein during ER stress contributes to neurodegeneration. *Dev Cell*, 15(3), 359-370. doi: 10.1016/j.devcel.2008.06.015
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 200(4), 373-383. doi: 10.1083/jcb.201211138
- Ravikumar, B., Duden, R., & Rubinsztein, D. C. (2002). Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet*, 11(9), 1107-1117.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., . . . Rubinsztein, D. C. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet*, 36(6), 585-595. doi: 10.1038/ng1362
- Ravikumar, B., Acevedo-Arozena, A., Imarisio, S., Berger, Z., Vacher, C., O'Kane, C. J., . . . Rubinsztein, D. C. (2005). Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat Genet*, 37(7), 771-776. doi: 10.1038/ng1591
- 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
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J. E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z. W., . . . Rubinsztein, D. C. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 90(4), 1383-1435. doi: 10.1152/physrev.00030.2009
- Reggiori, F., & Klionsky, D. J. (2002). Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell*, 1(1), 11-21.
- Reggiori, F., Shintani, T., Nair, U., & Klionsky, D. J. (2005). Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy*, 1(2), 101-109.
- Reggiori, F., & Klionsky, D. J. (2013). Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation. *Genetics*, 194(2), 341-361. doi: 10.1534/genetics.112.149013
- Robbins, P. D., & Morelli, A. E. (2014). Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol*, 14(3), 195-208. doi: 10.1038/nri3622
- Rosenkranz, R., Borodina, T., Lehrach, H., & Himmelbauer, H. (2008). Characterizing the mouse ES cell transcriptome with Illumina sequencing. *Genomics*, 92(4), 187-194. doi: 10.1016/j.ygeno.2008.05.011

- Rossi, D., Cozzio, A., Flechsig, E., Klein, M. A., Rulicke, T., Aguzzi, A., & Weissmann, C. (2001). Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. *EMBO J*, *20*(4), 694-702. doi: 10.1093/emboj/20.4.694
- 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
- Rouvinski, A., Karniely, S., Kounin, M., Moussa, S., Goldberg, M. D., Warburg, G., . . . Taraboulos, A. (2014). Live imaging of prions reveals nascent PrP^{Sc} in cell-surface, raft-associated amyloid strings and webs. *J Cell Biol*, *204*(3), 423-441. doi: 10.1083/jcb.201308028
- Rubinsztein, D. C. (2002). Lessons from animal models of Huntington's disease. *Trends Genet*, *18*(4), 202-209.
- Rubinsztein, D. C., DiFiglia, M., Heintz, N., Nixon, R. A., Qin, Z. H., Ravikumar, B., . . . Tolkovsky, A. (2005). Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy*, *1*(1), 11-22.
- Rubinsztein, D. C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, *443*(7113), 780-786. doi: 10.1038/nature05291
- Rubinsztein, D. C., Gestwicki, J. E., Murphy, L. O., & Klionsky, D. J. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov*, *6*(4), 304-312. doi: 10.1038/nrd2272
- Rubinsztein, D. C., Marino, G., & Kroemer, G. (2011). Autophagy and aging. *Cell*, *146*(5), 682-695. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.030
- Rubinsztein, D. C., Shpilka, T., & Elazar, Z. (2012). Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol*, *22*(1), R29-34. doi: 10.1016/j.cub.2011.11.034
- 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.
- Saa, P., Castilla, J., & Soto, C. (2006). Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification. *J Biol Chem*, *281*(46), 35245-35252. doi: 10.1074/jbc.M603964200
- Saa, P., Yakovleva, O., de Castro, J., Vasilyeva, I., De Paoli, S. H., Simak, J., & Cervenakova, L. (2014). First demonstration of transmissible spongiform encephalopathy-associated prion protein (PrPTSE) in extracellular vesicles from plasma of mice infected with mouse-adapted variant Creutzfeldt-Jakob disease by in vitro amplification. *J Biol Chem*, *289*(42), 29247-29260. doi: 10.1074/jbc.M114.589564
- 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
- Saborio, G. P., Permanne, B., & Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, *411*(6839), 810-813. doi: 10.1038/35081095
- Saftig, P., & Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*(9), 623-635. doi: 10.1038/nrm2745
- Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C. C., Cannizzo, E. S., Scharf, B., Follenzi, A., . . . Santambrogio, L. (2011). Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell*, *20*(1), 131-139. doi: 10.1016/j.devcel.2010.12.003
- Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., . . . Noda, T. (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature*, *380*(6574), 528-531. doi: 10.1038/380528a0
- Salvador, N., Aguado, C., Horst, M., & Knecht, E. (2000). Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J Biol Chem*, *275*(35), 27447-27456. doi: 10.1074/jbc.M001394200
- Sanchez-Wandelmer, J., & Reggiori, F. (2013). Amphisomes: out of the autophagosome shadow? *EMBO J*, *32*(24), 3116-3118. doi: 10.1038/emboj.2013.246
- Sarkar, S., Floto, R. A., Berger, Z., Imarisio, S., Cordenier, A., Pasco, M., . . . Rubinsztein, D. C. (2005). Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol*, *170*(7), 1101-1111. doi: 10.1083/jcb.200504035
- 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
- Sarkar, S., Krishna, G., Imarisio, S., Saiki, S., O'Kane, C. J., & Rubinsztein, D. C. (2008). A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. *Hum Mol Genet*, *17*(2), 170-178. doi: 10.1093/hmg/ddm294
- Satpute-Krishnan, P., Ajinkya, M., Bhat, S., Itakura, E., Hegde, R. S., & Lippincott-Schwartz, J. (2014). ER stress-induced clearance of misfolded GPI-anchored proteins via the secretory pathway. *Cell*, *158*(3), 522-533. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.026
- Scotter, E. L., Vance, C., Nishimura, A. L., Lee, Y. B., Chen, H. J., Urwin, H., . . . Shaw, C. E. (2014). Differential roles of the ubiquitin proteasome system and autophagy in the clearance of soluble and aggregated TDP-43 species. *J Cell Sci*, *127*(Pt 6), 1263-1278. doi: 10.1242/jcs.140087

- Schatzl, H. M., Da Costa, M., Taylor, L., Cohen, F. E., & Prusiner, S. B. (1995). Prion protein gene variation among primates. *J Mol Biol*, *245*(4), 362-374.
- Schatzl, H. M., Laszlo, L., Holtzman, D. M., Tatzelt, J., DeArmond, S. J., Weiner, R. I., . . . Prusiner, S. B. (1997). A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J Virol*, *71*(11), 8821-8831.
- 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
- Schweichel, J. U., & Merker, H. J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, *7*(3), 253-266. doi: 10.1002/tera.1420070306
- Seibenhener, M. L., Babu, J. R., Geetha, T., Wong, H. C., Krishna, N. R., & Wooten, M. W. (2004). Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol Cell Biol*, *24*(18), 8055-8068. doi: 10.1128/MCB.24.18.8055-8068.2004
- Seo, H., Sonntag, K. C., & Isacson, O. (2004). Generalized brain and skin proteasome inhibition in Huntington's disease. *Ann Neurol*, *56*(3), 319-328. doi: 10.1002/ana.20207
- 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., Bolea, R., Lyahyai, J., Filali, H., Varona, L., Marcos-Carcavilla, A., . . . Martin-Burriel, I. (2011). Changes in HSP gene and protein expression in natural scrapie with brain damage. *Vet Res*, *42*, 13. doi: 10.1186/1297-9716-42-13
- Shacka, J. J., Klocke, B. J., Young, C., Shibata, M., Olney, J. W., Uchiyama, Y., . . . Roth, K. A. (2007). Cathepsin D deficiency induces persistent neurodegeneration in the absence of Bax-dependent apoptosis. *J Neurosci*, *27*(8), 2081-2090. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5577-06.2007
- Shah, S. Z. A., Zhao, D., Hussain, T., Sabir, N., & Yang, L. (2018). Regulation of MicroRNAs-Mediated Autophagic Flux: A New Regulatory Avenue for Neurodegenerative Diseases With Focus on Prion Diseases. *Front Aging Neurosci*, *10*, 139. doi: 10.3389/fnagi.2018.00139
- Shaw, J., Yurkova, N., Zhang, T., Gang, H., Aguilar, F., Weidman, D., . . . Kirshenbaum, L. A. (2008). Antagonism of E2F-1 regulated Bnip3 transcription by NF-kappaB is essential for basal cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(52), 20734-20739. doi: 10.1073/pnas.0807735105
- Shen, W., & Ganetzky, B. (2009). Autophagy promotes synapse development in *Drosophila*. *J Cell Biol*, *187*(1), 71-79. doi: 10.1083/jcb.200907109

- Shibata, M., Lu, T., Furuya, T., Degterev, A., Mizushima, N., Yoshimori, T., . . . Yuan, J. (2006). Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. *J Biol Chem*, 281(20), 14474-14485. doi: 10.1074/jbc.M600364200
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B., & Tsujimoto, Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol*, 6(12), 1221-1228. doi: 10.1038/ncb1192
- Shimizu, S., Konishi, A., Nishida, Y., Mizuta, T., Nishina, H., Yamamoto, A., & Tsujimoto, Y. (2010). Involvement of JNK in the regulation of autophagic cell death. *Oncogene*, 29(14), 2070-2082. doi: 10.1038/onc.2009.487
- 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
- Shin, J. Y., Park, H. J., Kim, H. N., Oh, S. H., Bae, J. S., Ha, H. J., & Lee, P. H. (2014). Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase beta-amyloid clearance in Alzheimer disease models. *Autophagy*, 10(1), 32-44. doi: 10.4161/auto.26508
- Shyu, W. C., Kao, M. C., Chou, W. Y., Hsu, Y. D., & Soong, B. W. (2000). Creutzfeldt-Jakob disease: heat shock protein 70 mRNA levels in mononuclear blood cells and clinical study. *J Neurol*, 247(12), 929-934.
- Sikorska, B., Liberski, P. P., Giraud, P., Kopp, N., & Brown, P. (2004). Autophagy is a part of ultrastructural synaptic pathology in Creutzfeldt-Jakob disease: a brain biopsy study. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(12), 2563-2573. doi: 10.1016/j.biocel.2004.04.014
- 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
- Simmons, M. M., Konold, T., Thurston, L., Bellworthy, S. J., Chaplin, M. J., & Moore, S. J. (2010). The natural atypical scrapie phenotype is preserved on experimental transmission and sub-passage in PRNP homologous sheep. *BMC Vet Res*, 6, 14. doi: 10.1186/1746-6148-6-14
- Siso, S., Jeffrey, M., Steele, P., McGovern, G., Martin, S., Finlayson, J., . . . Gonzalez, L. (2008). Occurrence and cellular localization of PrPd in kidneys of scrapie-affected sheep in the absence of inflammation. *J Pathol*, 215(2), 126-134. doi: 10.1002/path.2336
- 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
- Sitia, R., & Braakman, I. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature*, 426(6968), 891-894. doi: 10.1038/nature02262

- Somerville, R. A., Chong, A., Mulqueen, O. U., Birkett, C. R., Wood, S. C., & Hope, J. (1997). Biochemical typing of scrapie strains. *Nature*, *386*(6625), 564. doi: 10.1038/386564a0
- Son, J. H., Shim, J. H., Kim, K. H., Ha, J. Y., & Han, J. Y. (2012). Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med*, *44*(2), 89-98. doi: 10.3858/emm.2012.44.2.031
- 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.
- 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., Estrada, L., & Castilla, J. (2006). Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates. *Trends Biochem Sci*, *31*(3), 150-155. doi: 10.1016/j.tibs.2006.01.002
- Spencer, B., Potkar, R., Trejo, M., Rockenstein, E., Patrick, C., Gindi, R., . . . Masliah, E. (2009). Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in alpha-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *J Neurosci*, *29*(43), 13578-13588. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4390-09.2009
- Spilman, P., Podlitskaya, N., Hart, M. J., Debnath, J., Gorostiza, O., Bredesen, D., . . . Galvan, V. (2010). Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*, *5*(4), e9979. doi: 10.1371/journal.pone.0009979
- Spiropoulos, J., Casalone, C., Caramelli, M., & Simmons, M. M. (2007). Immunohistochemistry for PrPSc 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., . . . 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
- Stack, J. H., Herman, P. K., Schu, P. V., & Emr, S. D. (1993). A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *EMBO J*, *12*(5), 2195-2204.
- Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K., & Prusiner, S. B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*, *51*(2), 229-240.
- Steele, A. D., Emsley, J. G., Ozdinler, P. H., Lindquist, S., & Macklis, J. D. (2006). Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(9), 3416-3421. doi: 10.1073/pnas.0511290103
- Steele, A. D., Hetz, C., Yi, C. H., Jackson, W. S., Borkowski, A. W., Yuan, J., . . . Lindquist, S. (2007). Prion pathogenesis is independent of caspase-12. *Prion*, *1*(4), 243-247.

- Steele, A. D., Lindquist, S., & Aguzzi, A. (2007). The prion protein knockout mouse: a phenotype under challenge. *Prion*, *1*(2), 83-93.
- Stephan, J. S., Yeh, Y. Y., Ramachandran, V., Deminoff, S. J., & Herman, P. K. (2009). The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(40), 17049-17054. doi: 10.1073/pnas.0903316106
- Stephenson, D. A., Chiotti, K., Ebeling, C., Groth, D., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., & Carlson, G. A. (2000). Quantitative trait loci affecting prion incubation time in mice. *Genomics*, *69*(1), 47-53. doi: 10.1006/geno.2000.6320
- Sunyach, C., Jen, A., Deng, J., Fitzgerald, K. T., Frobert, Y., Grassi, J., . . . Morris, R. (2003). The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J*, *22*(14), 3591-3601. doi: 10.1093/emboj/cdg344
- Suzuki, H., Tabata, K., Morita, E., Kawasaki, M., Kato, R., Dobson, R. C., . . . 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
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J*, *20*(21), 5971-5981. doi: 10.1093/emboj/20.21.5971
- Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2007). Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells*, *12*(2), 209-218. doi: 10.1111/j.1365-2443.2007.01050.x
- Suzuki, K., & Ohsumi, Y. (2007). Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, *581*(11), 2156-2161. doi: 10.1016/j.febslet.2007.01.096
- Tanaka, M., Machida, Y., Niu, S., Ikeda, T., Jana, N. R., Doi, H., . . . Nukina, N. (2004). Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat Med*, *10*(2), 148-154. doi: 10.1038/nm985
- Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L., & Prusiner, S. B. (1995). Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol*, *129*(1), 121-132.
- Tashiro, Y., Urushitani, M., Inoue, H., Koike, M., Uchiyama, Y., Komatsu, M., . . . Takahashi, R. (2012). Motor neuron-specific disruption of proteasomes, but not autophagy, replicates amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*, *287*(51), 42984-42994. doi: 10.1074/jbc.M112.417600
- Taupenot, L., Ciesielski-Treska, J., Ulrich, G., Chasserot-Golaz, S., Aunis, D., & Bader, M. F. (1996). Chromogranin A triggers a phenotypic transformation and the generation of nitric oxide in brain microglial cells. *Neuroscience*, *72*(2), 377-389.

- Taylor, J. P., Tanaka, F., Robitschek, J., Sandoval, C. M., Taye, A., Markovic-Plese, S., & Fischbeck, K. H. (2003). Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine-containing protein. *Hum Mol Genet*, *12*(7), 749-757.
- Tellez-Nagel, I., Johnson, A. B., & Terry, R. D. (1974). Studies on brain biopsies of patients with Huntington's chorea. *J Neuropathol Exp Neurol*, *33*(2), 308-332.
- Telling, G. C., Parchi, P., DeArmond, S. J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., . . . 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.
- Terman, A., Gustafsson, B., & Brunk, U. T. (2007). Autophagy, organelles and ageing. *J Pathol*, *211*(2), 134-143. doi: 10.1002/path.2094
- Theil, D., Fatzer, R., Meyer, R., Schobesberger, M., Zurbriggen, A., & Vandeveldel, M. (1999). Nuclear DNA fragmentation and immune reactivity in bovine spongiform encephalopathy. *J Comp Pathol*, *121*(4), 357-367. doi: 10.1053/jcpa.1999.0333
- Thellung, S., Scoti, B., Corsaro, A., Villa, V., Nizzari, M., Gagliani, M. C., . . . 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
- Tilly, G., Chapuis, J., Vilette, D., Laude, H., & Vilotte, J. L. (2003). Efficient and specific down-regulation of prion protein expression by RNAi. *Biochem Biophys Res Commun*, *305*(3), 548-551.
- Torres, M., Castillo, K., Armisen, R., Stutzin, A., Soto, C., & Hetz, C. (2010). Prion protein misfolding affects calcium homeostasis and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress. *PLoS One*, *5*(12), e15658. doi: 10.1371/journal.pone.0015658
- Torres, M., Medinas, D. B., Matamala, J. M., Woehlbier, U., Cornejo, V. H., Solda, T., . . . Hetz, C. (2015). The Protein-disulfide Isomerase ERp57 Regulates the Steady-state Levels of the Prion Protein. *J Biol Chem*, *290*(39), 23631-23645. doi: 10.1074/jbc.M114.635565
- Tsukada, M., & Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, *333*(1-2), 169-174.
- Ulamiek-Koziol, M., Furmaga-Jablonska, W., Januszewski, S., Brzozowska, J., Scislewska, M., Jablonski, M., & Pluta, R. (2013). Neuronal autophagy: self-eating or self-cannibalism in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*, *38*(9), 1769-1773. doi: 10.1007/s11064-013-1082-4
- Unterberger, U., Hoftberger, R., Gelpi, E., Flicker, H., Budka, H., & Voigtlander, T. (2006). Endoplasmic reticulum stress features are prominent in Alzheimer disease but not in prion diseases in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol*, *65*(4), 348-357. doi: 10.1097/01.jnen.0000218445.30535.6f

- van Keulen, L. J., Schreuder, B. E., Meloen, R. H., Mooij-Harkes, G., Vromans, M. E., & Langeveld, J. P. (1996). Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J Clin Microbiol*, *34*(5), 1228-1231.
- van Keulen, L. J., Schreuder, B. E., Vromans, M. E., Langeveld, J. P., & Smits, M. A. (2000). Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch Virol Suppl*(16), 57-71.
- Vanni, S. (2017). Omics of Prion Diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci*, *150*, 409-431. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.05.004
- Vargas, F., Lujan, L., Bolea, R., Monleon, E., Martin-Burriel, I., Fernandez, A., . . . Badiola, J. J. (2006). Detection and clinical evolution of scrapie in sheep by 3rd eyelid biopsy. *J Vet Intern Med*, *20*(1), 187-193.
- Vascellari, M., Nonno, R., Mutinelli, F., Bigolaro, M., Di Bari, M. A., Melchiotti, E., . . . Agrimi, U. (2007). PrPSc in salivary glands of scrapie-affected sheep. *J Virol*, *81*(9), 4872-4876. doi: 10.1128/JVI.02148-06
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., . . . Citron, M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, *286*(5440), 735-741.
- Vazquez-Fernandez, E., Vos, M. R., Afanasyev, P., Cebey, L., Sevillano, A. M., Vidal, E., . . . 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
- Veith, N. M., Plattner, H., Stuermer, C. A., Schulz-Schaeffer, W. J., & Burkle, A. (2009). Immunolocalisation of PrPSc in scrapie-infected N2a mouse neuroblastoma cells by light and electron microscopy. *Eur J Cell Biol*, *88*(1), 45-63. doi: 10.1016/j.ejcb.2008.08.001
- Vellai, T., Bicsak, B., Toth, M. L., Takacs-Vellai, K., & Kovacs, A. L. (2008). Regulation of cell growth by autophagy. *Autophagy*, *4*(4), 507-509.
- Ventrucci, A., & Cuervo, A. M. (2007). Autophagy and neurodegeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep*, *7*(5), 443-451.
- Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S. J., Smart, E. J., . . . 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.
- Vilette, D., Laulagnier, K., Huor, A., Alais, S., Simoes, S., Maryse, R., . . . Leblanc, P. (2015). Efficient inhibition of infectious prions multiplication and release by targeting the exosomal pathway. *Cell Mol Life Sci*, *72*(22), 4409-4427. doi: 10.1007/s00018-015-1945-8
- Villarroya-Beltri, C., Gutierrez-Vazquez, C., Sanchez-Cabo, F., Perez-Hernandez, D., Vazquez, J., Martin-Cofreces, N., . . . Sanchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1

- controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*, 4, 2980. doi: 10.1038/ncomms3980
- Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Gutierrez-Vazquez, C., Sanchez-Madrid, F., & Mittelbrunn, M. (2014). Sorting it out: regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol*, 28, 3-13. doi: 10.1016/j.semcancer.2014.04.009
- Vogiatzi, T., Xilouri, M., Vekrellis, K., & Stefanis, L. (2008). Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem*, 283(35), 23542-23556. doi: 10.1074/jbc.M801992200
- Walter, P., & Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334(6059), 1081-1086. doi: 10.1126/science.1209038
- Wan, H. I., DiAntonio, A., Fetter, R. D., Bergstrom, K., Strauss, R., & Goodman, C. S. (2000). Highwire regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron*, 26(2), 313-329.
- Wang, S. B., Shi, Q., Xu, Y., Xie, W. L., Zhang, J., Tian, 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), e38221. doi: 10.1371/journal.pone.0038221
- Wang, X., Su, H., & Ranek, M. J. (2008). Protein quality control and degradation in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 45(1), 11-27. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.03.025
- Webb, J. L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J. N., & Rubinsztein, D. C. (2003). Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem*, 278(27), 25009-25013. doi: 10.1074/jbc.M300227200
- Wells, G. A., Scott, A. C., Johnson, C. T., Gunning, R. F., Hancock, R. D., Jeffrey, M., . . . Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec*, 121(18), 419-420.
- Wells, G. A., & McGill, I. S. (1992). Recently described scrapie-like encephalopathies of animals: case definitions. *Res Vet Sci*, 53(1), 1-10.
- Westaway, D., Goodman, P. A., Mirinda, 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.
- Westaway, D., Zuliani, V., Cooper, C. M., Da Costa, M., Neuman, S., Jenny, A. L., . . . Prusiner, S. B. (1994). Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie. *Genes Dev*, 8(8), 959-969.
- Wilesmith, J. W., Wells, G. A., Cranwell, M. P., & Ryan, J. B. (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec*, 123(25), 638-644.
- Wilesmith, J. W., Ryan, J. B., & Atkinson, M. J. (1991). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec*, 128(9), 199-203.

- Wilhelm, B. T., Marguerat, S., Watt, S., Schubert, F., Wood, V., Goodhead, I., . . . Bahler, J. (2008). Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature*, *453*(7199), 1239-1243. doi: 10.1038/nature07002
- Wilson, D. R., Anderson, R. D., & Smith, W. (1950). Studies in scrapie. *J Comp Pathol*, *60*(4), 267-282.
- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., . . . Smith, P. G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, *347*(9006), 921-925.
- Williams, A., Lucassen, P. J., Ritchie, D., & Bruce, M. (1997). PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Exp Neurol*, *144*(2), 433-438. doi: 10.1006/exnr.1997.6424
- Williams, A., Jahreiss, L., Sarkar, S., Saiki, S., Menzies, F. M., Ravikumar, B., & Rubinsztein, D. C. (2006). Aggregate-prone proteins are cleared from the cytosol by autophagy: therapeutic implications. *Curr Top Dev Biol*, *76*, 89-101. doi: 10.1016/S0070-2153(06)76003-3
- Williams, E. S., & Young, S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis*, *16*(1), 89-98.
- Willis, M., Leitner, I., Jellinger, K. A., & Marksteiner, J. (2011). Chromogranin peptides in brain diseases. *J Neural Transm (Vienna)*, *118*(5), 727-735. doi: 10.1007/s00702-011-0648-z
- Winslow, A. R., Chen, C. W., Corrochano, S., Acevedo-Arozena, A., Gordon, D. E., Peden, A. A., . . . Rubinsztein, D. C. (2010). alpha-Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J Cell Biol*, *190*(6), 1023-1037. doi: 10.1083/jcb.201003122
- Wong, E., & Cuervo, A. M. (2010). Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*, *13*(7), 805-811. doi: 10.1038/nn.2575
- Wu, J., Dang, Y., Su, W., Liu, C., Ma, H., Shan, Y., . . . Yu, L. (2006). Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B--two novel markers of autophagosome. *Biochem Biophys Res Commun*, *339*(1), 437-442. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.10.211
- Xiang, W., Windl, O., Westner, I. M., Neumann, M., Zerr, I., Lederer, R. M., & Kretschmar, H. A. (2005). Cerebral gene expression profiles in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol*, *58*(2), 242-257. doi: 10.1002/ana.20551
- Xie, Z., & Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*, *9*(10), 1102-1109. doi: 10.1038/ncb1007-1102
- Xilouri, M., Vogiatzi, T., Vekrellis, K., Park, D., & Stefanis, L. (2009). Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PLoS One*, *4*(5), e5515. doi: 10.1371/journal.pone.0005515

- Xu, Y., Tian, C., Wang, S. B., Xie, W. L., Guo, Y., Zhang, J., . . . Dong, X. P. (2012). Activation of the macroautophagic system in scrapie-infected experimental animals and human genetic prion diseases. *Autophagy*, 8(11), 1604-1620. doi: 10.4161/aut.21482
- Xu, Y., Tian, C., Sun, J., Zhang, J., Ren, K., Fan, X. Y., . . . Dong, X. P. (2016). FBXW7-Induced MTOR Degradation Forces Autophagy to Counteract Persistent Prion Infection. *Mol Neurobiol*, 53(1), 706-719. doi: 10.1007/s12035-014-9028-7
- Yamasaki, T., Baron, G. S., Suzuki, A., Hasebe, R., & Horiuchi, M. (2014). Characterization of intracellular dynamics of inoculated PrP-res and newly generated PrP(Sc) during early stage prion infection in Neuro2a cells. *Virology*, 450-451, 324-335. doi: 10.1016/j.virol.2013.11.007
- Yanez-Mo, M., Siljander, P. R., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borrás, F. E., Buzas, E. I., . . . De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*, 4, 27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066
- Yang, Z., Huang, J., Geng, J., Nair, U., & Klionsky, D. J. (2006). Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol Biol Cell*, 17(12), 5094-5104. doi: 10.1091/mbc.e06-06-0479
- Yao, G. (2014). Modelling mammalian cellular quiescence. *Interface Focus*, 4(3), 20130074. doi: 10.1098/rsfs.2013.0074
- Yao, H., Zhao, D., Khan, S. H., & Yang, L. (2013). Role of autophagy in prion protein-induced neurodegenerative diseases. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 45(6), 494-502. doi: 10.1093/abbs/gmt022
- Yasuhara, O., Kawamata, T., Aimi, Y., McGeer, E. G., & McGeer, P. L. (1994). Expression of chromogranin A in lesions in the central nervous system from patients with neurological diseases. *Neurosci Lett*, 170(1), 13-16.
- Yedidia, Y., Horonchik, L., Tzaban, S., Yanai, A., & Taraboulos, A. (2001). Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. *EMBO J*, 20(19), 5383-5391. doi: 10.1093/emboj/20.19.5383
- Yim, Y. I., Park, B. C., Yadavalli, R., Zhao, X., Eisenberg, E., & Greene, L. E. (2015). The multivesicular body is the major internal site of prion conversion. *J Cell Sci*, 128(7), 1434-1443. doi: 10.1242/jcs.165472
- Yin, Z., Pascual, C., & Klionsky, D. J. (2016). Autophagy: machinery and regulation. *Microb Cell*, 3(12), 588-596. doi: 10.15698/mic2016.12.546
- Yoo, B. C., Krapfenbauer, K., Cairns, N., Belay, G., Bajo, M., & Lubec, G. (2002). Overexpressed protein disulfide isomerase in brains of patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett*, 334(3), 196-200.
- Yorimitsu, T., & Klionsky, D. J. (2007). Eating the endoplasmic reticulum: quality control by autophagy. *Trends Cell Biol*, 17(6), 279-285. doi: 10.1016/j.tcb.2007.04.005

- Yoshimori, T. (2004). Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 313(2), 453-458.
- Youle, R. J., & Narendra, D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(1), 9-14. doi: 10.1038/nrm3028
- Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., . . . Lenardo, M. J. (2004). Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*, 304(5676), 1500-1502. doi: 10.1126/science.1096645
- Yu, L., Wan, F., Dutta, S., Welsh, S., Liu, Z., Freundt, E., . . . Lenardo, M. (2006). Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(13), 4952-4957. doi: 10.1073/pnas.0511288103
- Yu, W. H., Kumar, A., Peterhoff, C., Shapiro Kulnane, L., Uchiyama, Y., Lamb, B. T., . . . Nixon, R. A. (2004). Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for beta-amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(12), 2531-2540. doi: 10.1016/j.biocel.2004.05.010
- Yu, W. H., Cuervo, A. M., Kumar, A., Peterhoff, C. M., Schmidt, S. D., Lee, J. H., . . . Nixon, R. A. (2005). Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol*, 171(1), 87-98. doi: 10.1083/jcb.200505082
- Yuan, J., Lipinski, M., & Degtarev, A. (2003). Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron*, 40(2), 401-413.
- Yue, Z. (2007). Regulation of neuronal autophagy in axon: implication of autophagy in axonal function and dysfunction/degeneration. *Autophagy*, 3(2), 139-141.
- Yun, S. W., Ertmer, A., Flechsig, E., Gilch, S., Riederer, P., Gerlach, 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
- Zanusso, G., Petersen, R. B., Jin, T., Jing, Y., Kanoush, R., Ferrari, S., . . . Singh, N. (1999). Proteasomal degradation and N-terminal protease resistance of the codon 145 mutant prion protein. *J Biol Chem*, 274(33), 23396-23404.
- Zatloukal, K., Stumptner, C., Fuchsichler, A., Heid, H., Schnoelzer, M., Kenner, L., . . . Denk, H. (2002). p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol*, 160(1), 255-263. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64369-6
- Zeng, X., Overmeyer, J. H., & Maltese, W. A. (2006). Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *J Cell Sci*, 119(Pt 2), 259-270. doi: 10.1242/jcs.02735

- Zhang, N., Yang, G. Q., Shao, X. M., & Wei, L. (2016). GAS5 modulated autophagy is a mechanism modulating cisplatin sensitivity in NSCLC cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20(11), 2271-2277.
- Zhang, Y., Liu, C., Wang, J., Li, Q., Ping, H., Gao, S., & Wang, P. (2016). MiR-299-5p regulates apoptosis through autophagy in neurons and ameliorates cognitive capacity in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *Sci Rep*, 6, 24566. doi: 10.1038/srep24566
- Zheng, Q., Li, J., & Wang, X. (2009). Interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in proteinopathies. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 1(2), 127-142.
- Zhu, H., Tannous, P., Johnstone, J. L., Kong, Y., Shelton, J. M., Richardson, J. A., . . . Hill, J. A. (2007). Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. *J Clin Invest*, 117(7), 1782-1793. doi: 10.1172/JCI27523