

Neuropatología y priones

Dres Ángel Alonso, Krikor Mouchián, Julio F. Albónico

División Alergia e Inmunología - Hospital de Clínicas- Universidad de Buenos Aires - Sociedad Científica Argentina - Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Resumen

Se exponen las características principales de los priones y su potencialidad patológica en el ser humano, los animales y las plantas. Se discute su mecanismo de acción, su prevención y su eventual neutralización.

Palabras claves. Priones; PrPn; PrPsc; neurodegeneración; Alzheimer.

Neuropathology and prions

Summary

The medical and biological importance of prion proteins are exposed; their prevention and critical neutralization are discussed.

Keywords. Prion proteins; neurological diseases; Alzheimer.

Introducción

La primera evidencia escrita de lo que se conoce como enfermedades causadas por los priones la realizó McGowan, en 1922, con su descripción de “la tembladera” (del francés *la tremblante*) en ovejas, luego llamada “scrapie” o tembladera ovina, y que se describió como una enfermedad infecciosa, transmisible y de larga incubación (Cuille y Chelle, 1936). Se adjudicaron a Creutzfeldt y a Jakob las primeras descripciones de esta enfermedad neurodegenerativa en los humanos y por eso denominada luego enfermedad de Creutzfeldt-Jakob o CJD (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921a, 1921b y 1921c). La enfermedad evidenciaba una degeneración extensa, pero localizada de la sustancia gris, con alteraciones neuronales difusas, astrogliosis, degeneración vacuolar en el córtex cerebral, con proliferación astrocítica y degeneración neuronal. En 1957, se describió una enfermedad encefálica vinculada con el canibalismo ritual realizado en Papúa, Nueva Guinea, a la que bautizaron como “kuru” (escalofrío), sin que tuviera causa ni terapéutica eficaz (Gajdusek y Zigas, 1957). La relación existente entre las enfermedades de kuru, CJD y scrapie y su naturaleza “infecciosa” no tardarían en ser demostradas. Mientras que, en 1959, el veterinario americano Hadlow puso de manifiesto las similitudes clínicas y neuropatológicas existentes entre el kuru y el scrapie, algún tiempo después, Gajdusek comprobó que el kuru presentaba aspectos comunes con la CJD. La incógnita que resolver en los años sucesivos era la naturaleza del agente responsable de estas enfermedades, invisible a los métodos

Correspondencia. Ángel Alonso
Correo electrónico: alehclin@fmed.uba.ar

de detección. Durante años se habló de las “infecciones lentas”, concepto propuesto en 1953 por Sigurdsson y colaboradores, a partir de su experiencia en el estudio de dos enfermedades ovinas: maedi y scrapie (Sigurdsson *et al.*, 1953). Sin embargo, el hecho de que nunca se aisló ningún virus, y de la ausencia de una respuesta inmune frente al extraño agente, cambió el concepto con respecto a estas enfermedades. Los experimentos realizados por Alper y colaboradores contribuyeron decisivamente en dicho cambio. Este grupo probó, a través de técnicas radiológicas, que la infectividad del scrapie resultaba resistente a la inactivación mediante radiación ultravioleta e ionizante (Alper *et al.*, 1966 y 1967). Por su parte Griffith, en 1967, postuló que el agente transmisible podía ser una proteína, lo cual fue tomado con escepticismo por parte de la comunidad científica del momento (Griffith, 1967). En 1982, Prusiner resucitó la idea de Griffith y postuló la hipótesis de “solo proteína”, acuñando por primera vez el término “prión” (del inglés *proteinaceous infectious particle*) para definir a las partículas proteicas “infecciosas” resistentes a la inactivación mediante métodos que alteran ácidos nucleicos. Esta hipótesis –por la que fue distinguido con el Premio Nobel de Medicina en 1997– proponía que el material “infeccioso” estaba compuesto exclusivamente por una proteína capaz de autorreplicarse en ausencia de ácido nucleico (Prusiner, 1982; Prusiner *et al.*, 1998). El aislamiento a partir de material “infeccioso” de una proteína resistente a proteasas demostró por primera vez que el agente “infeccioso” se correspondía con una isoforma patógena (PrP^{Sc}) de una proteína celular apatógena (PrP^C), bautizada con el nombre de prión (Bolton *et al.*, 1982). Actualmente, los priones constituyen las únicas partículas biológicas que contradicen el gran dogma central de la biología enunciado por J. Monod en 1970: **“La secuencia de aminoácidos o estructura primaria de la proteína determina de manera unívoca el plegamiento de la proteína para adoptar su estructura terciaria. Es decir, entre las miles de configuraciones tridimensionales en principio posibles, solo se adopta una”**.

A pesar de que la tembladera ovina causada por priones fue descubierta hace más de doscientos años, y de que se describió en la literatura hace ya un siglo, no fue sino hasta 1985 que hubo una gran alarma en torno a estas

enfermedades. La causa fue la detección en Gran Bretaña de una enfermedad en el ganado bovino, cuya manifestación clínica consistía en una afección nerviosa acompañada de un comportamiento agresivo y ansioso en los animales. Fue denominada encefalopatía espongiforme bovina (EEB) o “mal de las vacas locas”. El análisis anatomopatológico del encéfalo mostró un patrón de lesiones muy semejante al descrito en la tembladera ovina. Desde entonces, se han diagnosticado más de 200.000 casos en el mundo (Anderson *et al.*, 1996). La situación provocó una gran alarma social, no solo por las pérdidas económicas sufridas por los ganaderos, sino también por la aparición en los seres humanos de una variante de encefalopatía espongiforme, conocida como la nueva variante de Creutzfeldt-Jakob (nvCJD), vinculada al consumo de carnes procedentes de ganado vacuno afectado por EEB (Bruce *et al.*, 1997; Prusiner, 1997). Desde entonces, los gobiernos de los países afectados han destinado grandes sumas de dinero a la investigación y el desarrollo de métodos de diagnóstico de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs).

Patogenia

La principal característica de este grupo de enfermedades es la acumulación en el cerebro de una isoforma patógena del prión (**PrP^{Sc}**), proteína que, en su estructura normal (**PrP^C** o proteína del prión celular), se encuentra expresada en la membrana celular de forma constitutiva (Prusiner, 1991). Aunque las dos isoformas son idénticas en su secuencia primaria, la **PrP^{Sc}** puede distinguirse de la **PrP^C** por sus diferentes propiedades bioquímicas y biofísicas, como la formación de agregados en presencia de detergentes y la resistencia a la hidrólisis por enzimas proteolíticas (Pan *et al.*, 1993). La aparición y acumulación de la isoforma patógena se debe a un proceso postraduccional sobre la proteína celular, como consecuencia de su probable interacción con **PrP^{Sc}** (Gabizon y Prusiner, 1990). Si bien los mecanismos moleculares de este proceso, llamado *transformación*, no son totalmente conocidos, parecen implicar cambios únicamente en la conformación de la proteína (Borchelt *et al.*, 1990). Así, para la producción de proteína infectiva es necesaria la presencia de la isoforma celular, capaz de ser transformada. El hecho de que los ratones PrPKO (del inglés *knock out*; ratones en los

que el gen codificante para la **PrPn** había sido inactivado) fueran resistentes a la enfermedad tras la inoculación intracraneal con priones infecciosos demostró definitivamente esta teoría (Bueler *et al.*, 1993).

La susceptibilidad a la infección pudo restablecerse simplemente reintegrando en su genoma el gen de la proteína del prión (Fischer *et al.*, 1996).

A pesar del escepticismo inicial, las nuevas evidencias presentadas en los últimos años consolidan la teoría de “la proteína sola” como la más lógica para explicar la patogenia de las EETs. Por un lado, se demostró la capacidad de reproducir la enfermedad mediante la inoculación intracraneal de fibras amiloides sintéticas de prión (Legname *et al.*, 2004). Por el otro, se consiguió amplificar *in vitro* el material infeccioso mediante la técnica de la PMCA (del inglés *cyclic amplification of protein misfolding*), material que es infectivo tras la inoculación experimental en ratones (Soto *et al.*, 2005). Las EETs son un grupo de enfermedades degenerativas del sistema nervioso central (SNC) que afectan tanto a los humanos como a varios animales. Estas exhiben muchas similitudes con otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la enfermedad de Huntington y el párkinson, en las que el agente causal es una proteína del organismo cuyo plegamiento es anómalo, pero difieren de estas en que las EETs son de carácter “infeccioso” y transmisible entre diferentes especies. Si bien resulta necesario realizar estudios para ratificar la naturaleza infecciosa del Alzheimer, recientemente se ha descrito el carácter “infeccioso” del péptido amiloide (Meyer-Luehmann *et al.*, 2006). Las EETs se caracterizan por la ausencia de lesiones macroscópicas, siendo las microscópicas bilaterales, de distribución difusa, no inflamatorias y que afectan exclusivamente al SNC. Así, para diagnosticar una EET se encontrará: degeneración espongiiforme del tejido con la presencia de vacuolas, gliosis, degeneración y muerte neuronal y depósitos del **PrPsc** en el citoplasma neuronal. Las EETs se presentarán como: 1) enfermedades con un origen genético, 2) enfermedades transmitidas por una infección exógena y 3) enfermedades esporádicas.

En los seres humanos, las EETs reciben diversos nombres según los síntomas y los signos clínicos presentes. Así, la enfermedad causada por priones con mayor incidencia en los humanos, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD),

tiene varios orígenes: esporádico, familiar o iatrogénico. Mientras que la esporádica supone el 85% de los casos, la iatrogénica únicamente afecta al 1% del total. Además del CJD, existen otros tipos de EETs, algunas con un origen “infeccioso”, como el kuru y la nueva variante de Creutzfeldt-Jakob (nvCJD), y otras con un origen genético, como el insomnio familiar fatal (IFF) y la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheiker (GSS) (Prusiner, 1997). El 15% de las enfermedades causadas por priones se deben a mutaciones germinales en el gen que codifica para la **PrPn** (CJD familiar, GSS e IFF) (Collinge, 2001; Wadsworth *et al.*, 2003).

Los síntomas de la ECJ incluyen: demencia que empeora rápidamente en el transcurso de unas pocas semanas o meses; visión borrosa; cambios en la marcha; confusión o desorientación, alucinaciones (auditivas o visuales); falta de coordinación; rigidez muscular, fasciculaciones; sensaciones de estar nervioso o sobresaltado; cambios de personalidad; somnolencia; convulsiones o movimientos espasmódicos repentinos, y dificultad para hablar. La ECJ iatrogénica se transmite a través de una transfusión de hemoderivados, un trasplante o instrumentos quirúrgicos contaminados. La vECJ es causada por comer carne infectada. Se cree que la “infección” que causa la enfermedad en las vacas locas es la misma que ocasiona la vECJ en los humanos. La vECJ ocasiona menos del 1% de todos los casos de ECJ y afecta a personas jóvenes. Menos de doscientas personas en todo el mundo han tenido esta enfermedad, y todos los casos se dieron en Inglaterra y Francia. La ECJ estaría relacionada con la enfermedad consuntiva crónica de los venados.

Enfermedades por mutaciones priónicas

Los casos de CJD familiar, GSS e IFF son los tres fenotipos principales de las enfermedades por priones que contienen mutaciones en el gen que codifica para la proteína del prión humano (**PrPn**), localizado en el cromosoma 20 (Prusiner, 2001).

Se describieron cincuenta mutaciones que afectan a este gen, pero el 95% de ellas están asociadas a la inserción de 5 o 6 octapéptidos repetidos, o bien a mutaciones puntuales en los codones 102, 178, 200 o 210 (Capellari *et al.*, 2005). Adicionalmente, la susceptibilidad a la enfermedad y/o respecto del fenotipo de enfermedad se ve afectada por el polimorfismo existente en el codón 129 del **PrPn**, que permite

la presencia de una valina o de una metionina (Collinge *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2001; Mead *et al.*, 2003; Palmer *et al.*, 1991). Así, la mutación D178N (Asp→Gln) con una metionina en posición 129 resulta en insomnio familiar fatal (Goldfarb *et al.*, 1992), mientras que la misma mutación con una valina en posición 129 resulta en un CJD familiar (Goldfarb *et al.*, 1991b).

La patogenicidad de las moléculas del prión mutadas se debe a un plegamiento anormal de la proteína, en este caso como consecuencia de la pérdida de puentes de hidrógeno y puentes disulfuro necesarios para mantener la estructura natural de la proteína del prión "normal" (PrPn) (Riek *et al.*, 1998). En función del lugar en que se produce la mutación, la desestabilización de la PrPn resulta diferente, aunque anómala en todos los casos. Así, la mutación Al 17V (GSS) desestabiliza la conformación de hélice de la proteína del prión "normal" (PrPn) en las posiciones 106 a 126, dando lugar a una proteína anómala y patogénica (Frauenfelder *et al.*, 1991).

Enfermedad de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS)

El primer caso se detectó en 1928 en una familia austríaca cuyos miembros presentaban ataxia cerebelar de progresión lenta acompañada de pérdidas cognitivas paulatinas (Gerstmann, 1928; Gerstmann *et al.*, 1936). Los casos de GSS se caracterizan por una progresión en los signos cerebelares, degeneración espongiiforme de la materia gris y depósitos de placas amiloides.

La mutación afecta al codón 102 de la PrPn y transforma una prolina en una leucina (P102L) (Dohura *et al.*, 1989; Goldgaber *et al.*, 1989; Hsiao *et al.*, 1989), aunque otras mutaciones se dan con frecuencia en determinados grupos étnicos (Yamada *et al.*, 1993). Ocasionalmente, se presenta la mutación que afecta al codón 117 de la PrPn, y transforma una alanina en una valina (Al 17V) (Mastrianni *et al.*, 1995). Existen casos de GSS esporádicos, no asociados con ninguna mutación en el gen de la PrPn, que son menos frecuentes (Liberski *et al.*, 1998).

Insomnio familiar fatal (IFF)

Fue descrito por primera vez en una familia italiana en 1986 (Lugaresi *et al.*, 1986), pero no fue hasta 1992 cuando esta enfermedad se incluyó dentro del grupo de enfermedades causa-

das por priones (Medori *et al.*, 1992). Se caracteriza por una desorganización completa en los patrones del sueño, hiperactividad simpática y anormalidades endocrinas. Presenta una mutación del gen en la posición 178, dando lugar a la sustitución del aminoácido aspártico por una asparagina (D178N). La descripción de esta mutación asociada al IFF despertó un gran escepticismo, dado que esta había sido planteada previamente como propia del CJD familiar (Goldfarb *et al.*, 1991b). La solución a este conflicto no tardó en llegar y, en 1992, Goldfarb describió que ello se debía al polimorfismo del codón 129, que en el IFF se asocia a la mutación D178N, Met 129, mientras que en la CJD va asociado a la mutación D178N con la Val en posición 129 (Goldfarb *et al.*, 1992).

CJD familiar

Los casos de CJD sufren una progresión subaguda de demencia, signos motores y degeneración esponjosa de la sustancia gris cerebral, acompañados de la formación de placas amiloides. Los pacientes con CJD familiar presentan un número variable de inserciones de octapéptidos repetidos en la región N-terminal de la proteína, o bien mutaciones puntuales en esta. La mutación E200K afecta al codón 200 de la PrPn, transforma un glutámico en una lisina, y es la de mayor incidencia (Goldfarb *et al.*, 1991a).

La proteína del prión celular: PrPn

La proteína del prión celular o PrPn es una sialo-glicoproteína anclada en la membrana plasmática por una molécula de glico-fosfatidilinositol (GPI) (Caughey y Raymond, 1991; Stahl *et al.*, 1987) y asociada a microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos insolubles en los detergentes (Kooyman *et al.*, 1998). Está constituida por una cadena polipeptídica de 250 aminoácidos (Prusiner, 1993), y su peso molecular oscila entre 33 y 35 KDa, dependiendo del grado de glicosilación (Harris, 1999a y 1999b). La PrPn está codificada por un gen de copia única localizado en el brazo corto del cromosoma 20 de los humanos, en el cromosoma 2 del ratón y en el cromosoma 13 de la vaca. Su secuencia genética está altamente conservada en los mamíferos; la homología aminoacídica se encuentra entre un 80-90%. El gen se expresa de manera constitutiva en todos los tejidos, siendo su expresión más elevada en el tejido nervio-

so, como el cerebro, el cerebelo, la médula y el hipotálamo (Chesebro *et al.*, 1985). Hasta hoy no se han definido claramente las funciones concretas de la **PrPn**, pero está implicada en el metabolismo del cobre en las neuronas (Brown *et al.*, 1997; Bums *et al.*, 2003; Jobling *et al.*, 2001), en fenómenos de transmisión sináptica (Collinge *et al.*, 1994; Herms *et al.*, 1999) y también se le atribuye una función neuro-protectora (Lasmezas, 2003). La proteína del prión celular está constituida por 253 aminoácidos en los humanos, 254 en los ratones y hámsters, y 256 en las vacas. En la estructura primaria de la **PrPn** (siempre en los humanos) pueden diferenciarse cinco regiones. **Región 1-22**: comprende el péptido señal que dirige a la proteína hacia el retículo endoplásmico rugoso donde será escindida, antes de su transporte a través del aparato de Golgi. **Región 23-91**: donde se encuentran una serie de octapéptidos ricos en glicina y prolina, muy conservados en las diferentes especies, que son capaces de unir cobre y zinc (Lehmann, 2002). Posibles inserciones o deleciones en esta zona se asocian a enfermedades familiares en humanos. **Región 92-135**: es hidrofóbica, altamente conservada, y es crucial en la conversión de **PrPn** a **PrPsc** (Wegner *et al.*, 2002). **Región 136-231**: en las posiciones 181 y 197 en que se encuentran 2 aspárticos, existen dos sitios de N-glicosilación (Endo *et al.*, 1989; Haraguchi *et al.*, 1989) que permiten la incorporación de azúcares, responsables de las tres formas características de esta proteína, como no glicosilada (5%), monoglicosilada (25%) y biglicosilada (70%). Dos cisteínas en las posiciones 179 y 214 permiten la formación de un puente disulfuro intracatenario (Welker *et al.*, 2002). En la posición 231 existe una serina capaz de unirse al grupo glico-fosfatidilinositol (GPI) responsable del anclaje de la proteína a la membrana celular (Stahl *et al.*, 1987). **Región 232-253**: es una región C-terminal hidrofóbica que actúa como péptido señal para el anclaje del grupo GPI, y que es degradada durante la maduración de la proteína (Stahl *et al.*, 1987). La **estructura secundaria** de la proteína del prión celular está compuesta por un 42% de α -hélice y un 3% de lamina p, detectado por medio de la difracción infraroja transformada de Fourier (Pan *et al.*, 1993). La **estructura terciaria** consiste en 3 α -hélices que conforman un núcleo ordenado en el extremo carboxilo terminal de la molécula y una zona amino terminal desestructurada y flexible (Zhang *et al.*, 2000).

Estado actual de la situación

Los priones son proteínas extrañas al organismo que **NO** son agentes infecciosos, es decir, **NO** son ni bacterias ni hongos ni parásitos, y menos aún virus. El primer hallazgo que desconcertó a los investigadores fue que **NO** estaba presente ningún ácido nucleico, ni ADN ni ARN, ni tampoco bases nitrogenadas o estructuras químicas, que, ante ciertos estímulos ambientales o celulares, pudieran dar origen a un pequeño ácido nucleico de estructura no convencional o incompleta (llamado por algunos autores como *virino*), rodeado por una envoltura de proteínas de la célula huésped, que le conferirían su resistencia a los agentes que desnaturalizan o modifican a los ácidos nucleicos habitualmente. Esta especulación aún no ha sido probada. Lo que sí está probado es que muchas células de nuestro organismo poseen una glicoproteína natural, citoplasmática, estructural, y no relacionada con ningún proceso patológico o cascada metabólica, que fue bautizada como proteína priónica o **PrPn**, y que puede convertirse en patogénica cuando un factor exógeno modifica su estructura conformacional secundaria, conduciéndola a un incorrecto plegamiento (β) de su estructura terciaria (**PrPsc**), que, a su vez, es autorreproducible y engendra fibrillas y placas de amiloide vinculadas con muchas enfermedades animales (encefalopatía espongiforme bovina o EBB o enfermedad de las vacas locas), y humanas o enfermedad de Creutzfeld-Jakob (ECJ). Stanley B. Prusiner, en 1982, señaló que las EBB son afecciones de lento desarrollo del sistema nervioso central que se caracterizan por la degeneración progresiva de la sustancia gris. En los animales, describió el scrapie, la encefalopatía transmisible del visón, la EBB y la enfermedad con consunción crónica del cariacú y el alce en cautiverio. Las modificaciones histopatológicas relevantes son: la pérdida neuronal, la proliferación e hipertrofia de los astrocitos, la vacuolización neuronal y la escasa respuesta inflamatoria. La coexistencia de pequeñas y frecuentes vacuolas en el tejido nervioso configuran el “cambio espongiforme”, mientras que, si las vacuolas son escasas y grandes, constituyen un “estado esponjoso”. Estas encefalopatías son transmisibles con un período de incubación muy prolongado, un curso crónico e inexorablemente fatal. La resistencia a los tratamientos físicos y químicos que, habitualmente inactivan a los virus, y la carencia de una

respuesta inmune específica en estas enfermedades, lleva a profundizar ciertas líneas de investigación que posibiliten proteger a la **PrPn** natural del efecto deletéreo de la **PrPsc**. Merz, en 1981, describió las “fibrillas asociadas con el scrapie”, y con técnicas de purificación del tejido cerebral de animales con scrapie pudo aislar una proteína entre 27 y 30 kDa, que bautizó **PrPn 27-30**, y que caracterizó como una sialoglicoproteína asociada a las membranas celulares, resistente a la proteinasa K. Esta proteína forma una proteína más grande (**PrPn 33-35**) y se polimeriza en bastones amiloides. El gen que codifica para **PrPn 27-30** se halla en cerebros normales de animales, no se polimeriza y es degradada por la proteinasa K. Un error postranscripcional podría generar cambios en las propiedades fisicoquímicas de la **PrPn 27-30**, que alteren su procesamiento intracelular. La **PrPn** posee una estructura helicoidal del tipo α , con cuatro regiones globulares, sensible a las proteasas; es una proteína monomérica con monómeros estables que poseen resistencia normal y es soluble a los detergentes. Por su parte, la **PrPsc** es una proteína plana con una estructura laminar β , resistente a las proteasas, que compone agregados proteicos, con monómeros poco estables que forman agregados amiloides, con resistencia notable a la radiación y a los disolventes fuertes, pero es insoluble ante la actividad de los detergentes. Se destaca que las investigaciones determinaron que ambas proteínas priónicas poseen la misma secuencia de aminoácidos, pues en el fondo derivan del mismo gen. De tal manera, una proteína globular (**PrPn**) con una conformación espacial del tipo α -hélice del citoplasma neuronal normal entra en contacto con una proteína **PrPsc** que le induce modificaciones espaciales del tipo β -hélice, con una forma de plegamiento inadecuado y perjudicial para la vida celular, ya que no puede ser degradada, lo que facilita la formación de acúmulos intracitoplasmáticos insolubles de aspecto amiloide, que llevan al mal funcionamiento celular y, como estos acúmulos se autorreproducen, la muerte celular es inevitable. El mecanismo por el cual ocurre este plegamiento es poco conocido, aunque se especula acerca de la participación de varios aminoácidos en su génesis. Así, los radicales **SH** presentes en la forma α se intercambiarían con cisteínas, formando puentes disulfuro, y produciendo un cambio

conformacional del tipo β . En este cambio intervendrían la **metionina**, la **cisteína** y la **valina**. Si bien en el cerebro es imposible romper estos puentes disulfuro, en el laboratorio es factible lograrlo con beta-mercaptoetanol y acetilación con iodoacetato, o bien oxidándolos con ácido per fórmico. Otros autores sostienen que la sustitución de leucina por prolina sería la causa de la desestabilidad de la forma α hacia la forma β . Como consecuencia de una ingesta “contaminada” (de ahí surgió el paralelismo conceptual con los agentes infecciosos), en el epitelio intestinal se ubica en las **células M**, especializadas en el transporte de macromoléculas y agregados particulados. Luego se incorpora al sistema fagocítico (macrófagos y leucocitos), que, conjuntamente con las células dendríticas y LB locales, inician una respuesta inmune con la síntesis de un anticuerpo específico que no tiene ninguna capacidad para anular la funcionalidad y, así, como un “inmuno-complejo” aberrante, se dirige por los vasos linfáticos al bazo y a los ganglios linfáticos adyacentes. Se discute si su llegada al sistema nervioso central es por la linfa o bien por el propio tejido nervioso afectado en esta peregrinación. La muerte neuronal se produce porque las **PrPsc** son insolubles y resistentes a las proteasas lisosomales, lo cual conduce a su acumulación en los lisosomas, que se rompen por la presión endógena de numerosas **PrPsc**, acidificando el medio e induciendo la muerte neuronal.

Las enfermedades humanas y animales debidas a los priones pueden ser de tres clases: a) formas hereditarias de base genética, homocigotos metionina-valina en el codón 129 del gen, que inducen el plegamiento erróneo de la **PrPn**; b) formas mal llamadas “infecciosas” en la que la **PrPn** es inducida a transformarse en **PrPsc** por un agente exterior, que generalmente ingresa por la vía oral-digestiva, y c) una forma esporádica que aparece sin causa aparente, sin base genética ni agente exterior demostrable, y que puede cesar espontáneamente, habiendo producido un mínimo de lesiones cerebrales. En los animales, las enfermedades priónicas se caracterizan por incoordinación de los movimientos, ceguera y muerte. La más conocida es la EBB que, desde 1984, fue causada por la alimentación de bovinos con restos suplementarios de ovinos y caprinos que habían padecido la enfermedad. La llamada

“tembladera” (prurito lumbar) de ovejas y cabras también se transmite a los vacunos, que, a su vez, pueden transmitirla a los seres humanos. La preparación industrial de estos suplementos dietarios muchas veces no está adecuadamente supervisada, y la materia prima que se emplea en su elaboración dista mucho de ser la que corresponde. Los gatos pueden sufrir estos procesos cerebrales por sus ingestas “contaminadas”, siendo los perros, curiosamente, más resistentes a ellas.

El kuru

Es una enfermedad humana, debida a los priones y localizada en Papúa (Nueva Guinea), que fuera descrita por Gajduzek y Zigas en 1957, luego de muy laboriosas investigaciones en un ambiente muy hostil y primitivo. Kuru puede ser traducido como “temblor por miedo o por frío”, así como “sonriente sin motivo aparente”. Era la causa de muerte más común de la población de Papúa, pudiendo alcanzar hasta el 1% anual de un total de 35.000 personas. Se pensó que era una enfermedad degenerativa de causa desconocida, hasta que, en 1959, Hadlow observó las notables similitudes entre el kuru y el scrapie, una enfermedad “infecciosa” de las ovejas. Gajduzek, en 1966, estudió la transmisión del kuru a los primates, inoculándolos con restos cerebrales, y logró así el primer kuru no humano, develando un misterio que podía ser remediado. El kuru solo enferma a los miembros del grupo lingüístico fore en Nueva Guinea, y era una enfermedad desconocida antes del canibalismo ritual. Los niños y las mujeres de ambos sexos eran muy afectados. La preparación del cadáver para el ritual y la ingestión de trozos de cerebro para conservar el espíritu del fallecido debieron facilitar la incorporación de priones que, luego de meses o años, darían lugar a la enfermedad. Curiosamente, las embarazadas no producían transmisión transplacentaria.

Sistema inmune y priones

La acumulación del agente “infeccioso” en los tejidos linfoides es un requisito fundamental para el desarrollo de la enfermedad, como fue demostrado por diversos hechos: 1) la ausencia de placas de Peyer en ratones inoculados oralmente con scrapie impide la neuroinvasión (Prinz *et al.*, 2003b); 2) el desafío intraperitoneal con scrapie en ratones esplenectomizados

tampoco produce neuroinvasión (Fraser y Dickinson, 1970), y 3) bloquear la acumulación del agente “infeccioso” en los nódulos linfáticos impide la invasión del sistema nervioso (Mohan *et al.*, 2005a). El tiempo de permanencia del prión en los tejidos linfoides y la magnitud de la implicancia de cada uno de ellos pueden variar en función del hospedador y de la cepa de prión (Foster *et al.*, 2001; Glatzel *et al.*, 2003; Jeffrey *et al.*, 2002; Terry *et al.*, 2003; Wadsworth *et al.*, 2001). Como se comentó antes, para que la **PrPsc** se acumule en los tejidos linfoides es necesario que interaccione con la proteína celular en las células del sistema inmunitario. Así, la **PrPn** se expresa en: 1) los linfocitos, viéndose implicada en las rutas de señalización (Bainbridge y Walker, 2005; Cashman *et al.*, 1990; Li *et al.*, 2001; Mattel *et al.*, 2004); 2) en macrófagos, donde la **PrPn** sería un marcador de activación (directo o indirecto) que sufre el macrófago tras una infección (Brown y Besinger, 1998; Hutter *et al.*, 2003), y 3) en células dendríticas donde la **PrPn** es capaz de inducir la maduración de estas (McBride, 2005).

Todas las EETs poseen un período de incubación muy largo que en los humanos varía entre los 1,5 y 40 años (Hilton, 2006). Este período de incubación tan largo se debe a la ineficiente replicación del agente infeccioso, que, a su vez, retarda su acumulación a la concentración necesaria para que ocurra la neuroinvasión. Existe una serie de pasos críticos en la patogénesis de las EETs: la entrada del agente “infeccioso” (en el caso de que este sea su origen), su acumulación en ciertos tejidos, su replicación intracelular y su transporte final al sistema nervioso central donde causa las lesiones. Las células del sistema inmunológico han demostrado jugar un papel importante durante este proceso (Aucouturier y Camaud, 2002), por un lado, amplificando la señal (permitiendo la replicación de **PrPsc**) y, por otro, actuando como “caballo de Troya”, transportando el material infeccioso al SNC, evitando su reconocimiento por parte de las defensas inmunológicas del organismo. Tras la ingesta de alimentos contaminados por priones (la ruta natural de infección), estos deben atravesar el epitelio intestinal para acceder a los tejidos linfoides, que resultan esenciales para que la infección por priones progrese. Mediante sistemas *in vitro*, se ha comprobado que el agente causal

del *scrapie* es capaz de penetrar a través de las **células M** del epitelio intestinal (Heppner *et al.*, 2001a), vía de entrada de numerosos microorganismos (Neutra *et al.*, 1996). A pesar de que son necesarios estudios *in vivo* para confirmarlo, la resistencia de ratones con un número bajo de placas de Peyer (y por tanto de **células M**) al desafío oral con priones parece ratificar esta teoría (Prinz *et al.*, 2003b).

El hecho de que las **células M** estén especializadas en internalizar antígenos para su rápida diseminación hacia otras células, tales como macrófagos, linfocitos y células dendríticas (CDs) (Neutra, 1996), facilitarían su distribución por el sistema inmunológico. También se postula que, para atravesar la barrera intestinal, el prión podría utilizar una vía alternativa de entrada con endocitosis dependiente de la ferritina (Mishra *et al.*, 2004). El núcleo resistente a proteasas de **PrPsc** es capaz de formar complejos proteicos asociados a la ferritina, lo que, junto con la abundancia de esta en los alimentos cárnicos, sirve de sustento a esta teoría. Mientras que la ruta oral de infección es lenta y poco eficaz, la infección de priones a través de escarificaciones en la piel es una ruta de infección altamente efectiva (Carp, 1982; Taylor *et al.*, 1996). En tanto algunos autores defienden el papel de las CDs de la piel en esta infección, otros apuestan por la entrada del agente infeccioso desde la piel hasta los nervios periféricos. Esta última hipótesis avalaría la velocidad con que se disemina la **PrPsc** hacia el sistema nervioso central. Cuando la proteína de prión atravesó el epitelio intestinal llega a una invaginación intraepitelial de las **células M** o bolsillo intraepitelial. Desde allí, el agente “infeccioso” sería transportado por los LB, LT, macrófagos o células dendríticas de la lámina propia epitelial hacia los tejidos linfoides donde se hallan las células dendríticas foliculares (CDFs), que juegan un papel fundamental durante las fases de replicación y acumulación del prión infeccioso. Dado que los linfocitos se localizan en el “bolsillo” intraepitelial de las **células M**, no estarían implicados en el transporte del agente infeccioso tras la exposición intrainestinal, ya que no presentan altos niveles de **PrPsc** en ningún momento durante el transcurso de la enfermedad (Huang *et al.*, 2002). El papel de los macrófagos resulta controvertido, pues *in vitro* se ha demostrado que juegan un papel protector, limitando la infec-

tividad de los priones (Carp y Callahan, 1981; Carp y Callahan, 1982). Esta teoría está avalada por el hecho de que tratamientos *in vivo* con diclorometileno-bifosfanato (DP), que depleciona temporalmente a los macrófagos, provocan la rápida acumulación del prión en los tejidos linfoides tras el desafío oral (Maignien *et al.*, 2005) o intraperitoneal (Beringue *et al.*, 2000) con el agente infeccioso. No obstante, este dato no excluye la posibilidad de que el macrófago pueda ser el transporte o propagación en fases más avanzadas de la enfermedad. En estudios *in vitro* se ha demostrado que la célula dendrítica es capaz de degradar el prión mediante cistein proteasas (Lühr *et al.*, 2004 y 2002; Mohan *et al.*, 2005c), lo que indicaría que, *a priori*, la CD no sería un buen candidato del transporte del agente “infeccioso” a los órganos linfoides. Sin embargo, otros autores demuestran que un subtipo de CD es capaz de captar y retener en su forma nativa la proteína infecciosa **PrPsc** (Huang *et al.*, 2002; Mohan *et al.*, 2005c). Este subtipo celular es único entre las CDs, debido a su capacidad para migrar dentro de los folículos de LB (Wykes *et al.*, 1998), área de los órganos linfoides en la que se localizan las CDFs (Bemey *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2002). La capacidad de ciertos péptidos específicos del prión de actuar como sustancias quimio-atractivas para las CDs avalan aún más el papel de este subtipo celular como transportadores del **PrPsc** (Kaneider *et al.*, 2005 y 2003), incluso, por qué no, de manera independiente a las **células M**, insertando sus prolongaciones citoplasmáticas entre las células epiteliales del intestino (Rescigno *et al.*, 2001). Se ha defendido incluso el papel de las CDs como transportadores directos de **PrPsc** desde el intestino hacia las fibras nerviosas que inervan las placas de Peyer (Defaweux *et al.*, 2005; Hosoi *et al.*, 1993). Así, la transferencia de priones a las terminaciones nerviosas del nervio esplénico y del nervio vago ocurriría fácilmente en la región supra-folicular, sin que las CDFs intervengan en el proceso (Aucouturier, 2001). Aunque las células dendríticas jugarían un papel en la propagación de los priones hacia el sistema nervioso central, no olvidemos su papel fagocítico, por lo que serían protectoras frente a la infección, degradando la **PrPsc** (Lühr *et al.*, 2002) de una manera similar a los macrófagos. Tras la exposición inicial al agente “infeccioso” y antes de que tenga lugar la neuroinvasión, el prión

se acumula en tejidos linfoides: bazo, nódulos linfáticos, tonsilas, apéndice y placas de Pey-er (Eklund, 1967; Hadlow, 1987; Hilton, 1998; Kimberlin y Walker, 1979; Sigurdson, 1999). Notables experimentos permitieron definir el tipo celular implicado en la propagación de los priones de baja densidad (Clarke y Kimberlin, 1984), de extensa vida media y mitóticamente quiescentes (Fraser y Farquhar, 1987). Las células de los folículos linfoides o células dendríticas foliculares (CDF) poseen altos niveles de expresión de **PrPn**. También es el caso de los macrófagos y los linfocitos, que han sido descritos como candidatos responsables de la acumulación y la propagación del agente infeccioso (Beekes y McBride, 2000; Jeffrey *et al.*, 2000; van Keulen *et al.*, 1996). Mediante técnicas de inmunohistoquímica y microscopía electrónica sobre secciones de tejido cerebral de varias especies afectadas por EETs, se ha observado que el agente "infeccioso" se localiza en las CDF y en los lisosomas de los macrófagos de cuerpo tingible dentro de los centros germinales (Brown *et al.*, 1999; McBride *et al.*, 1992; van Keulen *et al.*, 1996). Una de las funciones de los macrófagos dentro de los centros germinales es endocitar los inmunocomplejos atrapados en la superficie de las CDFs. Al igual que las CDFs, los macrófagos son células radorresistentes (con bajo índice mitótico), por lo que, en principio, podrían estar involucradas en la acumulación de infectividad tras una infección periférica.

Ha podido comprobarse experimentalmente que la disminución de la población de macrófagos incrementaba la acumulación de **PrPsc**, y que se reducían significativamente los tiempos de incubación en bioensayos de ratón (Beringue *et al.*, 2000). Este hecho sugiere, por un lado, que el papel de los macrófagos consistiría en la eliminación de los agregados de **PrPsc** y, por otro, que la degradación lisosómica de la **PrPsc** en los macrófagos debe ser un fenómeno menos eficiente que la transformación de **PrPn** a **PrPsc** (Brun, 2003). Por tanto, mientras que las CDF parecen jugar un papel fundamental en la acumulación temprana y la replicación del prión, el papel principal de los macrófagos sería impedir la acumulación del agente infeccioso eliminando los agregados de **PrPsc**. Las CDFs están en los folículos primarios de LB y en los centros germinales de los tejidos linfoides. A diferencia de las células dendríticas, las

CDF son un linaje derivado de precursores no hematopoyéticos (Kapasi, 1993; Shortman y Liu, 2002) y no tienen funciones fagocíticas ni migratorias (Imazeki, 1992). Las CDF son capaces de atrapar y retener antígenos en su estado nativo y, debido a que son células de extensa vida media, pueden retener estos antígenos durante meses e incluso años (Mandel, 1980). Dada la asociación de las CDF y los LB, se ha sugerido que las CDF jugarían un papel relevante durante la generación de respuestas de anticuerpos, y que mantienen la memoria inmunológica, aunque también se han asociado a muchas otras funciones (Haberman y Shlomchik, 2003; Kosco-Vilbois, 2003). En la infección con priones, se demostró la importancia de este tipo celular en los momentos tempranos de la infección; es decir, en las fases de acumulación y replicación del agente "infeccioso". En ausencia de CDFs, la neuroinvasión se ve retrasada y la susceptibilidad a la enfermedad, reducida (Mabbott, 2000a y 2003; Mohan, 2005b; Montrasio, 2000). Mediante estudios *in vitro* se ha podido confirmar que las CDFs expresan altos niveles de **PrPn** (requisito necesario para la replicación del agente "infeccioso") (Brown, 1999), y que la **PrPsc** se acumula en el citoplasma y en los espacios extracelulares de las dendritas (Jeffrey, 2000). Para mantener a las CDFs en sus diferentes estados de maduración son imprescindibles los estímulos de las citoquinas procedentes de los LB (Mackay y Browning, 1998), entre los que la linfotóxina de membrana y el factor de necrosis tumoral (TNF α) juegan un papel fundamental. El bloqueo de ambos receptores provoca la depleción temporal de las CDFs (Mackay y Browning, 1998) y reducen la susceptibilidad a la enfermedad (Mabbott *et al.*, 2000a; Mabbott, 2002; Mabbott, 2003; Mohan, 2005a; Montrasio, 2000), de un modo parecido a lo que ocurre en ratones carentes de LB (Klein, 1997; Mabbott, 2000b; Prinz, 2002). Demostrada la importancia de las CDFs en la patogénesis de las EETs, la siguiente cuestión es el modo en que el prión es captado por este tipo celular. Normalmente, los antígenos captados por las CDFs se encuentran en forma de inmunocomplejos antígeno-anticuerpo y/o componentes del complemento. Las CDFs reconocen los inmunocomplejos a través del receptor Fc del anticuerpo y/o a través de los receptores CRI y CR2 del complemento (Yoshida, 1993). Mientras que deficien-

cias en los receptores Fc no afectan la acumulación de priones, la ausencia de componentes del complemento (C1q, C2, C3 y factor B) o la ausencia de receptores de estos sí afectan su acumulación en el bazo (Klein, 2001; Mabbott, 2001). Además, en estudios preliminares se ha demostrado que el C1q es capaz de unirse a una proteína prión (Prn). Existen evidencias de que la proteína infecciosa por sí misma en un sistema *in vivo* no resulta directamente neurotóxica, necesitando de la presencia de la **PrPn** (los ratones PrPKO no se infectan) y, además, no siempre existe una estrecha correlación entre los depósitos de **PrPsc** y la severidad de la enfermedad (Bueler *et al.*, 1994; Collinge *et al.*, 1995; Hill *et al.*, 2000; Hsiao *et al.*, 1990; Lasmezas *et al.*, 1997; Mallucci *et al.*, 2003; Medori *et al.*, 1992). Estos datos sugieren que más que la acumulación del **PrPsc** la clave de la patogénesis de las EETs reside en el proceso de conversión de **PrPn** a **PrPsc**. Así pues, cualquier estrategia terapéutica eficaz frente a las EETs debería ir dirigida a frenarlo. Finalmente, para validar una buena terapia o profilaxis resulta fundamental tener en cuenta la cepa de prión de que se trata, la especie afectada y la ruta de inoculación del agente “infeccioso”, dado que la eficacia de esta dependerá de estas variables. Existen líneas de investigación dirigidas a generar una terapia efectiva frente al prión. Entre las más prometedoras, nos encontramos con la utilización de: heptámeros de ARN que bloquean la PrPn y consecuente producción de **PrPsc** de novo (Proske *et al.*, 2002; Rhie *et al.*, 2003); sustancias que inhiben las cascadas de señalización intracelular en que la **PrPn** se ve implicada (Bate *et al.*, 2004; Ertmer *et al.*, 2004; Nordstrom *et al.*, 2005; Shaked *et al.*, 2003) y sustancias químicas que interfieren directa o indirectamente en el proceso de conversión de **PrPn** a **PrPsc**. Entre estas sustancias encontramos el rojo congo (Caughey y Race, 1992), la anfotericina B (Pocchiari *et al.*, 1987), las antraciclinas (Tagliavini *et al.*, 1997), los polianiones sulfatados (Caughey y Raymond, 1993), las porfirinas (Priola *et al.*, 2000), las poliaminas (Supattapone *et al.*, 2001), los péptidos “rompedores” de hojas P (Soto *et al.*, 2000) y la curcumina (Caughey *et al.*, 2003). Ninguna de estas estrategias ha resultado efectiva para ser empleada como una terapia anti-prión (Aguzzi y Sigurdson, 2004), aunque muchas resultan prometedoras para seguir investigan-

do sobre ellas. Al igual que los ratones “artificialmente” privados del gen del prión (PrPKO) son resistentes a la enfermedad, existen “variantes naturales” del prión resistentes a la transformación infecciosa. Así, en ovejas y en humanos han sido descritas dos mutaciones naturales en el gen que codifica para la proteína **PrP**, **Q167R** y **Q218K**, respectivamente, que confieren resistencia frente al scrapie y CJD (Goldmann *et al.*, 1994; Shibuya *et al.*, 1998). La expresión transgénica de estas mutaciones en ratones los hace resistentes al desafío con priones (Perrier *et al.*, 2002).

Se está estudiando la posibilidad de seleccionar animales (ovejas y vacas) genéticamente resistentes a la enfermedad para evitar futuras epidemias. La aplicabilidad de estas mutaciones en protocolos de terapia génica se ha barajado como una herramienta posible para luchar contra las enfermedades causadas por priones. Uno de los resultados más esperanzadores en este aspecto procede de experimentos de bloqueo de la **PrPn**, con la consecuente imposibilidad de ser transformada. En 1973, Porter describió las enfermedades producidas por priones como enfermedades que cursaban sin una respuesta inmunológica humoral detectable en el huésped afectado (Porter *et al.*, 1973), a pesar de que exista una reacción inflamatoria (Baker *et al.*, 2004). Actualmente, se investiga si estimular el sistema inmunológico del huésped contra el prión podría ser una terapéutica o profilaxis eficaz contra estas enfermedades. De ellas, cabe destacar la depleción de las CDFs, la estimulación del sistema inmunológico innato y la utilización de anticuerpos específicos para inhibir la progresión de la enfermedad. La linfotóxina del LT y el factor de necrosis tumoral (TNF α) generados por los LB son necesarios en la diferenciación y la maduración de las CDFs (Brown *et al.*, 1999; Mabbott *et al.*, 2000b), y el bloqueo en cualquiera de estas citoquinas da lugar a un incremento en el tiempo de incubación de la enfermedad. Este hecho hizo pensar en la posibilidad de deplecionar temporalmente las CDFs como una terapia posible en fases tempranas de una infección por priones. Con este objetivo, se administró una inmunoglobulina fusionada al receptor de la linfotóxina β (LT p-R-Ig), tratamiento capaz de bloquear la maduración de las CDFs inhibiendo la cascada de señalización que conduce a la expresión de estas linfotóxi-

nas. Curiosamente, el efecto del tratamiento de ambos dependía del momento y la ruta de administración. Así, por ejemplo, si la proteína de fusión se administraba tras el desafío intraperitoneal del scrapie (en una fase temprana), los animales quedaban protegidos (Mabbott *et al.*, 2000a y 2003; Montrasio *et al.*, 2000), mientras que si el tratamiento se aplicaba antes del desafío intraperitoneal, la protección era total para algunos animales mientras que en otros únicamente retrasaba la aparición de la enfermedad (Mabbott *et al.*, 2003). Por otro lado, el tratamiento con LT p-R-Ig inmediato tras el desafío oral con scrapie evitaba la aparición de la enfermedad, no observándose depósitos de PrP^{Sc} en el cerebro de los animales (Mabbott *et al.*, 2003). Sin embargo, el tratamiento administrado 14 días posdesafío oral no tuvo ningún efecto en el desarrollo de la enfermedad (Mabbott *et al.*, 2003), lo cual indicaría que la entrada del prión en el sistema neuronal ocurre rápidamente tras el desafío oral. Finalmente, el desafío a través de escarificaciones de la piel dio como resultado una mejora del tratamiento cuando este era administrado previo al desafío (similar a la ruta intraperitoneal) (Mohan *et al.*, 2005a). En los humanos, las enfermedades causadas por priones tienen tiempos de incubación muy largos (de años a décadas), una fase clínica muy breve (meses), no tienen un diagnóstico preclínico y el desenlace de la enfermedad es fatal. Un gran problema de las EETs, junto con todas las enfermedades neurodegenerativas, es que la posible terapia debe dirigirse necesariamente al sistema nervioso central, lo cual supone que debe ser capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. En las situaciones en que la infección por priones se produce periféricamente (infección oral o intraperitoneal), la utilización de terapias y/o profilaxis podría tener más probabilidades de éxito si se aplican en etapas tempranas de la infección, antes de que el agente “infeccioso” llegue al SNC. Así, pues, resulta necesario desarrollar herramientas profilácticas contra estas enfermedades, a pesar de que el número de afectados sea relativamente bajo (aproximadamente 160 personas han sido diagnosticadas con la nvCJD en el mundo hasta el momento), sobre todo pensando en el número de personas asintomáticas potencialmente infectadas (la infección puede durar décadas) (Trevitt y Collinge, 2006). En lo que se refiere a

las otras etiologías de la enfermedad (iatrogénica, familiar y esporádica), no se justifica el desarrollo de vacunas o medidas profilácticas capaces de proteger o paliar la enfermedad en grupos de riesgo. Es muy prometedora la modulación del sistema inmunológico con el fin de conseguir estrategias terapéuticas y/o profilácticas frente a estas enfermedades. Este tipo de terapias podrían resultar de utilidad en el futuro para el tratamiento de individuos conscientes de haber sido infectados o como método preventivo para el personal con alto riesgo de infectarse (médicos, enfermeros, etc.). Del mismo modo, sería interesante explorar las posibilidades de esta metodología para prevenir el desarrollo de encefalopatías hereditarias. La respuesta inmunológica innata actúa como una primera barrera de agresiones del exterior, bien consecuencia de un patógeno (virus, bacterias, parásitos y hongos) o bien de cualquier otra naturaleza, como sería la exposición a un adyuvante o a otras sustancias inmunoestimuladoras. Varios son los actores que intervienen en la respuesta innata, jugando un papel predominante las células dendríticas, los macrófagos y las células NK (células asesinas naturales), así como las quimiocinas y chemocinas como moduladores químicos responsables finales de la defensa (Byrne y Halliday, 2002; Foti *et al.*, 2006; Young y Ortádo, 2006; Rodríguez y Alonso, 2015). Entre las quimiocinas más relevantes para el sistema inmunológico innato, encontramos los interferones, citoquinas que son capaces de inhibir de manera eficiente, por ejemplo, las evoluciones virales. Sin embargo, el tratamiento con interferón o con estimuladores de interferón en ratones infectados con scrapie no parece tener un efecto en la progresión de la enfermedad (Allen y Cochran, 1977; Field *et al.*, 1969; Gresser *et al.*, 1983; Gresser y Pattison, 1968; Worthington, 1972). Estos mismos resultados se reprodujeron en monos infectados con CJD, scrapie y kuru (Amyx *et al.*, 1984). La administración de citidil-guanil oligodeoxi-nucleótidos (CpGs), concretamente de CpG 1826, es conocida por su estimulación de la respuesta innata en mamíferos (Lipford *et al.*, 1998). En ratones infectados con scrapie se ha observado un leve incremento en los tiempos de incubación cuando CpG 1826 fue administrado inmediatamente tras la infección y de manera diaria durante cuatro días. Cuando este tratamiento se prolongó durante tres se-

manas, la aparición de la sintomatología se retrasó aproximadamente 149 días (Sethi *et al.*, 2002). Podrían generarse anticuerpos frente al prión responsables de este retraso (Sethi *et al.*, 2002), pero, la administración repetida de CpGs da lugar a la destrucción de los folículos linfoides (lugares de amplificación del prión) y a una inmunosupresión, hechos que pueden explicar el efecto protector del tratamiento. Así, hoy en día, no se utiliza CpGs debido a sus efectos tóxicos. Uno de los efectos del tratamiento con CpGs es la expansión masiva de macrófagos y células dendríticas. Ambos tipos celulares juegan un importante papel en la degradación o el secuestro de la proteína infecciosa (Seringue *et al.*, 2000) y, por ende, dan lugar a un retraso de la enfermedad. También el adyuvante de Freund completo, magnífico estimulador del sistema inmunológico innato, es capaz de retrasar ligeramente los tiempos de incubación de la enfermedad en ratones tras el desafío intraperitoneal o intracraneal (Tal *et al.*, 2003). Otros generaron anticuerpos frente a la proteína del prión utilizando distintas estrategias. Se han hecho en ratones normales y en PrPKO, inmunizando con priones purificados (Bendheim *et al.*, 1984) y con fibras asociadas a scrapie (SAFs) (Kascsak *et al.*, 1987). También se ha descrito la utilización de proteína recombinante del prión como una estrategia para generar anticuerpos, tanto en ratones PrPKO (Seringue *et al.*, 2003; Khalili-Shirazi *et al.*, 2005; Korth *et al.*, 1997; Krasemann *et al.*, 1996; White *et al.*, 2003; Williamson *et al.*, 1996) como en ratones normales (Gilch *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003; Sigurdsson *et al.*, 2002; Souan *et al.*, 2001). El potencial terapéutico de estos anticuerpos *in vitro* mostró una reducción de dos logaritmos de un inóculo infeccioso de scrapie tras la incubación con un anticuerpo policlonal antiprión (Gabizon *et al.*, 1988). Varios autores utilizaron anticuerpos para evaluar su efecto en diferentes líneas celulares *in vitro*. Por ejemplo, el anticuerpo 6H4, que reconoce tanto la PrP bovina (residuos 144-152) como de otras especies (Korth *et al.*, 1997), es capaz de inhibir la acumulación de PrPsc en células infectadas con scrapie (Enari *et al.*, 2001). Otros autores describen los efectos beneficiosos de la utilización de anticuerpos frente al prión en estudios *in vitro*, utilizando distintas cepas de prión y diferentes líneas celulares, que muestran el gran potencial de esta estrategia. A pesar de

que se han logrado efectos beneficiosos *in vitro*, algunos modelos resultaron ser efectivos *in vivo* (Trevitt y Collinge, 2006; Aguzzi y Sigurdson, 2004). La administración del anticuerpo ICSM 18 (que reconoce el epitopo 144-152 de la PrPn humana) o del anticuerpo ICSM 35 (que reconoce el epitopo 94-105 de la PrPn humana) a elevadas dosis durante siete días tras el desafío intraperitoneal con scrapie previene la aparición de la enfermedad. Sin embargo, el tratamiento no es efectivo si se inicia con la aparición de la sintomatología clínica, o bien si el desafío se realiza mediante la ruta intracraneal (White *et al.*, 2003). Por otro lado, la administración de los anticuerpos capaces de reconocer los epitopos 34-52 (8B4) y 175-185 (8H4) de la PrP murina tras la infección intraperitoneal con scrapie fue capaz únicamente de retrasar un poco la aparición de la infección (Sigurdsson *et al.*, 2003).

A pesar de los aparentes efectos beneficiosos de la administración pasiva de anticuerpos, se ha visto que si estos se administran directamente a nivel del hipocampo y a una concentración elevada (1 mg/ml) provocan la apoptosis de neuronas en el cerebelo y el hipocampo, en 24 horas.

Este efecto pudo conseguirse únicamente tras la administración de anticuerpos monoclonales que reconocen el epitopo comprendido entre los aminoácidos 95 y 105 de la secuencia de la PrP humana, y no con otros monoclonales que reconocen otras partes de la proteína (Solfrosi *et al.*, 2004). Este resultado indica que, como consecuencia de la unión del anticuerpo a este dominio de la PrPn, se bloquea alguna vía de señalización esencial para la supervivencia neuronal.

La transferencia pasiva de anticuerpos puede ser una buena herramienta para luchar contra las enfermedades priónicas. Sin embargo, para su futura aplicabilidad en los seres humanos será necesario realizar estudios muy exhaustivos que descarten posibles efectos deletéreos.

A pesar de que a lo largo de una infección con priones no se generan anticuerpos detectables frente al prión, acabamos de comprobar que pueden generarse anticuerpos específicos de muy diversas maneras, pudiendo en algún caso ser eficientes contra la enfermedad (Aguzzi y Sigurdson, 2004). Existe una serie de puntos críticos en la generación de anticuerpos frente

a la **PrPn**, entre ellos la tolerancia que presentan los animales frente a la **PrP** como inmunógeno, al tratarse de un antígeno propio (Aucouturier y Camaud, 2002; Aucouturier *et al.*, 2000; Berg, 1994; Heppner y Aguzzi, 2004; Porter *et al.*, 1973; Williamson *et al.*, 1996). Por otro lado, dado que la **PrPn** se expresa en muchos tipos celulares (Cashman *et al.*, 1990; Manson *et al.*, 1992), podría ser que la generación de anticuerpos frente a la **PrPn** desencadene una enfermedad autoinmune. Finalmente, parece complicado que los anticuerpos específicos frente a **PrPn** sean capaces de atravesar la barrera hematoencefálica en concentraciones terapéuticas de manera que pueda hacer su efecto terapéutico en el sistema nervioso central. No obstante, en los últimos años, diversos autores han descrito los efectos beneficiosos de la inmunización activa en ratones con proteína de prión. Sigurdsson y colaboradores han descrito un incremento de un 10% en el tiempo de incubación de la enfermedad en ratones inmunizados con proteína recombinante murina (residuos 23-230). Este incremento se observa únicamente cuando la inmunización se realiza dentro de las 14 semanas anteriores al desafío con scrapie adaptado al ratón. Ha sido descrita también una correlación paralela entre el título de anticuerpos y el incremento en el tiempo de incubación, mientras que no se observaron diferencias en la histopatología y en los niveles de **PrPsc** entre los animales tratados y los controles en las fases terminales de la enfermedad (Sigurdsson *et al.*, 2002).

La inmunización activa con el péptido de prión que comprende los residuos 105-125 de la **PrP** murina incrementa el tiempo de incubación en ratones **PrP** infectados oralmente con scrapie, mientras que esta misma inmunización con el polipéptido que comprende los residuos 90-230 no tiene ningún efecto de retraso en la enfermedad. Los anticuerpos generados tras la inmunización con el fragmento 90-230 reconocen un epitopo de la región 159-188 de la proteína priónica. Los autores proponen que mientras que estos anticuerpos resultan ineficaces frente a la enfermedad, los anticuerpos que reconocen las regiones 105-125 y/o 144-152 de la proteína priónica son capaces de retrasar la eficazmente (Schwarz *et al.*, 2003).

Rosset y colaboradores describieron en el año 2004 la inducción de no solo una respuesta humoral, sino también de una respuesta ce-

lular en ratones C57BL/6J601aHsd mediante la utilización de péptidos de prión junto con el inmunoestimulador CpG. En este estudio fueron utilizados tres péptidos diferentes (P98-127; P143-172 y P158-187) mezclados con CpG-1826.

Así, demostraron la inducción de LT secretoras de IFN- γ e IL-4 y la producción de anticuerpos en función del péptido utilizado. De este modo se hizo patente la capacidad de inducir una respuesta inmunológica tanto humoral como celular con la proteína del prión, utilizando un protocolo de vacunación que rompió la tolerancia frente al prión (Rosset *et al.*, 2004).

Profilaxis y tratamiento

Los **Prsc** se propagan transmitiendo proteínas mal plegadas. Cuando un prión se introduce en el cuerpo, induce a los **Prn** a cambiar a la conformación anómala. El **Prsc** actúa como una plantilla para dirigir el mal plegado. Los **Prsc** nuevos anómalos formados pueden entonces convertir a otros **Prn** a conformaciones anómalas. Se genera una reacción en cadena que produce grandes cantidades de **Prsc**. La propagación de **Prsc** requiere la presencia de **Prn**. Los animales que no expresan priones normales no contraen la enfermedad ni la transmiten. Todos los priones anómalos conocidos inducen un pliegue amiloide, que causa que la proteína normal polimerice en un agregado de láminas β muy apretadas. Estos agregados amiloides son fibrillas que tienen la capacidad de crecer por sus extremos y replicarse cuando la rotura hace que dos extremos se conviertan en cuatro. El período de incubación está determinado por la tasa de crecimiento exponencial de la replicación del prión. Una infección por prión permanece latente durante años. Sin embargo, cuando aparece un síntoma, la muerte tiene lugar en pocos meses. Esta nueva estructura alterada del prión normal es estable y comienza a acumularse, provocando un daño a gran escala en el tejido, y la muerte celular. El prión plegado de manera anómala es resistente a la desnaturalización por agentes físicos y químicos, lo que hace enormemente difícil su destrucción. Hay un gran número de priones diferentes, que tienen estructuras ligeramente distintas. Durante el proceso de réplica, los priones están sujetos a mutaciones seguidas por selección natural de otras formas de replicación. La tembladera de las ovejas es

un problema en gran parte del mundo y es la forma más extendida de encefalitis espongiforme transmisible (EETs) en Europa. Por ello, el control y la erradicación de las EETs en pequeños rumiantes es una de las mayores prioridades de la Unión Europea. Aunque las proteínas priónicas plegadas de modo anómalo son características de las EETs, es posible que no sean el agente infeccioso inicial. La idea se basa en cómo los priones son absorbidos por el intestino ovino. Hay investigadores que inocularon intestinos de oveja con extractos de cerebro que contenían Prsc, que se creía que eran la causa de la EET. Informaron que los priones anómalos inoculados fueron detectados en poco tiempo (3,5 horas) en la pared intestinal, y no en lugares en los que las proteínas priónicas generadas por la enfermedad se agregaban. Las proteínas priónicas normales que se convierten en anómalas se acumulan tras un mes desde la inoculación y aparecen en diferentes lugares en los que los priones anómalos inoculados fueron absorbidos. Es más, los experimentos sugieren que en los animales normales todos los priones ingeridos se digirieron antes de que pudieran ser absorbidos en el intestino. Ello sugiere que los priones no causan la enfermedad pasando por la pared intestinal. Este descubrimiento no excluye la posibilidad de que los priones puedan también causar la enfermedad si se absorbe una cantidad suficiente, pero es posible que los priones sean capaces de infectar directamente las terminaciones nerviosas mediante algún mecanismo desconocido.

Esterilización de priones

Los priones son obviamente diferentes de otros agentes infecciosos que lo son por su capacidad de provocar cambios conformacionales en los priones normales. Por tanto, la esterilización de priones requiere la desnaturalización de las proteínas a un estado en el que los priones no puedan inducir conformaciones anómalas de priones normales. Los priones son resistentes a las proteasas, al calor, a la radiación y a la formalina. Su destrucción requiere la hidrólisis o la reducción o la destrucción de la estructura terciaria. Hay que tener en cuenta que los priones parcialmente desnaturalizados pueden ser renaturalizados a partículas infecciosas bajo determinadas condiciones. Los priones pueden ser desactivados en un autoclave

ve a presión a temperatura de 132° C a 21 psi durante 90 minutos. Si el material infectado de prión se encuentra en una solución de hidróxido de sodio, puede tratarse en autoclave a 121° C a 21 psi durante una hora. También puede usarse un desinfectante común en una solución al 1% y dejarlo en remojo durante 10 horas o usar una solución al 10% durante una hora. Sin embargo, las carnes de diverso origen, la leche, los embutidos de dudosa preparación, en fin, todos aquellos alimentos que no cumplen con las normativas de los entes de regulación y control, así como las transfusiones de sangre y todo el instrumental quirúrgico, y todo tejido humano o animal, no deben ser suministrados sin haber sido previamente esterilizados según las normas establecidas. La vacunación con ADN ha sido ensayada como estrategia contra las enfermedades causadas por priones. Así, el caso más espectacular se refiere a la protección total conseguida en ratones transgénicos bovinos tras la inmunización con una vacuna de ADN expresando la proteína bovina y una posterior infección oral con proteína infecciosa. A pesar de lo prometedor de los resultados, se desconocen absolutamente los mecanismos de protección desencadenados por la vacuna, ya que no pudo detectarse ni respuesta humoral ni celular como consecuencia de la vacunación (Muller *et al.*, 2005; Calabrese A, Alonso A., 1975).

Bibliografía

- Abbott, A. (2004): Doctors seek lost data on Alzheimer's vaccine. *Nature*, 430, 715.
- Adorini, L., Moreno, J., Fuchs, S. (1991): Exogenous peptides compete for the presentation of endogenous antigens to major histocompatibility complex class II-restricted T cells. *J Exp Med*, 174, 945-948.
- Aguzzi, A., Sigurdson, C.J.: (2004) Antiprion immunotherapy; to suppress or to stimulate? *Nat Rev Immunol*, 4, 725-736.
- Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A.: (1967): Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid?, *Nature*, 214, 764-766.
- Alper, T., Haig, D.A., Clarke, M.C.: (1966): The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun*, 22, 278-284.
- Allen, L.B., Cochran, K.W.: (1977): Acceleration of scrapie in mice by target-organ treatment with interferon inducers. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 284, 676-680.

- Amyx, H., Salazar, A.M., Gajdusek, C. D.: (1984): Chemotherapeutic trials in experimental slow virus diseases. *Neurology*, 34.
- An, L.L., Rodriguez, F., Harkins, S.: (2000): Quantitative and qualitative analyses of the immune responses induced by a multivalent minigene DNA vaccine. *Vaccine*, 18, 2132-2141.
- An, L.L., Sette, A.: (1999): The multivalent minigene approach to vaccine development. *Expert Opin Investig Drugs*, 8, 1351-1357.
- Anderson, R.M., Donnelly, C.A.: (1996): Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature*, 382, 779-788.
- Anton, L.C., Schubert, U., Yewdell, J.W.: (1999): Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. *J Cell Biol*, 146, 113-124.
- Anton, L.C., Yewdell, J.W., Bennink, J.R.: (1997): MHC class I-associated peptides produced from endogenous gene products with vastly different efficiencies. *J. Immunol*, 158, 2535-2542.
- Antony, P.A., Piccirillo, C.A.: (2005): CD8+ T cell immunity against a tumor/selfantigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol*, 174, 2591-2601.
- Aucouturier, P. and Camaud, C.: (2002): The immune system and prion diseases: a relationship of complicity and blindness. *J Leukoc Biol*, 72, 1075-1083.
- Aucouturier, P., Carp, R.I., Wisniewski, T.: (2000): Prion diseases and the immune system. *Clin Immunol*, 96, 79-85.
- Aucouturier, P., Geissmann, P., Damotte, D.: (2001): Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *J Clin Invest*, 108, 703-708.
- Badovinac, V.P., Harty, J.T.: (2002): CD8(+) T-cell homeostasis after infection: setting the 'curve'. *Microbes Infect*, 4, 441-447.
- Bainbridge, J., Walker, K.B.: (2005): The normal cellular form of prion protein modulates T cell responses. *Immunol Lett*, 96, 147-150.
- Baker, C.A., Lu, Z.Y., Manuelidis, L.: (2004): Early induction of interferon responsive mRNAs in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurovirol*, 10, 29-40.
- Baldauf, E., Beekes, M., Diringer, H.: (1997): Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J Gen Virol*, 78 (F t 5), 1187-1197.
- Barry, M., Bleackley, R.C.: (2002): Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*, 2, 401-409.
- Barry, M.A., Howell, D.P., Singh, R.A. : (2004): Expression library immunization to discover and improve vaccine antigens. *Immunol Rev*, 199, 68-83.
- Bate, C., Reid, S., Williams, A.: (2004): Phospholipase A2 inhibitors or platelet activating factor antagonists prevent prion replication. *J Biol Chem*, 279, 36405-36411.
- Beekes, M., Baldauf, E.: (1996): Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *Virol*, 77 (Ft 8), 1925-1934.
- Beekes, M., McBride, P.A.: (2000): Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett*, 278, 181-184.
- Beekes, M., McBride, P.A., Baldauf, E.: (1998): Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol*, 79 (Ft 3), 601-607.
- Bendheim, P.E., Barry, R.A., Prusiner, S.B.: (1984): Antibodies to a scrapie prion protein. *Nature*, 310, 418-421.
- Berg, L J.: (1994): Insights into the role of the immune system in prion diseases. *Proc Natl Acad Sci, U S A*, 91, 429-432.
- Beringue, V., Demoy, M.: (2000): Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *J Pathol*, 190, 495-502.
- Beringue, V., Mallinson, G.: (2003): Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain. *Brain*, 126, 2065-2073.
- Beringue, V., Vilette, D.: (2004): PrPSc binding antibodies are potent inhibitors of prion replication in cell lines. *J Biol Chem*, 279, 39671-39676.
- Bemey, C., Herren, S.: (1999): A member of the dendritic cell family that enters B cell follicles and stimulates primary antibody responses identified by a mannose receptor fusion protein. *J Exp Med*, 190, 851-860.
- Blanco, E., Garcia-Briones, M., Sanz-Parra, A.: (2001): Identification of T-cell epitopes in nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 75, 3164-3174.
- Blanquet-Grossard, F.: (2005): Complement protein C1q recognizes a conformationally modified form of the prion protein. *Biochemistry*, 44, 4349-4356.
- Bolton, D.C., McKinley, M. P., Prusiner, S.B.: (1982): Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, 218, 1309-1311.
- Bonifacino, J.S., Weissman, A.M.: (1998): Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14, 19-57.
- Bonifaz, L.C., Arzate, S.: (1999): Endogenous and exogenous forms of the same antigen are processed from different pools to bind MHC class II molecules in endocytic compartments. *Eur J Immunol*, 29, 119-131.

- Bonini, C., Lee, S.P.: (2001): Targeting antigen in mature dendritic cells for simultaneous stimulation of CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*, 166, 5250-5257.
- Borchelt, D R., Prusiner, S.B.: (1990): Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol* 110, 743-752.
- Borrego, B., Fernandez-Pacheco, P.: (2006): DNA vaccines expressing B and T cell epitopes can protect mice from FMDV infection in the absence of specific humoral responses. *Vaccine*, 24, 3889-3899.
- Botija, C.: (1970): Diagnosis of African swine fever by immunofluorescence. *Bull Of Int Epizoot*, 73, 1025-1044.
- Boyle, J.S., Brady, J.L., Lew, A.M.: (1998): Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature*, 392, 408-411.
- Brown, D.R., Besinger, A.: (1998): Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J*, 334 (Pt 2), 423-429.
- Brown, D.R., Herms, J.W. : (1997): The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, 390, 684-687.
- Brown, K.L., Bruce, M.E.: (1999): Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat Med*, 5, 1308-1312.
- Bruce, M.E., Will, R.G.: (1997): Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 389, 498-501.
- Brun, A., Castilla, J., Torres, J.M.: (2003): Involvement of the immunological system in the pathogenesis of transmissible spongiform encephalopathies. *Rev Neurol*, 37, 648-653.
- Brun, A., Castilla, J., Torres, J.M.: (2004): Proteinase K enhanced immunoreactivity of the prion protein-specific monoclonal antibody 2A11. *Neurosci Res*, 48, 75-83.
- Buch, T., Waisman, A.: (2006): Protection from autoimmunity by DNA vaccination against T-cell receptor. *Methods Mol Med*, 127, 269-280.
- Bueler, H., Aguzzi, A.: (1993): Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, 73, 1339-1347.
- Bueler, H., Raeber, A.: (1994): High prion and PrPSc levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol Med*, 1, 19-30.
- Prusiner, S.B., Millhauser, G.L.: (2003): Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein. *Biochemistry*, 42, 6794-6803.
- Byrne, S.N., Halliday, G.M.: (2002): Dendritic cells: making progress with tumour regression? *Immunol Cell Biol*, 80, 520-530.
- Calin-Laurens, V., Forquet, F.: (1992): High efficiency of endogenous antigen presentation by MHC class II molecules. *Int Immunol*, 4, 1113-1121.
- Capellari, S., Cardone, F.: (2005): Creutzfeldt-Jakob disease associated with the R208H mutation in the prion protein gene. *Neurology*, 64, 905-907.
- Capellari, S., Parchi, P.: (2000): Effect of the E200K mutation on prion protein metabolism. Comparative study of a cell model and human brain. *Am J Pathol*, 157, 613-622.
- Carp, R.I.: (1982): Transmission of scrapie by oral route: effect of gingival scarification. *Lancet*, 1, 170-171.
- Carp, R.I., Callahan, S.M.: (1981): In vitro interaction of scrapie agent and mouse peritoneal macrophages. *Intervirology*, 16, 8-13.
- Carp, R.I., Callahan, S.M. : (1982): Effect of mouse peritoneal macrophages on scrapie infectivity during extended in vitro incubation. *Intervirology*, 17, 201-207.
- Cashman, N.R., Loertscher, R.: (1990) Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell*, 61, 185-192.
- Castilla, J., Diaz-San Segundo, F.: (2005): Vertical transmission of bovine spongiform encephalopathy prions evaluated in a transgenic mouse model. *J Virol*, 79, 8665-8668.
- Caughey, B.: (1995): Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem Biol*, 2, 807-817.
- Caughey, B., Race, R.E.: (1992): Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red. *J Neurochem*, 59, 768-771.
- 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, 18217-18223.
- Caughey, B., Raymond, G.J.: (1993): Sulfated polyanion inhibition of scrapie associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol*, 67, 643-650.
- Caughey, B., Raymond, L.D.: (2003): Inhibition of protease-resistant prion protein accumulation in vitro by curcumin. *J Virol*, 77, 5499-5502.
- Ciemik, I.F., Berzofsky, J.A., Carbone, D.P.: (1996): Induction of cytotoxic T lymphocytes and antitumor immunity with DNA vaccines expressing single T cell epitopes. *J Immunol*, 156, 2369-2375.
- Clarke, M.C., Kimberlin, R.H.: (1984): Pathogenesis of mouse scrapie: distribution of agent in the pulp and stroma of infected spleens. *Vet Microbiol*, 9, 215-225.
- Cohen, F.E., Pan, K.M., Prusiner, S.B.: (1994): Structural clues to prion replication. *Science*, 264, 530-531.

- Cohen, F, Prusiner, S.B.: (1998): Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biochem*, 67, 793-819.
- Cohen, J.: (2005): Can we selectively shut off immune responses? *Science*, 309, 97.
- Collen, T., Pullen, L.: (1989): T cell-dependent induction of antibody against foot-and-mouth disease virus in a mouse model. *J Gen Virol*, 70 (Ft 2), 395-403.
- Collinge, J.: (2001): Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci*, 24, 519-550.
- Collinge, J.: (1991): Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 337, 1441-1442.
- Collinge, J.: (1995): Transmission of fatal familial insomnia to laboratory animals. *Lancet*, 346, 569-570.
- Collinge, J.: (1994): Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*, 370, 295-297.
- Creutzfeldt, H.G.: (1920): Über eine eigenartige herdformige Erkrankung des Zentral nerven systems. Vorläufige Mitteilung. *Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie*, 57, 1-18.
- Cuille, J., Chelle, P.L.: (1936): La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *C R Acad Sci*, 203, 1552-1554.
- Check, E.: (2002): Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug. *Nature*, 415, 462.
- Chen, S.G., Gambetti, P.: (2002): A journey through the species barrier. *Neuron*, 34, 854-856.
- Chesebro, B.: (2002): Grand ideas floating freely. Conference on the new prion biology: basic science, diagnosis and therapy. *EMBO Rep*, 3, 1123-1126.
- Chesebro, B., Keith, J.M.: (1985): Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*, 315, 331-333.
- Davis, B.S., Chang, G.J., Bunning, M.L.: (2001): West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Virol*, 75, 4040-4047.
- Davis, H.L., Whalen, R.G.: (1995): DNA-based immunization. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser*, 5, 368-387.
- De Marco, P.: (2003): DNA vaccines against HPV-16 E7-expressing tumour cells. *Anticancer Res*, 23, 1449-1454.
- Dealler, S.: (1997): The key must fit: macrophages transport prion infection to the central nervous system and may determine the sites of infection within it. *Med Hypotheses*, 49, 213-220.
- Defaweux, V.: (2005): Interfaces between dendritic cells, other immune cells, and nerve fibres in mouse Peyer's patches: potential sites for neuroinvasion in prion diseases. *Microsc Res Tech*, 66, 1-9.
- Del Val, M.: (1991): Protection against lethal cytomegalovirus infection by a recombinant vaccine containing a single nonameric T-cell epitope. *J Virol*, 65, 3641-3646.
- Deliyannis, G.: (2000): A fusión DNA vaccine that targets antigen-presenting cells increases protection from viral challenge. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 6676-6680.
- Deng, X., Cai, M.: (2003): Mechanism of priming cytotoxic T cell response and strategy for enhancing DNA vaccine potency in DNA immunization. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, 20, 175-179.
- Denzer, K.: (2000): Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J C Sci*, 113 Ft 19, 3365-3374.
- Dickinson, A.G.: (1976): Scrapie in sheep and goats. *Front Biol*, 44, 209-241.
- Djilali-Saiah, I.: (2002): DNA vaccination breaks tolerance for a neo-self antigen in liver: a transgenic murine model of autoimmune hepatitis. *J Immunol*, 169, 4889-4896.
- Doh-ura, K., Sakaki, Y.: (1989): Pro-leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Strausler syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*, 163, 974-979.
- Donnelly, J.J., Liu, M.A., Ulmer, J.B.: (2000): Antigen presentation and DNA vaccines. *Am J Respir Crit Care Med*, 162, S 190-193.
- Donofrio, G.: (2005): Paracrine inhibition of prion propagation by anti-PrP single-chain Fv miniantibodies. *J Virol*, 79, 8330-8338.
- Eklund, C., Hadlow, W.: (1967): Pathogenesis of scrapie virus infection in the mouse. *J Infect Dis*, 117, 15-22.
- Ellgaard, L.: (1999): Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science*, 286, 1882-1888.
- Enari, M.: (2001): Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 9295-9299.
- Endo, T., Prusiner, S.B.: (1989): Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry*, 28, 8380-8388.
- Ertmer, A., Gilch, S.: (2004): The tyrosine kinase inhibitor STI571 induces cellular clearance of PrPSc in prion-infected cells. *J Biol Chem*, 279, 41918-41927.
- Février, B.: (2004) Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 9683-9688.

- Field, E.J., Joyce, G.: (1969): Failure of interferon to modify scrapie in the mouse. *J Gen Virol*, 5, 149-150.
- Fischer, M.: (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *Embo J*, 15, 1255-1264.
- Foster, J.D.: (2001) Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *J Gen Virol*, 82, 2319-2326.
- Foti, M.: (2006): Dendritic cells in pathogen recognition and induction of immune responses: a functional genomics approach. *J Leukoc Biol*, 79, 913-916.
- Fraser, H.: (1970): Pathogenesis of scrapie in the mouse: the role of the spleen. *Nature*, 226, 462-463.
- Fraser, H.: (1987) Ionising radiation has no influence on scrapie incubation period in mice. *Vet Microbiol*, 13, 211-223.
- Frauenfelder, H.: (1991) The energy landscapes and motions of proteins. *Science*, 254, 1598-1603.
- Fujii, S., Senju, S.: (1998) The CLIP-substituted invariant chain efficiently targets an antigenic peptide to HLA class II pathway in L cells. *Hum Immunol*, 59, 607-614.
- Fuller, D.H.: (2006): Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases. *Methods*, 40, 86-97.
- Gabizon, R., Prusiner, S.B.: (1988): Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 6617-6621.
- Gabizon, R., Prusiner, S.B.: (1990): Prion liposomes. *Biochem J*, 266, 1-14.
- Gajdusek, D.C.: (1957): Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med*, 257, 974-978.
- Galloway, D.R., Baillie, L.: (2004): DNA vaccines against anthrax. *Expert Opin Biol Ther*, 4, 1661-1667.
- Ganges, L.: (2005): A DNA vaccine expressing the E2 protein of classical swine fever virus elicits T cell responses that can prime for rapid antibody production and confer total protection upon viral challenge. *Vaccine*, 23, 3741-3752.
- Gerstmann, J.: (1928): Über ein noch nicht beschriebenes Reflex phänomen bei einer Erkrankung des Zerebellaren Systems. *Wien Medizin Wochenschr*, 78, 906-908.
- Gerstmann, J., Straussler, E.: (1936): Über eine eigenartige hereditär familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alters. *Z Neurol*, 154, 736-762.
- Gilch, S.: (2003): Polyclonal anti-PrP auto-antibodies induced with dimeric PrP interfere efficiently with PrPSc propagation in prion infected cells. *J Biol Chem*, 278, 18524-18531.
- Glatzel, M., Aguzzi, A.: (2003): Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med*, 349, 1812-1820.
- Goldfarb, E.G., Rubenstein, R.: (1991a): Creutzfeldt-Jacob disease associated with the PRNP codon 200Lys mutation: an analysis of 45 families. *Eur J Epidemiol*, 7, 477-486.
- Goldfarb, L.G., Gajdusek, D.C.: (1991b): New mutation in scrapie amyloid precursor gene (at codon 178) in Finnish Creutzfeldt-Jakob kindred. *Lancet*, 337, 425.
- Goldfarb, L.G., Pendelbury, W.W.: (1992): Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science*, 258, 806-808.
- Goldgab, E.G., Feinstone, S.M.: (1989): Mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler-Scheinker's syndrome. *Exp Neurol*, 106, 204-206.
- Goldmarm, W.: (1994): PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J Gen Virol*, 75 (Pt 5), 989-995.
- Goni, F., Rubenstein, R., Wisniewski, T.: (2005): Mucosal vaccination delays or prevents prion infection via an oral route. *Neuroscience*, 133, 413-421.
- Gould, S.J., Booth, A.M.: (2003): The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 10592-10597.
- Grégoire, S., Aucouturier, P.: (2004): Identification of two immunogenic domains of the prion protein-PrPn which activate class II-restricted T cells and elicit antibody responses against the native molecule. *J Leukoc Biol*, 76, 125-134.
- Gresser, L., Maury, C.: (1983): Failure to modify scrapie in mice by administration of interferon or anti-interferon globulin. *J Gen Virol*, 64 (Pt 6), 1387-1389.
- Gresser, I.: (1968): An attempt to modify scrapie in mice by the administration of interferon. *J Gen Virol*, 3, 295-297.
- Griffith, J.S.: (1967): Self-replication and scrapie. *Nature*, 215, 1043-1044.
- Haberman, A.M.: (2003): Reassessing the function of immunocomplex retention by follicular dendritic cells. *Nat Rev Immunol*, 3, 757-764.
- Hadlow, W.J.: (1987): Temporal distribution of transmissible mink encephalopathy virus in mink inoculated subcutaneously. *J Virol*, 61, 3235-3240.
- Haik, S., Hauw, J.J.: (2003): The sympathetic nervous system is involved in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Nat Med*, 9, 1121-1123.
- Hammerberg, C.: (1986): Characterization of monoclonal antibodies directed against swine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol*, 11, 107-121.

- Haraguchi, T.: (1989): Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys*, 274, 1-13.
- Harris, D.A. : (1999a): Cell biological studies of the prion protein. *Curr Issues Mol Biol*, 1, 65-75.
- Harris, D.A.: (1999b): Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev*, 12, 429-444.
- Hartl, A., Thalhamer, J.: (2003): Strategies for the development of safe and effective DNA vaccines for allergy treatment. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M*, 279-298; discussion 299.
- Heggebo, R.: (2003): Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol*, 84, 1327-1338.
- Heikenwalder, M., Aguzzi, A.: (2004): Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med*, 10, 187-192.
- Heppner, F., Aguzzi, A.: (2004): Recent developments in prion immunotherapy. *Curr Opin Immunol*, 16, 594-598.
- Heppner, F.L., Aguzzi, A.: (2001a): Transepithelial prion transport by M cells. *Nat Med*, 7, 976-977
- Heppner, F.L., Aguzzi, A.: (2001b): Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science*, 294, 178-182.
- Hermes, J.: (1999): Evidence of presynaptic location and function of the prion protein *J Neurosci*, 19, 8866-75.
- Hilton, D.A.: (2006): Pathogenesis and prevalence of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Pathol*, 208, 134-141.
- Hilton, D.A.: (1998): Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 352, 703-704.
- Hill, A.F.: (2000): Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 10248-10253.
- Hosoi, J.: (1993): Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature*, 363, 159-163.
- Hsiao, K., Prusiner, S.B.: (1989): Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature*, 338, 342-345.
- Hsiao, K.K., Prusiner, S.B.: (1990): Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science*, 250, 1587-1590.
- Huang, F.P.: (2002): Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J Gen Virol*, 83, 267-271.
- Huang, Z., Prusiner, S.B.: (1996): Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Fold Des*, 1, 13-19.
- Hung, C.F.: (2003): Improving DNA vaccine potency via modification of professional antigen presenting cells. *Curr Opin Mol Ther*, 5, 20-24.
- Hurtley, S.M.: (1989): Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol*, 5, 277-307.
- Hutter, G.: (2003): No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo. *Biol Chem*, 384, 1279-85.
- Khalili-Shirazi, A.: (2005): Protein conformantly influences immune responses to prion protein. *J Immunol*, 174, 3256-3263.
- Imazeki, N.: (1992): Is the follicular dendritic cell a primarily stationary cell? *Immunology*, 76, 508-510.
- Ingram, D.K. : (2001): Vaccine development for Alzheimer's disease: a shot of good news. *Trends Neurosci*, 24, 305-307.
- Inoue, H.: (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96, 23-28.
- Ivanova, L.: (2001): Mutant prion proteins are partially retained in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 276, 42409-42421.
- Jakob, A.: (1921a): Übereigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunden (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). Vorläufige Mitteilung. *Deut Z Nervenheilk*, 70, 132-146.
- Jakob, A.: (1921b): Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunden (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie*, 64, 147-228.
- Jakob, A.: (1921c): Über eine der multiplen Sklerose klinisch nahestehende Erkrankung des Zentralnervensystems (spastische Pseudosklerose) mit bemerkenswerten anatomischen Befunden. Mitteilung eines vierten Falles. *Med Klin*, 13, 372-376.
- Janus, C.: (2000): Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1502, 63-75.
- Jeffrey, M.: (2002): Occurrence and distribution of infection-specific PrP in tissues of clinical scrapie cases and cull sheep from scrapie-affected farms in Shetland. *J Comp Pathol*, 127, 264-273.
- Jeffrey, M.: (1995): Pathology of the transmissible spongiform encephalopathies with special emphasis on ultrastructure. *Micron*, 26, 277-298.

- Jeffrey, M.: (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, 534-537.
- Jeffrey, M.: (2000): Sites of prion protein accumulation in scrapie-infected mouse spleen revealed by immuno-electron microscopy. *J Pathol*, 191, 323-332.
- Ji, H., Wang, T.L.: (1999): Targeting human papillomavirus type 16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA vaccines against murine human papillomavirus type 16 E7-expressing tumors. *Hum Gene Ther*, 10, 2727-2740.
- Jiao, J.G.: (2006): A plasmid DNA vaccine encoding the extracellular domain of porcine endoglin induces anti-tumour immune response against self-endoglin-related angiogenesis in two liver cancer models. *Dig Liver Dis*, 38, 578-587.
- Jin, T., Gu, Y.: (2000): The chaperone protein BiP binds to a mutant prion protein and mediates its degradation by the proteasome. *J Biol Chem*, 275, 38699-38704.
- Jobling, M.F.: (2001): Copper and zinc binding modulates the aggregation and neurotoxic properties of the prion peptide PrP 106-126. *Biochemistry*, 40, 8073-8084.
- Kaneider, N.C.: (2005): Neurokinin-1 receptor interacts with PrP (106-126)-induced dendritic cell migration and maturation. *J Neuroimmunol*, 158, 153-158.
- Kaneider, N.C.: (2003): Sphingosine kinase-dependent migration of immature dendritic cells in response to neurotoxic prion protein fragment. *J Virol*, 11, 5535-5539.
- Kapasi, Z.F.: (1993): Induction of functional follicular dendritic cell development in severe combined immunodeficiency mice. Influence of B and T cells. *J Immunol*, 150, 2648-2658.
- Kascsak, R.J.: (1987): Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J Virol*, 61, 3688-3693.
- Kimberlin, R.H.: (1987): Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters. *J Virol*, 68 (Pt 7), 1875-1881.
- Kimberlin, R.H.: (1979): Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain. *J Comp Pathol*, 89, 551-562.
- Kimberlin, R.H.: (1989): The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. *J Gen Virol*, 70 (Pt 8), 2017-2025.
- Kitamoto, T.: (1991): Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol*, 65, 6292-6295.
- Klavinskis, L.S.: (1990): Vaccination and protection from a lethal viral infection: identification, incorporation, and use of a cytotoxic T lymphocyte glycoprotein epitope. *Virology*, 178, 393-400.
- Klein, M.A., Aguzzi, A.: (1997): A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature*, 390, 687-690.
- Klein, M.A., Aguzzi, A.: (2001): Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat Med*, 1, 488-492.
- Kooyman, D.L.: (1998): Glycosyl phosphatidylinositol anchor. *Exp Nephrol*, 6, 148-151.
- Korth, C.: (1997): Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature*, 390, 74-77.
- Kosco-Vilbois, M.: (2003): Are follicular dendritic cells really good for nothing? *Nat Rev Immunol*, 3, 764-769.
- Krasemann, S.: (1996): Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in Pr-PO/O mice. *Mol Med*, 2, 725-734.
- Lasmezas, C.I.: (2003): Putative functions of PrP(C). *Br Med Bull*, 66, 61-70.
- Lasmezas, C.I.: (1997): Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science*, 275, 402-405.
- Leachman, S.A.: (2002): Ubiquitin-fused and/or multiple early genes from cotton tail rabbit papillomavirus as DNA vaccines. *J Virol*, 76, 7616-7624.
- Lee, H.S., Gajdusek, D.C.: (2001): Increased susceptibility to Kuru of carriers of the PRNP 129 methionine/methionine genotype. *J Infect Dis*, 183, 192-196.
- Legname, G., Prusiner, S.B.: (2004): Synthetic mammalian prions. *Science*, 305, 673-676.
- Lehmann, S.: (2002): Metal ions and prion diseases. *Curr Opin Chem Biol*, 6, 187-192.
- Leifert, J.A.: (2004): Targeting plasmid-encoded proteins to the antigen presentation pathways. *Immunol Rev*, 199, 40-53.
- Leitner, W.W.: (2003): Alphavirus-based DNA vaccine breaks immunological tolerance by activating innate antiviral pathways. *Nat Med*, 9, 33-39.
- Lemaire-Vieille, C.: (2000): Epithelial and endothelial expression of the green fluorescent protein reporter gene under the control of bovine prion protein (PrP) gene regulatory sequences in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 5422-5427.
- Li, R., Liu, D.: (2001): The expression and potential function of cellular prion protein in human lymphocytes. *Cell Immunol*, 207, 49-58.

- Liberski, P.P. Gajdusek, D.C.: (1998): A case of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with a Gerstmann-Straussler-Scheinker phenotype but no alterations in the PRNP gene. *Acta Neuropathol (Berl)*, 96, 425-430.
- Lin, K.Y.: (1996): Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res*, 56, 21-26.
- Lipford, G.B.: (1998): Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol*, 6, 496-500.
- Lode, H.N.: (2004): DNA minigene vaccination for adjuvant neuroblastoma therapy. *Ann N Y Acad Sci*, 1028, 113-121.
- Lugaresi, E.: (1986): Familial insomnia with a malignant course: a new thalamic disease. *Rev Neurol (Paris)*, 142, 791-792.
- Luhr, K.M.: (2004): Scrapie protein degradation by cysteine proteases in CD11c+ dendritic cells and GT1-1 neuronal cells. *J Virol*, 78, 4776-4782.
- Luhr, K.M.: (2002): Processing and degradation of exogenous prion protein by CD11c(+) myeloid dendritic cells in vitro. *J Virol*, 76, 12259-12264.
- Mabbott, N.A.: (2001): Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nat Med*, 1, 485-487.
- Mabbott, N.A.: (2000a): Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat Med*, 6, 719-720.
- Mabbott, N.A.: (2006): Prions and their lethal journey to the brain. *Nat Rev Microbiol*, 4, 201-211.
- Mabbott, N.A.: (2002): Temporary blockade of the tumor necrosis factor receptor signaling pathway impedes the spread of scrapie to the brain. *J Virol*, 76, 5131-5139.
- Mabbott, N.A.: (2000b): Tumor necrosis factor alpha-deficient, but not interleukin-6-deficient, mice resist peripheral infection with scrapie. *J Virol*, 74, 3338-3344.
- Mabbott, N.A.: (2003): Follicular dendritic cell differentiation by treatment with an inhibitor of the lymphotoxin pathway dramatically reduces scrapie susceptibility. *J Virol*, 11, 6845-6854.
- Ponti, W., Poli, G.: (2005): Decrease in pathology and progression of scrapie after immunisation with synthetic prion protein peptides in hamsters. *Vaccine*, 23, 2862-2868.
- Maignien, T.: (1999): Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *Virol*, 80 (Pt 11), 3035-3042.
- Maignien, T.: (2005): Role of gut macrophages in mice orally contaminated with scrapie or BSE. *Int J Pharm*, 298, 293-304.
- Malcherek, G.: (1998): MHC class II-associated invariant chain peptide replacement by T cell epitopes: engineered invariant chain as a vehicle for directed and enhanced MHC class II antigen processing and presentation. *Eur J Immunol*, 28, 1524-1533.
- Mallucci, G.: (2003): Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science*, 302, 871-874.
- Mandel, T.E.: (1980): The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. *Immunol Rev*, 53, 29-59.
- Manson, J.: (1992): The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development*, 115, 117-122.
- Manson, J.C.: (1994): Mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA reduction are developmentally normal. *Mol Neurobiol*, 8, 121-127.
- Masel, J.: (2001): The measured level of prion infectivity varies in a predictable way according to the aggregation state of the infectious agent. *Biochim Biophys Acta*, 1535, 164-173.
- Masel, J.: (1999): Quantifying the kinetic parameters of prion replication. *Biophys Chem*, 11, 139-152.
- Mastrianni, J.A., Prusiner, S.B.: (1995): Prion disease (PrP-A117V) presenting with ataxia instead of dementia. *Neurology*, 45, 2042-2050.
- Mattei, V.: (2004): Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation. *FEBS Lett*, 560, 14-18.
- Maxam, A.M.: (1977): A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74, 560-564.
- McBride, P.A.: (1999): Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie. *Neurosci Lett*, 265, 135-138.
- McBride, P.A.: (1992): PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice. *J Pathol*, 168, 413-418.
- McBride, P.A.: (2001): Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol*, 75, 9320-9327.
- McBride, S.M.: (2005): Prion protein: a pattern recognition receptor for viral components and uric acid responsible for the induction of innate and adaptive immunity. *Med Hypotheses*, 65, 570-577.
- Mead, S.: (2003): Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. *Science*, 300, 640-643.
- Medawar, P.B.: (1953): Biological problems of skin surgery. *J Int Chir*, 13, 385-391.
- Medori, R.: (1992): Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med*, 326, 444-449.

- Meier, P., Aguzzi, A.: (2003): Soluble dimeric prion protein binds PrP(Sc) in vivo and antagonizes prion disease. *Cell*, 113, 49-60.
- Meyer-Luehmann, M.: (2006): Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science*, 313, 1781-1784.
- Meyer, R.K., Prusiner, S.B.: (1986): Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 2310-2314.
- Mishra, R.S., Singh, N.: (2004): Protease-resistant human prion protein and ferritin are cotransported across Caco-2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine. *J Neurosci*, 24, 11280-11290.
- Mohan, J.: (2005a): Follicular dendritic cell de-differentiation reduces scrapie susceptibility following inoculation via the skin. *Immunology*, 114, 225-234.
- Mohan, J.: (2005b): Neuroinvasion by scrapie following inoculation via the skin is independent of migratory Langerhans cells. *J Virol*, 79, 1888-1897.
- Mohan, J.: (2005c): Skin-derived dendritic cells acquire and degrade the scrapie agent following in vitro exposure. *Immunology*, 116, 122-133.
- Montrasio, F., Aguzzi, A.: (2000): Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science*, 288, 1257-1259.
- Moore, M.W.: (1988): Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell*, 54, 777-785.
- Moreno, J.: (1991): Processing of an endogenous protein can generate MHC class II-restricted T cell determinants distinct from those derived from exogenous antigen. *J Immunol*, 147, 3306-3313.
- Morgan, D., Arendash, G.W.: (2000): A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*, 408, 982-985.
- Muller, S.: (2005): Testing the possibility to protect bovine PrPC transgenic Swiss mice against bovine PrPSc infection by DNA vaccination using recombinant plasmid vectors harboring and expressing the complete or partial cDNA sequences of bovine PrPC. *Virus Genes*, 30, 279-296.
- Nagata, T.: (2002): Induction of protective immunity to *Listeria monocytogenes* by immunization with plasmid DNA expressing a helper T-cell epitope that replaces the class II-associated invariant chain peptide of the invariant chain. *Infect Immun*, 70, 2676-2680.
- Nagata, T.: (2004): Cytotoxic T lymphocyte and helper T-lymphocyte oriented DNA vaccination. *DNA Cell Biol*, 23, 93-106.
- Nagata, T.: (2001): Immunization with plasmid DNA encoding MHC class II binding peptide/CLIP-replaced invariant chain induces specific helper T cells in vivo: the assessment of I-E p31 and p41 isoforms as vehicles for immunization. *Vaccine*, 20, 105-114.
- Negro, A.: (2001): The metabolism and imaging in live cells of the bovine prion protein in its native form or carrying single amino acid substitutions. *Mol Cell Neurosci*, 17, 521-538.
- Neutra, M.R.: (1996): Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell*, 86, 345-348.
- Nguyen, D.G.: (2003): Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem*, 278, 52347-52354.
- Nicoll, J.A.: (2003): Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med*, 9, 448-452.
- Nikles, D., Aguzzi, A.: (2005): Circumventing tolerance to the prion protein (PrP): vaccination with PrP-displaying retrovirus particles induces humoral immune responses against the native form of cellular PrP. *J Virol*, 79, 4033-4042.
- Nordstrom, E.K.: (2005): Inhibitors of the mitogen-activated protein kinase 1/2 signaling pathway clear prion-infected cells from PrPSc. *J Neurosci*, 25, 8451-8456.
- Orme, I.M.: (2006): Preclinical testing of new vaccines for tuberculosis: a comprehensive review. *Vaccine*, 24, 2-19.
- Oxenius, A.: (2007): Functional in vivo MHC class II loading by endogenously synthesized glycoprotein during viral infection. *J Immunol*, 158, 5717-5726.
- Paillet, R.: (2006): Vaccination against equine influenza: quid novi? *Vaccine*, 24, 4047-4061.
- Palmer, M.S.: (1991): Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature*, 352, 340-342.
- Pan, K.M.: (1993): Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 10962-10966.
- Pardoll, D.: (2003): Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol*, 21, 807-839.
- Parra-Lopez, C.A.: (1997): Presentation on class II MHC molecules of endogenous lysozyme targeted to the endocytic pathway. *J Immunol*, 158, 2670-2679.
- Peretz, D., Prusiner, S.B.: (2001): Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature*, 412, 739-743.
- Perrier, V., Prusiner, S.B.: (2002): Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 13079-13084.

- Perrier, V.: (2004): Anti-PrP antibodies block PrPSc replication in prion infected cell cultures by accelerating PrPc degradation. *J Neurochem*, 89, 454-463.
- Pescovitz, M.: (1985): Murine anti-swine T4 and T8 monoclonal antibodies: distribution and effects on proliferative and cytotoxic T cells. *J Immunol*, 134, 37-44.
- Petersen, R.B.: (1996): Effect of the D178N mutation and the codon 129 polymorphism on the metabolism of the prion protein. *J Biol Chem*, 271, 12661-12668.
- Pisetsky, D.S.: (1996): Immune activation by bacterial DNA: a new genetic code. *Immunity*, 5, 303-310.
- Pocchiari, M.: (1987): Amphotericin B delays the incubation period of scrapie in intracerebrally inoculated hamsters. *J Gen Virol*, 68 (F t 1), 219-223.
- Polymenidou, M., Aguzzi, A.: (2004): Humoral immune response to native eukaryotic prion protein correlates with anti-prion protection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 Suppl 2, 14670-14676.
- Porter, D.D.: (1973): Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice. *J Immunol*, 111, 1407-1410.
- Prinz, M.: (2003a): Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. *Nature*, 425, 957-962.
- Prinz, M., Aguzzi, A.: (2003b): Oral prion infection requires normal numbers of Peyer's patches but not of enteric lymphocytes. *Am J Pathol*, 162, 1103-1111.
- Prinz, M., Aguzzi, A.: (2002): Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 919-924.
- Priola, S.A.: (2000): Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science*, 287, 1503-1506.
- Proske, D.: (2002): Prion-protein-specific aptamer reduces PrPSc formation. *Chembiochem*, 3, 717-725.
- Prud'homme, G.J.: (2005): DNA vaccination against tumors. *J Gene Med*, 7, 3-17.
- Prusiner, S.B.: (1982): Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216, 136-144.
- Prusiner, S.B.: (1991): Molecular biology of prion diseases. *Science*, 252, 1515-1522.
- Prusiner, S.B.: (1993): Genetic and infectious prion diseases. *Arch Neurol*, 50, 1129-1153.
- Prusiner, S.B.: (1997): Prion diseases and the BSE crisis. *Science*, 278, 245-251.
- Prusiner, S.B.: (2001): Shattuck lecture-neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med*, 44, 1516-1526.
- Prusiner, S.B.: (1983): Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*, 35, 349-358.
- Prusiner, S.B.: (1990): Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, 63, 673-686.
- Prusiner, S.B.: (1998): Prion protein biology. *Cell*, 93, 337-348.
- Rapoport, T.A.: (1992): Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science*, 258, 931-936.
- Rescigno, M.: (2001): Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*, 2, 361-367.
- Rhie, A.: (2003): Characterization of 2'-fluoro-RNA aptamers that bind preferentially to disease-associated conformations of prion protein and inhibit conversion. *J Biol Chem*, 278, 39697-39705.
- Riek, R.: (1998): Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 11667-11672.
- Rock, K.L.: (1996): Analysis of the role of MHC class II presentation in the stimulation of cytotoxic T lymphocytes by antigens targeted into the exogenous antigen-MHC class I presentation pathway. *J Immunol*, 156, 3721-3726.
- Rodriguez, F.: (1998): DNA immunization with minigenes: low frequency of memory cytotoxic T lymphocytes and inefficient antiviral protection are rectified by ubiquitination. *J Virol*, 72, 5174-5181.
- Rodriguez, F.: (2001): CD4(+) T cells induced by a DNA vaccine: immunological consequences of epitope-specific lysosomal targeting. *J Virol*, 75, 10421-10430.
- Rodriguez, F.: (2002): Immunodominance in virus-induced CD8(+) T-cell responses is dramatically modified by DNA immunization and is regulated by gamma interferon. *J Virol*, 76, 4251-4259.
- Rodriguez, F.: (2000): Enhancing DNA immunization. *Virology*, 268, 233-238.
- Rodriguez, F.: (1997): DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction. *J Virol*, 71, 8497-8503.
- Rosset, M.B., Aucouturier, P.: (2004): Breaking immune tolerance to the prion protein using prion protein peptides plus oligodeoxynucleotide-CpG in mice. *J Immunol*, 172, 5168-5174.
- Rowell, J.F.: (1995): Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells. *J Immunol*, 155, 1818-1828.
- Sambrook, J.: (1989): Molecular cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanderson, S.: (1995): Expression of endogenous peptide major histocompatibility complex class II complexes derived from invariant chain-antigen fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 7217-7221.

- Sato, Y.: (1996): Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science*, 273, 352-354.
- Schwarz, A.: (2003): Immunisation with a synthetic prion protein-derived peptide prolongs survival times of mice orally exposed to the scrapie agent. *Neurosci Lett*, 350, 187-189.
- Sethi, S.: (2002): Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity. *Lancet*, 360, 229-230.
- Shaked, G.M.: (2003): Dimethyl sulfoxide delays PrP^{sc} accumulation and disease symptoms in prion infected hamsters. *Brain Res*, 983, 137-143.
- Shedlock, D.J.: (2000): DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol*, 68, 793-806.
- Shi, X.J.: (2007): Immune enhancing effects of recombinant bovine IE-18 on foot-and-mouth disease vaccination in mice model. *Vaccine*, 25, 1257-1264.
- Shibuya, S.: (1998): Protective prion protein polymorphisms against sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 351, 419.
- Shortman, K.: (2002): Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*, 2, 151-161.
- Sigurdson, C.J.: (2001): PrP (CWD) in the myenteric plexus, vago sympathetic trunk and endocrine glands of deer with chronic wasting disease. *Virology*, 82, 2327-2334.
- Sigurdson, C.J.: (1999): Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrPres in mule deer fawns (*Odocoileus hemionus*). *J Gen Virol*, 80 (Pt 10), 2757-2764.
- Sigurdsson, B.: (1953): Transmission experiments with maedi. *J Infect Dis*, 93, 166-175.
- Sigurdsson, E.M.: (2002): Immunization delays the onset of prion disease in mice. *Am J Pathol*, 161, 13-17.
- Sigurdsson, E.M.: (2003): Anti-prion antibodies for prophylaxis following prion exposure in mice. *Neurosci Lett*, 336, 185-187.
- Singh, N.: (1997): Prion protein aggregation reverted by low temperature in transfected cells carrying a prion protein gene mutation. *J Biol Chem*, 272, 28461-28470.
- Sotlforosi, L.: (2004): Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science*, 303, 1514-1516.
- Soto, C.: (2005): Pre-symptomatic detection of prions by cyclic amplification of protein misfolding. *FEBS Lett*, 579, 638-642.
- Soto, C.: (2000): Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides. *Lancet*, 355, 192-197.
- Souan, L.: (2001): Modulation of Proteinase-K resistant prion protein by prion peptide immunization. *Eur J Immunol*, 31, 2338-2346.
- Sparrer, H.E.: (2000): Evidence for the prion hypothesis; induction of the yeast [PSI⁺] factor by in vitro converted Sup35 protein. *Science*, 289, 595-599.
- Stahl, N., Prusiner, S.B.: (1987): Scrapie prion protein contains a phosphatidyl inositol glycolipid. *Cell*, 51, 229-240.