

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Funciones de la proteína priónica celular, α-sinucleína y reelina en enfermedades neurodegenerativas

Laura Urrea Zazurca

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (**www.tdx.cat**) i a través del Dipòsit Digital de la UB (**diposit.ub.edu**) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza u reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (**www.tdx.cat**) service and by the UB Digital Repository (**diposit.ub.edu**) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

FUNCIONES DE LA PROTEÍNA PRIÓNICA CELULAR, α-SINUCLEÍNA Y REELINA EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Memoria presentada por la licenciada en Biotecnología, Laura Urrea Zazurca, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona.

Esta tesis ha sido inscrita dentro del programa de doctorado en Biomedicina de la Universidad de Barcelona. El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados en el Instituto de Bioingeniería de Cataluña, bajo la dirección del Dr. José Antonio del Río Fernández, Catedrático de Biología Celular del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Barcelona.

Barcelona, 2018.

Dr. José Antonio del Río Fernández

Laura Urrea Zazurca

Director y tutor de la Tesis

La doctoranda

"Somewhere, something incredible is waiting to be known."

- Carl Sagan

A mis padres, hermana e Ivan

ÍNDICE

| ÍNDICE7 |
|---|
| LISTA DE ABREVIATURAS11 |
| PRÓLOGO13 |
| INTRODUCCIÓN15 |
| 1. La enfermedad de Parkinson17 |
| 1.1. Reseña histórica17 |
| 1.2. Epidemiología y sintomatología18 |
| 1.3. Alteraciones neuropatológicas19 |
| 1.3.1. Afectación de la glía21 |
| 1.4. Estadios de la enfermedad de Parkinson21 |
| 1.4.1. α-sinucleína en el sistema nervioso periférico23 |
| 1.5. Etiología |
| 1.5.1. Factores de riesgo no genéticos24 |
| 1.5.2. Factores de riesgo genéticos24 |
| 1.6. Estructura de α -sinucleína27 |
| 1.6.1. Modificaciones postraduccionales28 |
| 1.7. La función fisiológica de $lpha$ -sinucleína |
| 1.8. Agregación y propagación "prion-like" de $lpha$ -sinucleína |
| 1.8.1. La agregación de α -sinucleína |
| 1.8.2. Propagación "prion-like" de α-sinucleína33 |
| 1.9. Modelos experimentales de la EP 39 |
| 2. La proteína priónica celular42 |
| 2.1. Reseña histórica 42 |
| 2.2. Las prionopatías 43 |
| 2.2.1. Enfermedades priónicas en humanos44 |
| 2.3. Gen <i>PRNP</i> |
| 2.4. Estructura de la proteína priónica celular (PrP ^c)46 |
| 2.5. Biosíntesis de PrP ^c |
| 2.5.1. Procesamiento proteolítico |
| 2.5.2. Topología |
| 2.5.3. Endocitosis e internalización50 |

| 2.6. Interacción con otras proteínas51 |
|---|
| 2.7. Funciones fisiológicas |
| 2.8. Isoformas del gen PRNP54 |
| 2.8.1. La hipótesis del prión54 |
| 2.8.2. Modelos de conversión de PrP ^c a PrP ^{sc} 56 |
| 2.9. Modelos murinos de PrP ^c 57 |
| 3. Reelina61 |
| 3.1. Descripción general61 |
| 3.2. Reelina en el desarrollo62 |
| 3.3. Reelina en adulto63 |
| 3.4. Reelina en neurodegeneración65 |
| OBJETIVOS |
| RESULTADOS |
| Capítulo I:77 |
| Involvement of Cellular Prion Protein in α -Synuclein Transport in Neurons |
| Capítulo II: |
| Disease-specific changes in Reelin protein and mRNA in the neocortex and cerebrospinal |
| |
| fluid in neurodegenerative dementias99 |
| fluid in heurodegenerative dementias |
| fluid in neurodegenerative dementias 99 Capítulo III: 113 Reelin Expression in Creutzfeldt-Jakob Disease and Experimental Models of Transmissible 113 Spongiform Encephalopathies 113 RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN 131 1. Papel de la PrP^c en la propagación de α-sinucleína 133 1.1 La transmisión de α-sinucleína depende de la expresión de PrP ^c in vivo e in vitro 133 1.1.1. Participación del dominio glicosilfosfatidilinositol de PrP ^c en el transporte de α-sinucleína 137 1.1.2. Transporte de α-sinucleína humana dependiente de PrP ^c humana 139 1.2. Interacción de PrP ^c y α-sinucleína 141 |
| Capítulo III: 113 Reelin Expression in Creutzfeldt-Jakob Disease and Experimental Models of Transmissible 113 Spongiform Encephalopathies 113 RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN 131 1. Papel de la PrP ^c en la propagación de α-sinucleína 133 1.1 La transmisión de α-sinucleína depende de la expresión de PrP ^c in vivo e in vitro 133 1.1.1. Participación del dominio glicosilfosfatidilinositol de PrP ^c en el transporte de α-sinucleína 137 1.1.2. Transporte de α-sinucleína humana dependiente de PrP ^c humana 139 1.2. Interacción del dominio central cargado de PrP ^c 141 1.2.1. Participación del dominio central cargado de PrP ^c 142 |
| Fluid in neurodegenerative dementias |
| Fluid in neurodegenerative dementias 99 Capítulo III: 113 Reelin Expression in Creutzfeldt-Jakob Disease and Experimental Models of Transmissible 113 Spongiform Encephalopathies 113 RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN 131 1. Papel de la PrP^c en la propagación de α-sinucleína 133 1.1 La transmisión de α-sinucleína depende de la expresión de PrP ^c in vivo e in vitro 133 1.1.1. Participación del dominio glicosilfosfatidilinositol de PrP ^c en el transporte de α-sinucleína 137 1.1.2. Transporte de α-sinucleína humana dependiente de PrP ^c humana 139 1.2. Interacción del dominio central cargado de PrP ^c 141 1.2.1. Participación del dominio central cargado de PrP ^c 142 2. Reelina en enfermedades neurodegenerativas 146 2.1. Expresión de Reelina en prionopatías 146 |
| Tiuld in neurodegenerative dementias |
| Tiuld in neurodegenerative dementias 99 Capítulo III: 113 Reelin Expression in Creutzfeldt-Jakob Disease and Experimental Models of Transmissible 113 Spongiform Encephalopathies 113 RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN 131 1. Papel de la PrP^c en la propagación de α-sinucleína 133 1.1 La transmisión de α-sinucleína depende de la expresión de PrP ^c in vivo e in vitro 133 1.1.1. Participación del dominio glicosilfosfatidilinositol de PrP ^c en el transporte de α-sinucleína 137 1.1.2. Transporte de α-sinucleína humana dependiente de PrP ^c humana 139 1.2. Interacción del dominio central cargado de PrP ^c 142 1.2.1. Participación del dominio central cargado de PrP ^c 142 2.1. Expresión de Reelina en prionopatías 146 2.1.1. La fosforilación de Dab1 no correlaciona con el aumento de Reelina en prionopatías 146 2.1.2 Niveles de Reelina en CID y medelos de EETc 142 |
| Tiuid in neurodegenerative dementias 99 Capítulo III: 113 Reelin Expression in Creutzfeldt-Jakob Disease and Experimental Models of Transmissible 113 Spongiform Encephalopathies 113 RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN 131 1. Papel de la PrP^c en la propagación de α-sinucleína 133 1.1 La transmisión de α-sinucleína depende de la expresión de PrP ^c in vivo e in vitro 133 1.1.1. Participación del dominio glicosilfosfatidilinositol de PrP ^c en el transporte de α-sinucleína 137 1.1.2. Transporte de α-sinucleína humana dependiente de PrP ^c humana 139 1.2. Interacción del dominio central cargado de PrP ^c 142 2. Reelina en enfermedades neurodegenerativas 146 2.1.1. La fosforilación de Dab1 no correlaciona con el aumento de Reelina en prionopatías 146 2.1.2. Niveles de Reelina en CJD y modelos de EETs 148 |

| BIBLIOGRAFÍA | 155 |
|--|-----|
| ANEXO I | 183 |
| INFORME DEL FACTOR DE IMPACTO | 185 |
| ANEXO II | 187 |
| INFORME DE PARTICIPACIÓN | 189 |
| ANEXO III | 191 |
| Extra View – The cellular prion protein (PrP ^c) as neuronal receptor for α -synuclein | 193 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| ADAM | Del inglés a desintegrin and metalloprotease |
|--------|---|
| АКТ | Proteína quinasa B |
| AMPA | Del inglés α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid |
| APLP1 | Del inglés amyloid precursor-like protein |
| АроЕ | Apolipoproteína E |
| ApoER2 | Del inglés apolipoprotein E receptor 2 |
| APP | Proteína precursora amiloide |
| СС | Cluster de carga |
| CD | Dominio central, del inglés central domain |
| Cdk5 | Quinasa dependiente de ciclina 5 |
| CJD | Del inglés Creutzfeldt-Jakob disease |
| DLB | Demencia por cuerpos de Lewy |
| EA | Enfermedad de Alzheimer |
| Edbg | Cepa de ratón Edinburgh |
| EETs | Enfermedades espongiformes transmisibles |
| EP | Enfermedad de Parkinson |
| ERK | Del inglés extracelular-regulated kinases |
| FTD | Del inglés frontotemporal dementia |
| GABA | Del inglés Gamma-Aminobutyric acid |
| GFAP | Del inglés glial fibrillary acidic protein |
| GPI | Glicosilfosfatidilinositol |
| GSK3 | Glucógeno sintasa quinasa 3 |
| GSS | Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker |
| HPRT | Hipoxantina fosforribosil transferasa |
| HR | Del inglés hydrophobic region |
| JNK | Del inglés c-jun N-terminal kinases |
| ко | Del inglés Knockout |
| LCR | Líquido cefalorraquídeo |
| loxP | Secuencia derivada del bacteriófago P1 |
| LTD | Del inglés long term depression |
| | |

| LTP | Del inglés long term potentiation |
|-------------------|---|
| mGluR | Receptor de glutamato metabotrópico |
| mRNA | RNA mensajero |
| MSA | Del inglés multiple system atrophy |
| neo | Casete de expression de la fosfotransferasa de neomicina |
| NMDA | Del inglés N-methyl-D-aspartate |
| NMDAR | Receptor de NMDA |
| Ngsk | Cepa de ratón Nagasaki |
| OR | Del inglés octarepeat |
| PI3K | Fosfoinositol 3 quinasa |
| PrP ^c | Proteína priónica celular |
| PrP ^{sc} | Proteína priónica scrapie |
| PSD | Del inglés postsynaptic density |
| RE | Retículo endoplasmático |
| RNA | Del inglés ribonucleic acid |
| ROS | Del inglés reactive oxygen species |
| RTqPCR | Del inglés real time quantitative polymerase chain reaction |
| sCJD | Del inglés sporadic Creutzfeldt-Jakob disease |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SVZ | Del inglés subventricular zone |
| ТАТ | Transactivador de la transcripción génica |
| vCJD | Del inglés variant Creutzfeldt-Jakob disease |
| VLDL | Del inglés very-low-density lipoprotein |
| WT | Del inglés wild type |
| ZH1 | Zurich 1 |
| ZH3 | Zurich 3 |

PRÓLOGO

Esta tesis fue iniciada a principios del año 2015 en el Instituto de Bioingeniería de Catalunya (IBEC). Forma parte de una línea de investigación llevada a cabo por el Dr. José Antonio del Río Fernández, centrada en conocer el papel de la proteína priónica celular (PrP^{C}) en la patología de la enfermedad de Parkinson (EP). Esta línea ha permitido el estudio de la propagación de α -sinucleína en modo dependiente a los niveles de expresión de PrP^{c} . α -Sinucleína es la principal proteína presente en los agregados del cerebro en la EP. Además de este estudio, se ha analizado la expresión de Reelina en diversas enfermedades neurodegenerativas.

En el momento de iniciar este trabajo, se conocía la participación de PrP^{c} en la enfermedad de Alzheimer (EA). Se había descrito que las β - y γ -secretasas están involucradas en la formación de la proteína β -amiloide a partir del procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP). El β -amiloide oligomeriza y se puede unir a PrP^{c} . Sin embargo, se desconocía la posible participación de PrP^{c} en la EP. Por otro lado, a pesar de que Disabled1 (Dab1) forma parte de la cascada de señalización de Reelina no se había profundizado en los cambios de expresión de Reelina en diversas enfermedades neurodegenerativas.

Esta tesis se estructura en torno a dos publicaciones derivadas de la investigación realizada durante los últimos 3 años, junto con un trabajo en preparación. La introducción de esta Tesis resume la información existente sobre la enfermedad de Parkinson. También se describe el papel de la PrP^c a nivel fisiológico y su participación en las enfermedades priónicas. Por último, se da a conocer la función de Reelina en algunas enfermedades neurodegenerativas. Los resultados de los trabajos experimentales se presentan de forma resumida y se discuten de forma conjunta en un capítulo final.

INTRODUCCIÓN

1. La enfermedad de Parkinson

1.1. Reseña histórica

James Parkinson (1755-1824), médico inglés, describió en 1817 la *Parálisis Agitans* como un síndrome que provocaba temblor involuntario, tendencia a encorvar el cuerpo hacía delante y cambios de ritmo al andar, sin embargo, los sentidos y la inteligencia no sufrían alteraciones. James Parkinson describe un síndrome de larga duración que con el tiempo se agraba, por este motivo los pacientes requerían una observación continua a lo largo de los años.

Fue Parkinson quien observó a seis hombres de mediana edad que manifestaban los mismos síntomas, aunque cada uno de ellos había tenido experiencias distintas en el curso de la vida. Dado el poco conocimiento sobre la naturaleza y causa del síndrome, cada paciente era importante para poder encontrar el origen y poder tratar los síntomas (Parkinson, 2002). Parkinson a lo largo de su trabajo estudió los casos de seis varones que padecían temblores. Intentó buscar un punto en común en sus hábitos o vida para conocer la posible causa del síndrome. Sesenta años después fue Jean-Marie Charcot (1825-1893), médico francés, quién rebautizó este síndrome llamándolo, la enfermedad de Parkinson (EP). Charcot fue, probablemente, el primero en sugerir el uso de medicinas anticolinérgicas para el temblor de la EP (Goetz, 2009).

En Alemania, el neurólogo Friedrich Heinrich Lewy (1885-1950) (Figura 1), publicó en el Manual de Neurología (1912) la presencia de unos agregados anormales, llamados cuerpos de Lewy (LB, del inglés Lewy body), que afectaban varias zonas cerebrales en la EP.

Más tarde, se identificó agregados de α -sinucleína más allá del sistema nervioso central (SNC). En 1923, Herzog describió estos mismos agregados en los ganglios simpáticos (Herzog, 1928) y a finales de 1980 se observó agregados de α -sinucleína en el plexo del intestino (Kupsky et al., 1987). Además, la presencia de agregados de α -sinucleína en el sistema nervioso periférico no necesariamente da lugar a la manifestación de síntomas parkinsonianos (Hague et al., 1997).



Figura 1. Investigadores en Alemania, 1910. Miembros del grupo Alois Alzheimer, quien describió la enfermedad de Alzheimer. Fritz Jakob Heinrich Lewy (marcado en círculo) quien describió los LB (Goedert et al., 2013).

1.2. Epidemiología y sintomatología

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la enfermedad de Alzheimer (EA). En zonas industrializadas la prevalencia de la enfermedad está estimada en 0.3% de toda la población, este porcentaje aumenta con la edad. En personas mayores de 60 años, alrededor de 10 (< 1% del total poblacional) millones de personas en el mundo la padecen, y en los mayores de 80 años, el 3-4% padecen la EP (Nussbaum and Ellis, 2003).

El diagnóstico de la EP se basa principalmente en el estudio de los síntomas, los antecedentes familiares, el examen físico y realizando estudios de neuroimagen y biomarcadores. Gracias a la resonancia magnética se puede determinar la presencia de gliosis, desmielinación y la pérdida neuronal en la sustancia nigra (SN) (Reimao et al., 2015, Heim et al., 2017). Por otro lado, varios estudios procuran encontrar un biomarcador específico de dicha enfermedad. Las principales proteínas alteradas que se detectan en el LCR de pacientes son Tau total, Tau fosforilada, α -sinucleína y el péptido β -amiloide entre otras (Shi et al., 2011). La confirmación histopatológica se realiza a post-mortem.

Clínicamente, los síntomas suelen ser motores como el temblor involuntario, la rigidez muscular, la lentitud de los movimientos y la inestabilidad postural. Estos síntomas aparecen, generalmente, primero en un lado del cuerpo y gradualmente se trasmiten al otro lado. No obstante, aunque la EP se considere una enfermedad motora, también presenta síntomas no motores, los cuales pueden manifestarse mucho antes de los síntomas motores. Estos son hipósmia, depresión, estreñimiento y alteraciones posturales acompañado de problemas para la conciliación del sueño, estos síntomas pueden ser importantes para diagnosticar la enfermedad en los estadios tempranos (Tolosa et al., 2009, Tolosa and Poewe, 2009). Con el progreso de la enfermedad, aparecen dolores, incontinencia urinaria y manifestaciones neuropsiquiátricas como la depresión, alucinaciones y la demencia. Estas características pueden ser debido a la propagación de la patología a otras zonas del cerebro (Langston, 2006, Chaudhuri and Schapira, 2009). Además aproximadamente un 65 % de los casos de EP también muestran demencia.

A día de hoy no disponemos de un tratamiento eficaz capaz de detener el progreso neurodegenerativo y el déficit clínico de la EP. Los sustitutos de la dopamina como la levodopa se usan para el tratamiento farmacológico de los síntomas motores de la EP. Sin embargo, la levodopa no siempre es eficiente para todos los casos. Hay algunos pacientes que presentan mejoría de los síntomas motores, sin embargo, meses e incluso años después el efecto de la levodopa desaparece paulatinamente (Yahr et al., 1969, Tomlinson et al., 2010). Otro tratamiento empleado es la estimulación cerebral en áreas profundas (DBS, del inglés deep brain stimulation). En la EP se estimula el núcleo subtalámico mediante la implantación de electrodos que envían impulsos eléctricos. Mediante esta estimulación hay una mejora de la disquinesia. Incluso, hay pacientes que pueden mantener esta terapia durante un largo periodo de tiempo (Valldeoriola et al., 2002).

1.3. Alteraciones neuropatológicas

La EP se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SN pars compacta y en la existencia de agregados intracelulares insolubles en distintas zonas cerebrales (Figura 2).



Figura 2. Características neuropatológicas de la EP. Izquierda, representación de la SN que está compuesta de neuronas dopaminérgicas. En el sujeto sano, se muestra la pigmentación normal de la SN, producida por la neuromelanina. En el caso del enfermo de Parkinson se observa la despigmentación de la sustancia nigra, a causa de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas que contienen neuromelanina. Derecha, LB en una neurona de la SN (Taipa et al., 2012).

La SN proyecta sus axones dopaminergicos no mielinizados al estriado, formado por el núcleo caudado y el putamen. Los enfermos de Parkinson presentan una pérdida del 70-80% de las neuronas dopaminérgicas de la SN en estudios post-mortem. (Dauer and Przedborski, 2003).

Además de la degeneración nigrostriatal, los agregados de proteínas intraneuronales pueden encontrarse en el soma de la célula o en las neuritas, así reciben el nombre de LB o neuritas de Lewy (LN, del inglés Lewy neurite), respectivamente. Los LB son unos cuerpos esféricos eosinofílicos de 8-30 µm de diámetro (Pappolla, 1986). Los LB presentan un centro denso esfério y un halo claro. Una alteración neuronal relacionada con los LB son los "pale body", que inmunologicamente son bastante parecidos a los LB. Algunos estudiós han sugerido que los "pale body" pueden constituir un precursor de los LB {Greenfield, 2008 #1225}.

El mayor componente de los LB es la proteína α -sinucleína que presenta una estructura fibrilar rica en hojas plegadas β (Forno, 1996, Spillantini et al., 1997, Spillantini et al., 1998b). La α -sinucleína se encuentra, de forma natural, enriquecida en los terminales presinápticos, por lo tanto, encontrar α -sinucleína agregada en el citoplasma es una localización aberrante de la proteína. La α -sinucleína presenta varias modificaciones postraduccionales, las cuales podrían estar implicadas en su agregación (Fujiwara et al., 2002, Li et al., 2005). No obstante, los LB no están formados de manera exclusiva por α -sinucleína sino que, además, hay muchas más proteínas descritas como la ubiquitina (Lowe et al., 1988), los neurofilamentos (Galvin et al., 1999), DJ-1 (Jin et al., 2005), Tau (Ishizawa et al., 2003), tirosina hidroxilasa (Nakashima and Ikuta, 1984) y también lípidos (Gai et al., 2000), entre una larga lista de otros componentes descritos. En cambio, en los LN se ha descrito acumulación de α -sinucleína y ubiquitina (Dickson, 2012).

Los LB se encuentran en varias zonas cerebrales como el nucleus basalis de Meynert, núcleo del rafe, locus coeruleus y la SN (Pappolla et al., 1988, Dale et al., 1992). En estadios más avanzados de la enfermedad también pueden localizarse en medula espinal, diencéfalo, corteza frontal, amígdala, bulbos olfativos y en corteza límbica (Dickson et al., 2009). Los agregados enriquecidos en α -sinucleína también se han identificado en el sistema nervioso autonómico, incluyendo el plexo axonal del tracto gastrointestinal, ganglios autonómicos paravertebrales, en los nervios simpáticos de las glándulas suprarrenales y del corazón, y en los nervios cutáneos (Dickson et al., 2009), pero en muestras post-mortem no se ha detectado pérdida celular en estas regiones (Sulzer and Surmeier, 2013).

Las inclusiones de α -sinucleína definen un conjunto de enfermedades denominada genéricamente α -sinucleinopatias. La EP y la demencia por cuerpos de Lewy (DLB), en la cual hay un deterioro cognitivo más rápido, son enfermedades que presentan

agregados en neuronas mientras que la atrofia multisistémica (MSA) presenta agregados, mayoritariamente en glía (Braak and Del Tredici, 2008, Lashuel et al., 2013). Los LB también pueden aparecer en la EA (Hansen et al., 1990) y en personas de edad avanzada que no manifiestan ninguna sintomatología de EP (Gibb and Lees, 1988, Dickson et al., 2008).

Aunque hay datos contradictorios sobre la participación de los LB o LN en la patogénesis de la EP, se ha relacionado la autofagia con la formación de los LB. En neuronas sanas, α -sinucleína se degrada por macroautofagia y autofagia dependiente de chaperonas (Cuervo et al., 2004, Vogiatzi et al., 2008, Son et al., 2012). La autofagia es un proceso necesario para renovar proteínas y orgánulos célulares mediante la concurrencia de lisosomas. La sobreexpresión o la presencia de mutaciones en α -sinucleína alteran el proceso autofágico contribuyendo al proceso neurodegenerativo. Sin embargo, todavía existe una gran controversia sobre si el aumento de la autofagia en neuronas de pacientes parkinsonianos es una causa directa del proceso de degradación o si, por el contrario, juega un papel protector degradando las formas aberrantes de α -sinucleína (Son et al., 2012)

1.3.1. Afectación de la glía

Dado que los oligómeros de α -sinucleína también pueden ser internalizados por la glía, se han descrito la presencia de células gliales con acúmulos de α -sinucleína en varias regiones cerebrales en la EP. En este sentido, las células gliales son también capaces de endocitar y degradar de forma más eficiente los agregados de α -sinucleína sintéticos recombinantes que las neuronas (Lee et al., 2008b). Se ha descrito que los oligodendrocitos de la SN y del tálamo presentan inclusiones de α -sinucleína. También, los astrocitos del tronco del encefálo muestran altos niveles de acumulaciones de α -sinucleína (Saint-Cricq et al., 2017).

Por otro lado, Braak *et al.*, usando anticuerpos contra la zona no amiloidogénica de la proteína α -sinucleína identificó astrocitos activados en estadio IV de Braak en la EP, en varias regiones, amígdala, tálamo, septum, estriado y corteza (Cavaliere et al., 2017). La secreción de α -sinucleína por las neuronas no solo induce toxicidad en el citoplasma de la siguiente neurona, sino que también genera toxicidad en el espacio extracelular, donde se puede activar la glía e inducir inflamación, contribuyendo así, a la evolución de la EP.

1.4. Estadios de la enfermedad de Parkinson

El proceso neuropatológico de la EP afecta otras áreas del cerebro, y no solo la SN donde hay una gran pérdida de neuronas dopaminérgicas. Braak y sus compañeros se pudieron aprovechar de las nuevas técnicas de tinción, sobretodo de la histoquímica de la α -sinucleína, que permitía optimizar la visualización tanto de los LB y como de las

LN. Estos investigadores estudiaron los cerebros de individuos que no manifestaban la EP a lo largo de la vida, pero sí que presentaban una patología por LB, además estudiaron cerebros de pacientes de la EP a distintos estadios de la patología y concluyeron que la enfermedad empezaba en el bulbo olfativo y en el tronco encefálico, solo al llegar a los estadios intermediarios de la patología el sistema nigrostriatal se veía afectado. En 2003, Braak et al. sugieren la posibilidad que la EP esporádica muestre una progresión en seis estadios, según las zonas cerebrales donde se acumula α -sinucleína (Braak et al., 2003) (Figura 3).



Figura 3. La EP presenta seis estadios. La EP encaja dentro de uno de estos seis estadios según las zonas cerebrales afectadas. A) Progresión rostocaudal de la patología (flechas). Refleja la progresión de la enfermedad y el aumenta de la severidad de la patología. B) Estadio 1: las lesiones se encuentran en el bulbo olfativo, el núcleo anterior olfativo y/o en el núcleo motor dorsal del nervio vago y glosofaríngeo del tronco encefálico. Estadio 2: las inclusiones de α -sinucleína se observan en el tegmentum pontine, que se constituye por locus coeruleus, núcleo magnocelular de la formación reticular y núcleo rafe. C) Estadios 3: las inclusiones alcanzan el núcleo pedunculopontine, el núcleo magnocelular colinérgico del preencéfalo basal y la sustancia nigra pars compacta. Estadio 4: el hipotálamo, zonas del tálamo y la primera zona cortical, mesocorteza temporal anteromedial se ven afectados. Durante el estadio 3 y 4 aparecen los primeros síntomas clínicos de la EP. D) Estadio 5 y 6: se ven afectadas áreas de la neocorteza (Goedert et al., 2013).

En el primer estadio, se encuentran las inclusiones de α -sinucleína en el núcleo motor dorsal y/o la zona intermediaria reticular. En el segundo estadio, las inclusiones llegan al núcleo caudal rafe, núcleo reticular gigantocelular y al locus coeruleus o subcoeruleus. En el estadio tres, abarca el mesencéfalo y la sustancia nigra pars compacta. En el estadio cuatro, el prosencéfalo y la zona cortical, mesocortex temporal y alocorteza presentan los agregados de α -sinucleína. En el quinto estadio, se ve afectado la neocorteza prefrontal y las áreas sensoriales de la neocorteza. En el último estadio, el seis, hay acumulaciones en áreas premotoras, incluso la corteza motora y en todas las áreas sensoriales de la neocorteza (Goedert et al., 2013).

En el estadio uno y dos, los individuos que padecen la EP no acostumbran a ser diagnosticados pero exhiben típicos síntomas no motores de la EP, como la hiposmia y

estreñimiento. Aunque se desconoce si estos pacientes después desarrollan la EP. Al estadio tres, es cuando los pacientes se diagnostican clínicamente. Durante el estadio 5 y 6, las zonas afectadas están implicadas en el declive intelectual que se acostumbra a presentar en fases avanzadas de la EP (Braak et al., 2003). Esto demuestra que las inclusiones de α -sinucleína en la EP empiezan a generarse mucho tiempo antes de la aparición de los primeros síntomas motores. Ahora, se conoce que los síntomas no motores normalmente son un signo de la posible aparición de síntomas motores típicos de la EP, estos síntomas no motores suelen ser el deterioro del sentido del olfato y la disfunción del sistema autonómico. Aunque hay otros casos de Parkinson que no siguen esta progresión.

1.4.1. α-sinucleína en el sistema nervioso periférico

Según Braak, la EP puede originarse más allá del sistema nervioso central por un patógeno capaz de llegar al cerebro por un transporte retrogrado axonal y propagándose entre distintas neuronas, α -sinucleína podría ser este patógeno. De hecho, los agregados de α -sinucleína son abundantes en el sistema periférico nervioso autónomo en pacientes que presentan α -sinucleinopatias. En la EP, los ganglios simpáticos, el nervio vago, el tracto gastrointestinal, las glándulas suprarrenales, la grasa y el corazón se encuentran afectados con agregados de α -sinucleína (Gelpi et al., 2014).

A parte de los estudios realizados con inoculaciones intracraneales en animales para estudiar la agregación y transmisión de α -sinucleína, también se han realizado estudios inyectando fibras de α -sinucleína en el sistema nervioso periférico. Así, se observa que los agregados de α -sinucleína en el sistema neriovos periférico pueden llegar al SNC y formar agregados cerebrales. Se ha publicado la inoculación intraperitoneal e intraglosal de fibras de α -sinucleína en animales WT y transgénicos que expresan la mutación A53T de α -sinucleína. En animales WT, la inoculación intraglosal no genera acumulación de α -sinucleína en el cerebro, mientras que ambas zonas de inoculación en animales que expresan la mutación A53T termina generando agregados de α sinucleína cerebrales (Breid et al., 2016). También, en el trabajo de Masuda-Suzukake et al., se describe la administración intranasal de α -sinucleína derivada de pacientes LBD, lo cual no genera agregados en el cerebro (Masuda-Suzukake et al., 2013).

1.5. Etiología

La mayoría de los casos de Parkinson corresponden al tipo esporádico, aunque existen factores genéticos y factores no genéticos que pueden desencadenar la sintomatología de la enfermedad.

1.5.1. Factores de riesgo no genéticos

El principal factor de riesgo para padecer la EP es la edad avanzada. Aunque, entre un cerebro sano y uno afectado por la EP pueden encontrarse similitudes. El caso sano también pueden generar acumulaciones anómalas de proteínas y pérdida de volumen cerebral pero no tan severas como en los enfermos de Parkinson.

También se ha descrito la exposición a los pesticidas, beber agua de pozos y el daño cerebral como circunstancias que aumentan el riesgo de padecer la EP. Además, según las estadísticas los hombres tienen el 50% más de probabilidad que las mujeres de padecer la EP (Kieburtz and Wunderle, 2013).

1.5.2. Factores de riesgo genéticos

Gen de la α-sinucleína (SNCA)

El gen *SNCA*, está situado en el cromosoma 4 (4q21), comprende 6 exones y codifica la proteína α -sinucleína que se encuentra en los terminales presinápticos. Aunque la función exacta que realiza α -sinucleína no se conoce del todo, recientemente se ha descrito su interacción con las membranas y los lípidos. Hay hasta 18 mutaciones descritas para el gen *SNCA*, las tres más comunes son A53T, A30P y E64K, las cuales son autosómicas dominantes (Figura 4). No solo las mutaciones en el gen *SNCA* pueden dar una forma aberrante de la proteína α -sinucleína sino que también duplicados o triplicados del gen, que conducen a un exceso de α -sinucleína, pueden generar agregados que provocan daños neuronales (Corti et al., 2011).





La mutación A53T es la mutación más común del gen *SNCA*, se encuentra en la posición 209, cambio de guanina por adenina, en el exón 4. Este cambió de aminoácidos es capaz de interferir absolutamente en la estructura de la proteína, generando estructuras en hoja β , por lo tanto, puede estar involucrada en la propia agregación de la proteína (Athanassiadou et al., 1999). Ha sido identificada en una familia Italiana, ocho familias Griegas, dos Coreanas y una familia Sueca, clínicamente, estos pacientes tienen un fenotipo muy variado que puede manifestarse en edades avanzadas o de forma severa en la juventud, con una progresión rápida, demencia y problemas psiquiátricos (Polymeropoulos et al., 1997, Ki et al., 2007, Puschmann et al., 2009, Corti et al., 2011).

La mutación A30P, se encuentra en el exón 3, y es el resultado del cambio en la posición 88 de una guanina por una citosina. Así, resulta en una proteína anómala que pierde su primer dominio en hélice α y reduce si afinidad por los fosfolípidos (Yonetani et al., 2009). Esta mutación se ha encontrado en una familia Alemana que manifiestan un Parkinsonismo en edades avanzadas (Kruger et al., 1998).

La mutación E64K, se encuentra en la posición 188, y genera el cambio de una guanina a adenina, en el exón 3. La estructura final de esta proteína expone su dominio hidrofóbico a la superficie, aumentando las interacciones moleculares y alterando las uniones a los fosfolípidos (Rospigliosi et al., 2009). Se ha identificado en una familia Española, muestran un fenotipo de demencia por LB que se manifiesta a edades muy tempranas (Zarranz et al., 2004).

Gen de la dardarina (LRRK2)

Se encuentra en el cromosoma 12 (12q12) contiene 51 exones y codifica para la proteína quinasa LRRK2 (del inglés leucine-rich repeat kinase 2) o también llamada dardarina. LRRK2 tiene una secuencia quinasa definida y un dominio proteico Ras (ROC, del inglés Ras-of-complex) que se une e hidroliza el guanosín trifosfato (GTP). Tiene un dominio carboxilo terminal (COR, del inglés C-terminal of Ras) y una secuencia rica en leucinas. Así, LRRK2 tiene una actividad quinasa y GTPasa. Participa en la señalización celular, está asociada a las vesículas, incluyendo endocíticas e implicadas en la autofagia. Además, tanto físicamente como genéticamente, LRRK2 interactúa con otras proteínas implicadas en la EP (Martin et al., 2014, Cookson, 2015).

Se han identificado más de cien mutaciones del gen LRRK2 causantes de la enfermedad, en todas las familias se observa una herencia autosómica dominante de Parkinsonismo que depende de la edad pero con una penetrancia incompleta, hay individuos que viven hasta la vejez sin ningún síntoma clínico de la EP (Cookson, 2015). La mutación más común es la G2019S (West, 2017), esta mutación aumenta la actividad de la quinasa dos veces más que en los casos no parkinsonianos. Otra mutación, la R1441G, que tiene una importante prevalencia en la población de Guipúzcoa (Marti-Masso et al., 2009, Ruiz-Martinez et al., 2010).

Gen de la enzima beta-glucocerebrosidasa (GBA)

El gen GBA, localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q21), codifica para la enzima beta-glucocerebrosidasa. Esta enzima se encuentra en los lisosomas, y ayuda a degradar la molécula glucocerebrosidasa en glucosa y ceramida. Las mutaciones homozigotas en este gen están asociadas a la enfermedad de Gaucher, y tanto las mutaciones homozigotas como heterozigotas se relacionan con la EP. La enfermedad de Gaucher presenta una sintomatología distinta a los casos de Parkinson. Se ha encontrado alteraciones de los esfingolípidos de la membrana en los enfermos de Gaucher y también en los cerebros que presentan formación de LB (Guedes et al.,

2017). Las mutaciones en este gen pueden alterar la función, se disminuye la actividad enzimática en el líquido cefaloraquídeo (LCR) y en ciertas zonas cerebrales (Adler et al., 2017), con lo cual puede facilitar la agregación de proteínas aberrantes.

Gen de la parkina (PARKINA)

El gen *PARK2* se encuentra en el cromosoma 6 (6q25.2-q27) y codifica para la proteína parkina, que es una ubiquitina E3 ligasa (Shimura et al., 2000) implicada en la degradación de proteínas anómalas mediante el sistema proteosoma-ubiquitina. Recientemente, se ha descrito la interacción de la parkina con la mitocondria (Knott et al., 2008) y los microtúbulos (Cartelli and Cappelletti, 2016, Cartelli et al., 2017). La Parkina controla la homeostasis, biogénesis y degradación de la mitocondria. También, se une a microtúbulos para promover su ubiquitinización y degradación, modulando así el turnover de tubulina.

Las mutaciones en el gen de la Parkina son recesivas, y generan una pérdida de función, que resulta en un tipo de Parkinson familiar de edad muy temprana, puede manifestarse antes de los 20 años. En los animales deficientes en *PARK2*, se ha visto que la pérdida de este gen induce una sobreacetilación de los microtúbulos en las neuronas dopaminérgicas, localizados en la sustancia nigra y en el estriado (Cartelli et al., 2017).

Gen de la enzima ubiquitina esterasa caboxilo terminal L1 (UCHL1)

Situado en el cromosoma 4 (4p14), codifica la enzima ubiquitina esterasa carboxilo terminal L1, que se encuentra en las neuronas. La mutación dominante I93M de este gen causa una reducción del 50% de la actividad hidrolasa de la enzima *in vitro* (Leroy et al., 1998, Nishikawa et al., 2003). Dado que la ubiquitina sirve como una señal para desplazar las proteínas aberrantes a los proteosomas, donde se degradan, la reducción de la actividad de la enzima en el proceso de ubiquitinización, no permite que se degraden las proteínas innecesarias, y podrían acumularse hasta formar agregados que dañan la neurona (Kumar et al., 2017).

Pero ni la mutación 193M ni otras mutaciones patogénicas en el gen UCHL se ha detectado en otras familias que sufren la EP. Aunque, un polimorfismo común en este gen, S18Y, se ha asociado a una disminución de riesgo para padecer la EP idiopática, incluyendo un extenso meta-análisis. Por este motivo, este gen necesita de un estudio genético exhaustivo para poder validarlo y usarlo en la identificación de la EP (Elbaz et al., 2003, Facheris et al., 2005, Carmine Belin et al., 2007).

Otros genes

Gen de la DJ-1 (PARK7)

El gen *PARK7*, situado en el cromosoma 1 (1p36.23) codifica la proteína DJ-1. Es una proteína antioxidante, actúa como chaperona, regulador transcripcional, proteasa y regula la actividad de las mitocondrias. La deficiencia de DJ-1 intensifica la acumulación de los agregados de α -sinucleína (Xu et al., 2017). Aproximadamente, se han descrito 15 mutaciones puntuales recesivas y largas deleciones del gen en la EP (Corti et al., 2011).

Gen de la proteína PTEN (PINK1)

El gen *PINK1*, situado en el cromosoma 1 (1p36), codifica la proteína fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN). Esta proteína es un supresor tumoral que actúa como fosfatasa. Además, interactúa con la proteína parkina y DJ-1 (Choi et al., 2014). Se ha llegado a identificar 50 mutaciones recesivas puntuales y algunas deleciones del gen involucradas en la EP (Corti et al., 2011).

1.6. Estructura de α-sinucleína

α-sinucleína es una proteína de 140 aminoácidos que no tiene una estructura bien definida en condiciones fisiológicas, aunque normalmente, se encuentra en hélice α. Forma parte de una familia de proteínas que tienen un peso molecular alrededor de 15-25 kDa (Ueda et al., 1993). Tres de las cuales son conocidas como; α-sinucleína, β-sinucleína y γ-sinucleína (Clayton and George, 1998, Corti et al., 2011). Inicialmente, fue aislada de los terminales nerviosos colinérgicos de las rayas *Torpedo* (Maroteaux et al., 1988). Patológicamente, la α-sinucleína humana fue identificada como el precursor proteico del componente no β-amiloide (NAC, del inglés non-Abeta component) en las placas amiloides de la EA. Aunque los miembros de la familia de sinucleína comparten la mayor parte de la secuencia proteica, α-sinucleína es la única que contiene la secuencia NAC (Ueda et al., 1993).

El dominio hidrofóbico central NAC, es muy propenso a agregarse y así formar oligómeros de la proteína o protofibrillas que terminan generando fibras insolubles. Se ha reportado que la deleción o el bloqueo del dominio NAC, termina con la capacidad de α -sinucleína para formar agregados (Giasson et al., 2001). Además, α -sinucleína contiene siete repeticiones de KTKEGV en el amino terminal, con lo cual es rico en lisinas, este es un dominio anfipático en hélice α que participa en la interacción con los lípidos de membrana, y también tiene un carboxilo terminal acídico desorganizado que está implicado en regular su localización nuclear, junto con su interacción con los metales y otras moléculas (Eliezer et al., 2001, Ulmer et al., 2005) (Figura 5).



Figura 5. Estructura de la proteína α -sinucleína. A) Representación esquemática de las regiones de α sinucleína, el amino terminal del aminoácido 1 al 60, la región central del aminoácido 61 al 95, llamado NAC y el carboxilo terminal del aminoácido 96 al 140. Los cuadros rojos representan las repeticiones KTKEGV. B) Estructura de la α -sinucleína unida a los lípidos de membrana, la estructura de la proteína humana fue determinada por resonancia magnética nuclear, la imagen esta coloreada en azul desde su amino terminal hasta el rojo que corresponde al carboxilo terminal (PDB ID: 1XQ8) (Gallegos et al., 2015).

Muchos tipos neuronales del SNC y sistema nervioso periférico expresan α -sinucleína. A nivel subcelular, en condiciones fisiológicas α -sinucleína se encuentra en los terminales presinápticos y en algunas zonas del núcleo (Maroteaux et al., 1988).

1.6.1. Modificaciones postraduccionales

 α -sinucleína es una proteína que sufre varias modificaciones postraduccionales, estas modificaciones podrían aumentar la formación de los oligómeros citotóxicos de α -sinucleína.

Fosforilación

La fosforilación de α -sinucleína en la serina 129 se considera crucial en la patogénesis de los LB. Aunque, la fosforilación de α -sinucleína se considera una situación normal, dado que se observan niveles de esta modificación postraduccional tanto en cerebros sanos como enfermos, los niveles de α -sinucleína fosforilada son mucho mayores en la EP, tauopatias y la demencia por cuerpos de Lewy. En la SN y el nucleus basalis de Meynert hay más α -sinucleína fosforilada que en otras zonas cerebrales, paralelamente ambas zonas muestran menos cantidad de α -sinucleína total (Muntane et al., 2012). Además, in vitro, la fosforilación de α -sinucleína en la serina 129 induce cuatro veces más la formación de hojas β de la misma α -sinucleína en comparación con la α -sinucleína no fosforilada (Fujiwara et al., 2002).

Pero, α -sinucleína también puede fosforilarse en la serina 87 y en la tirosina 125.

Solo la serina en la posición 87 se encuentre en la región NAC de α -sinucleína, región esencial para la agregación de α -sinucleína. Esta serina es de los pocos residuos que difieren entre la secuencia de α -sinucleína humana de la de ratón o rata. En cerebros humanos o en animales transgénicos, la mayoría de la α -sinucleína fosforilada en la serina 87 se encuentra en la membrana y también se identifica en los LB. Por lo tanto, se la relaciona con la patogénesis de las α -sinucleínopatias (Paleologou et al., 2010).

La fosforilación en la tirosina 125 se observa tanto en el cerebro de humanos como de *Drosophila melanogaster*. A la fosforilación en la tirosina 125 se le atribuye un posible papel neuroprotector, bloqueando la formación de oligómeros por lo tanto frena la neurotoxicidad de α -sinucleína. Los estudios a post mortem de la corteza cerebral han evidenciado que en la demencia por cuerpos de Lewy y en sujetos sanos se presenta una disminución de la fosforilación en la tirosina 125 (Chen et al., 2009).

Proteolisis

Otra de las modificaciones de α -sinucleína es la proteólisis. La deleción del carboxilo terminal de α -sinucleína puede ser clave en la patogénesis de la EP (Li et al., 2005). Estas formas truncadas de α -sinucleína carecen de terminal acídico. Aunque, la deleción del carboxilo terminal puede tener un papel patológico, la proteólisis de α -sinucleína es un evento normal en el cerebro humano adulto (Muntane et al., 2012).

A pesar de que la deleción del carboxilo terminal también ocurre en cerebros sanos, se ha identificado un aumento de α -sinucleína truncada en los extractos de cerebros de pacientes de Parkinson (Li et al., 2005). Varios estudios se han realizado para conocer el papel que tiene esta forma truncada de α -sinucleína. Animales *Drosophila melanogaster* que expresan esta deleción del carboxilo terminal generan inclusiones de agregados de α -sinucleína dando lugar a una neurotoxicidad cerebral (Periquet et al., 2007). Además, *in vitro*, la forma truncada de α -sinucleína tiene más facilidad de autoagregarse que la secuencia WT entera de α -sinucleína (Periquet et al., 2007)

El origen de las formas truncadas aún se desconoce. *In vitro*, se han usado varias proteasas para cortar α -sinucleína, como neurosina (Kasai et al., 2008), calpaina I (Mishizen-Eberz et al., 2003) y metaloproteasas (Sung et al., 2005). También, se ha sugerido que las especies truncadas pueden originarse de la degradación incompleta de la α -sinucleína mediante el proteosoma (Liu et al., 2005, Sevlever et al., 2008).

Nitración

El papel que desempeña la nitración en la α -sinucleína se desconoce pero en sujetos sanos y en los LB se ha identificado esta modificación en la α -sinucleína. La nitración es la consecuencia del elevado estrés oxidativo, el cual se conoce como uno de los principales factores que causan daño y muerte celular. En los modelos de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), se encuentra α -sinucleína nitrada en el

estriado y el mesencéfalo. El MPTP es un producto químico que produce daño en las neuronas dopaminérgicas de la via nigrostriatal pero no genera cuerpos de inclusión, por lo que se usa como modelo para estudiar la EP (Vila and Przedborski, 2003). Formas de α -sinucleína nitrada se han encontrado en sangre de pacientes de Parkinson, con lo que se podría usar como posible biomarcador (Burai et al., 2015).

1.7. La función fisiológica de α-sinucleína

Aunque la función exacta de la α -sinucleína se desconoce, hay muchas evidencias que sugieren que la función de α -sinucleína está relacionada con su capacidad de interactuar con los fosfolípidos de membrana, especialmente, membranas como la de las vesículas. De hecho, α -sinucleína parece estar involucrada en la neurotransmisión, tráfico de vesículas y función mitocondrial.

El hecho de que α -sinucleína se encuentre en los terminales presinápticos y su capacidad de interactuar con las membranas lipídicas, sugiere que α -sinucleína tiene un papel importante en la neurotransmisión. La participación de α -sinucleína en la transmisión sináptica ha sido corroborada por su intervención en la plasticidad sináptica asociada al aprendizaje de canciones en aves, como los fringílidos zebra, durante su desarrollo (George et al., 1995). Además, en ratones deficientes de α -sinucleína se ha descrito que las sinapsis dopaminérgicas realizan una descarga excesiva del neurotransmisor cuando se estimulan con calcio, aunque presentan una arquitectura cerebral normal, los terminales sinápticos nigrostriatales muestran una descarga estándar de dopamina y responden bien a simples estímulos eléctricos (Abeliovich et al., 2000). Los animales transgénicos que expresan de dos a tres veces más α -sinucleína, presentan un déficit de neurotransmisores, ya que hay alteraciones en la cantidad de vesículas sinápticas y en el reciclaje vesicular (Nemani et al., 2010).

Además, la α -sinucleína puede regular negativamente la expresión y la actividad de la tirosina hidroxilasa. La tirosina hidroxilasa es la enzima que cataliza la conversión del aminoácido L-tirosina al precursor de la dopamina. La α -sinucleína mantiene la tirosina hidroxilasa desfosforilada para reducir la expresión de dopamina lo cual aumenta la degeneración neuronal dopaminérgica (Peng et al., 2005). También, se asocia la α -sinucleína con la inhibición de la fosfolipasa D2, esta enzima cataliza la hidrolisis de la fosfatidilcolina al ácido fosfatídico y al diacilglicerol, ambos moduladores intracelulares de la neurotransmisión (Klein et al., 1995, Jenco et al., 1998).

Por otro lado, se relaciona la α -sinucleína con el tráfico de vesículas desde el retículo endoplasmático (RE) hasta el aparato de Golgi. En modelos de levadura, las células que sobreexpresan α -sinucleína presentan daño en el transporte vesicular, entre el RE y el aparato de Golgi, por lo que el RE se estresa y eso genera proteínas mal plegadas (Cooper et al., 2006). En líneas celulares, se ha identificado que al sobreexpresar α sinucleína, las vesículas se forman en el RE y se transmiten hasta al aparato de Golgi pero fallan al fusionarse con la membrana del aparato de Golgi (Thayanidhi et al., 2010).

Análogamente, α -sinucleína puede estar involucrada en la regulación de la actividad de la mitocondria y la alteración de la expresión de α -sinucleína da lugar a una mitocondria disfuncional que genera especies radicales de oxígeno, que resulta en la muerte neuronal (Hsu et al., 2000). Los enfermos de Parkinson presentan un defecto de la actividad del complejo proteico I de la cadena respiratoria en la SN (Schapira et al., 1989), estriado (Mizuno et al., 1989), corteza frontal (Keeney et al., 2006), plaquetas (Parker et al., 1989) y leucocitos (Muftuoglu et al., 2004). También, se relaciona α -sinucleína con la capacidad de la mitocondria para fusionarse o fisionarse, se ha publicado que cuando α -sinucleína se sobreexpresa o en presencia de las mutaciones de α -sinucleína hay una fragmentación de las mitocondrias, lo que supone una inhibición de la fusión (Kamp et al., 2010) o fisión (Nakamura et al., 2011) de las mitocondrias.

1.8. Agregación y propagación "prion-like" de α -sinucleína

Muchas de las principales proteínas implicadas en enfermedades neurodegenerativas pueden adoptar una forma aberrante, mal plegada. Algunas de estas especias proteicas desestructuradas son los β -amiloide, Tau hiperfosforilada y α -sinucleína, estas son capaces de propagarse y agregarse entre células de la misma manera que los priones. Aunque, no todas las propiedades infectivas de un prión se han demostrado en estas especies proteicas. Hay que tener en cuenta dos términos para poder definir estas especies proteicas como priones, uno de ellos es la transmisión del patógeno entre individuos y el otro la infectividad. Por una parte, estas especies proteicas no presentan una transmisibilidad alta entre individuos en condiciones naturales. Por otra parte, la "infectividad" se confunde con el concepto de propagación proteica, la cual no es suficiente para considerar una proteína como agente infeccioso (Erana et al., 2017). Por lo tanto, estas especies proteicas se las denomina "prionoid" o "prion-like" (Erana et al., 2017).

Aun así, esta forma aberrante de α -sinucleína es capaz de agregar la α -sinucleína endógena. Estos agregados generados presentan hiperfosforilación y ubiquitinización (Aguzzi and Rajendran, 2009). Se sugiere que la agregación de estas especies proteicas siguen un mecanismo de nucleación-agregación, como el descrito para la agregación de la proteína priónica celular (PrP^c). De hecho, las proteínas desplegadas resultan en formas proteicas anormales ricas en láminas β , resistentes a la proteólisis y que tienden a formar agregados mayores como en las prionopatias (Aguzzi and Calella, 2009).

Aunque hay ciertas discrepancias, se conoce que la progresión de las enfermedades neurodegenerativas, como la EP y la EA, correlacionan con la propagación de la proteína mal plegada (Invernizzi et al., 2012, Sabate et al., 2012). Se ha demostrado que α -sinucleína puede propagarse entre células y este hecho es reproducible *in vivo* e *in vitro* (Lee et al., 2005, Desplats et al., 2009, Luk et al., 2009). Un punto clave para la hipótesis de la propagación "prion-like" en la EP es el hecho que la α -sinucleína aberrante puede ser liberada al espacio extracelular y ser internalizada por la neurona contigua (Reyes et al., 2015), la microglia (Lee et al., 2008b) o los astrocitos (Lee et al., 2010, Cavaliere et al., 2017). Específicamente, en el caso de la EP, la acumulación de α -sinucleína empieza en el bulbo olfativo y médula oblongata hasta llegar al mesencéfalo y prosencéfalo.

1.8.1. La agregación de α-sinucleína

 α -Sinucleína es propensa a formar fibras amiloides, las cuales se pueden encontrar en los LB, LN o en el citoplasma de la glía (GCI, del inglés glial cytoplasmic inclusions). En los LB de parkinsonianos, se observa un aumento de α -sinucleína hiperfosforilada en la serina 129. Especialmente, la fibrilización de α -sinucleína es dependiente de 12 aminoácidos (71-82) que constituyen el dominio central hidrofóbico de dicha proteína. La deleción de este dominio bloquea la fibrilización de α -sinucleína (Auluck et al., 2010).

 α -Sinucleína es una proteína que requiere la interacción de la membrana lipídica para formar dímeros, oligómeros y fibras, su forma nativa en el citoplasma está desplegada. En presencia de vesículas que contienen fosfolípidos aniónicos en su membrana, el amino terminal de α -sinucleína forma dos hélices alfa que le permiten asociarse a la membrana. Esta interacción de α -sinucleína con la membrana facilita la formación de dímeros de α -sinucleína. A partir de la dimerización, α -sinucleína adopta una estructura secundaria en lámina β . Esta estructura en lámina β es capaz de asociarse a otros dímeros o monómeros de α -sinucleína, así se forman los oligómeros de α sinucleína (Figura 6). Finalmente, estos oligómeros se agregan formando fibras y depósitos amiloides, estos depósitos son los denominados LB o LN (Auluck et al., 2010). Durante la agregación de α -sinucleína, la proteína nativa pierde su función y gana toxicidad al convertirse en oligómero. Los oligómeros, se definen como la especie tóxica de α -sinucleína, se agregan entre ellos para formar las fibras de α -sinucleína que se detectan en los LB (Eisbach and Outeiro, 2013).





La conversión de α -sinucleína a una forma oligomérica tóxica se desconoce pero puede estar influenciado por las mutaciones genéticas, las modificaciones postraduccionales o por la interacción con otras moléculas (Brundin and Melki, 2017). Incluso, las mismas especies oligómericas pueden bloquear la actividad de los sistemas proteolíticos, provocando que en las neuronas se creen más oligómeros, no degradables, que terminan agregándose para dar lugar a los LBs (Webb et al., 2003, Tofaris et al., 2011, Martinez-Vicente and Vila, 2013, Xilouri et al., 2013).

1.8.2. Propagación "prion-like" de α-sinucleína

Propagación de α-sinucleína del huésped al trasplante neuronal

Neuronas embrionarias del mesencéfalo trasplantadas en el estriado de pacientes de Parkinson pueden desarrollar LB años más tarde. La identificación de inclusiones en las neuronas injertadas sugiere que hay una transmisión de la α -sinucleína oligomérica desde las neuronas del paciente hasta las neuronas sanas trasplantadas. En particular, los pacientes que mueren una década después del trasplante neuronal exhiben LB positivos para α -sinucleína y ubiquitina en las neuronas trasplantadas anteriormente. Contrariamente, las neuronas trasplantadas no muestran el desarrollo de la patología, por lo tanto, se sugiere que el desarrollo de la formación de LB es un proceso lento, que requiere una década para manifestarse (Kordower et al., 2008, Li et al., 2008).

Cómo α -sinucleína se propaga a las neuronas injertadas sanas no se conoce aunque se baraja alguna hipótesis. Las neuronas injertadas están expuestas a un microambiente desfavorable como la inflamación, estrés oxidativo, excitotoxicidad y el fallo de factores neurotróficos. Esta situación puede inducir que las proteínas se desplieguen con mayor facilidad en las neuronas trasplantadas. Otra hipótesis es la transmisión de α -sinucleína desde las neuronas del enfermo hasta las neuronas sanas. Bajo estas condiciones, α -sinucleína puede ser liberada o por neuronas vivas mediante varios mecanismos o bien, mediante muerte neuronal que se produce alrededor del injerto. Así pues, las neuronas trasplantadas pueden captar mediante otros mecanismos la α sinucleína. Una vez la α -sinucleína oligomérica se encuentra en la neurona sana, ésta puede actuar como molde y promover el mal plegamiento de la α -sinucleína endógena, que finalmente da lugar a los LB (Brundin et al., 2008).

Análogamente, Desplats *et al.*, (Desplats et al., 2009) muestra las alteraciones de células madre neuronales corticales de ratón marcadas con GFP (del inglés green fluorescent protein) trasplantadas en el hipocampo de ratones que expresan α -sinucleína humana. Cuatro semanas después del trasplante, el 15% de las células madre injertadas presentan α -sinucleína humana. Algunas de estas células muestran activación de caspasa 3 e inclusiones citoplasmáticas.

Propagación intercelular de α-sinucleína

Los posibles mecanismos de la propagación de α -sinucleína no están del todo descritos, aunque varias vías se han propuesto y estudiado. La transmisión intercelular de α -sinucleína implica que α -sinucleína tiene que ser liberada e internalizada por las células (Figura 7) (Bieri et al., 2018). Este transporte puede ser retrógrado a anterógrado, el cual se ha monitorizado en cultivos corticales mediante el uso de dispositivos microfluídicos (Volpicelli-Daley et al., 2011, Freundt et al., 2012, Tran et al., 2014, Brahic et al., 2016).



Figura 7. Mecanismos de propagación intercelular de α -**sinucleína.** Mecanismos que median la transmisión intercelular de los agregados citosólicos proteicos. (a,b) Oligómeros que se han generado en el citoplasma (por la neurona de la izquierda) a partir de la proteína soluble monomérica o debido a la fragmentación de los agregados. (a) Algunos oligómeros pueden liberarse al espacio extracelular o (b) a través vesículas como exosomas. Los oligómeros (a) pueden penetrar directamente en la membrana de la neurona receptora (1) o entrar por endocitosis (2) o por receptor ligado a endocitosis (3) (neurona de la derecha). Los exosomas que contienen los oligómeros (b) pueden fusionarse con la membrana de la neurona receptora (4). Los oligómeros también pueden transportarse mediante nanotubos, que conectan directamente los citoplasmas de dos células (5). Los oligómeros internalizados se agregaran para formar más fibrillas en el citoplasma de la neurona sana, que a su vez, será la neurona que propagará sus oligómeros a la siguiente neurona (Guo and Lee, 2014).

Internalización de α-sinucleína

Se ha demostrado que las células son capaces de internalizar α -sinucleína *in vitro* e *in vivo*. α -sinucleína añadida al medio celular puede ser internalizada por las células en cultivo (Sung et al., 2001, Zhang et al., 2005). En ratones, LB derivados de pacientes y fibras de α -sinucleína administradas mediante estereotáxico en el cerebro son internalizadas por la glía y neuronas horas después de la inyección (Rey et al., 2013, Goedert et al., 2017). Gracias al uso de dispositivos microfluídicos se ha observado que α -sinucleína puede ser captada por el soma, dendritas o axones de las neuronas (Volpicelli-Daley et al., 2011).

Por una parte, esta internalización puede ser mediada por endocitosis (Sung et al., 2001, Lee et al., 2008a, Volpicelli-Daley et al., 2011). La reducción de temperatura o la presencia de bloqueadores de la dinamina 1 reducen la endocitosis, así pues, se ha observado una reducción de α -sinucleína endocitada bajo estas condiciones.
Por otra parte, la internalización de α -sinucleína puede ser llevada a cabo por un receptor ligado a endocitosis. Se ha descrito la unión de α -sinucleína a LAG3 el cual se encuentra en la membrana de las neuronas y la glía (Zhang et al., 2014). La ausencia de LAG3 reduce la agregación y transporte de α -sinucleína *in vitro* e *in vivo* (Mao et al., 2016). Se ha utilizado fibras de α -sinucleína ligadas a PHrodo red para observar su endocitosis. PHrodo red es capaz de emitir más fluorescencia cuando se encuentra en un medio ácido, como es el caso del interior de los endosomas. Así, se observa un aumento de fluorescencia al endocitar las fibras de α -sinucleína (Mao et al., 2016). Además, los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs, del inglés Heparan sulfate proteoglycans) median la internalización de α -sinucleína vía macropinocitosis en cultivos no neuronales. Gracias al marcaje fluorescente de las fibras de α -sinucleína se observa su colocalización con los HSPGs *in vitro* (Holmes et al., 2013). También, se observa que los agregados de α -sinucleína colocalizan con la proteína transactivadora de la transcripción (TAT), la cual se conoce que se internaliza por macropinocitosis (Nakase et al., 2004, Wadia et al., 2004, Kaplan et al., 2005, Nakase et al., 2007).

Se ha publicado la unión de las fibras de α -sinucleína a la proteína precursora de amiloide 1 (APLP1, del inglés amyloid-like protein 1) y a las proteínas presinápticas ancladas a membrana, neurexinas 1a y 2a (Shrivastava et al., 2015, Mao et al., 2016). En cultivos, los receptores Toll-like 2 (TLR2, del inglés Toll-like receptor 2) expresados en la microglía están involucrados en la propia activación de la microglía cuando se exponen a las fibras de α -sinucleína (Kim et al., 2013). La proteína de sodio/potasio-ATPasa (adenosine triphosphatase) subunidad alfa 3 se encuentra en los clusters que forman oligómeros y fibras de α -sinucleína. Aunque no se ha estudiado si pueden mediar su internalización si se han identificado cambios en el gradiente de sodio y excitabilidad neuronal *in vitro* (Shrivastava et al., 2015).

Asimismo, se ha demostrado la formación membranas que contienen F-actina, denominados nanotubos, para la transmisión de α -sinucleína *in vitro* (Abounit et al., 2016). Otra hipótesis es que α -sinucleína puede entrar por difusión pasiva interactuando con los lípidos de membrana (Auluck et al., 2010).

Una vez en el interior de la nueva neurona sana, los oligómeros de α -sinucleína llegan al citoplasma, donde se amplifican mediante la agregación de la α -sinucleína endógena. Se desconoce como la α -sinucleína que se encuentra dentro del endosoma es capaz de llegar al citoplasma de la neurona, una posible teoría es que α -sinucleína tiene la capacidad de penetrar y lisar la membrana lisosomal (Freeman et al., 2013).

Transporte axonal de α-sinucleína

Experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* evidencian que α -sinucleína oligomérica se transporta axonalmente. Varios grupos inyectan fibras de α -sinucleína sintética o derivada de pacientes en el cerebro de ratón, dicha α -sinucleína exógena es capaz de

fibrilar la α -sinucleína endógena en el lugar de la inyección. También, se ha observado agregación de α -sinucleína en áreas del cerebro distales al lugar de inyección (Luk et al., 2012a, Luk et al., 2012b, Masuda-Suzukake et al., 2013, Recasens et al., 2014, Paumier et al., 2015, Peelaerts et al., 2015). Estas regiones cerebrales secundarias afectadas están conectadas al lugar de inyección por proyecciones axonales retrógradas y anterógradas (Bieri et al., 2018). De todas formas, el transporte axonal de α -sinucleína se ha estudiado directamente gracias al uso de cultivos neuronales primarios cultivados en dispositivos microfluídicos.

Cultivos celulares compartimentados

Los dispositivos microfluídicos son moldes de polidimetilsiloxano (PDMS) que son capaces de separar físicamente el soma y los axones de las neuronas en compartimentos. Cada compartimento se encuentra aislado fluidicamente, así se puede manipular cada uno de manera independiente (Figura 8) (Taylor et al., 2005a). Entre ambos compartimentos hay una serie de microcanales que debido a sus medidas solo permiten el paso de los axones. Dado que los compartimentos están aislados fluidicamente, si se añade α -sinucleína en uno de los compartimentos y días después se detecta en el otro compartimento significa que hay un transporte exclusivamente axonal.



Figura 8. Ilustración esquemática de los dispositivos microfluídicos. (a) Fotografía del dispositivo microfluídico que contiene colorante alimenticio para visualizar cada canal. (b) Las cámaras del dispositivo consisten en un molde de PDMS. (c, e) Micrografías de cultivos neuronas 6 días *in vitro* (DIV) en los dispositivos microfluídicos. (e) Microfotografía obtenida mediante microscopía confocal de neuronas marcadas con Tau (en verde) y MAP5 (en rojo), se demuestra que solo los axones pueden cruzar los microcanales (Kim et al., 2012).

Por lo tanto, gracias a esta herramienta se puede estudiar el transporte retrógrado y anterógrado de la α -sinucleína exógena añadida en el cultivo (Danzer et al., 2011, Freundt et al., 2012, Brahic et al., 2016). Los microtúbulos pueden transportar los oligómeros de α -sinucleína tanto anterogradamente como retrógradamente. Parece

ser que el transporte retrógrado es más eficiente que el transporte anterógrado (Figura 9) (Brahic et al., 2016). Aunque, se desconoce si la α -sinucleína internalizada es transportada por los microtúbulos directamente en el citoplasma o en vesículas. Es posible que la agregación de α -sinucleína se inicie en los axones ya que los oligómeros de α -sinucleína transportados pueden agregar α -sinucleína endógena y agregarla (Bieri et al., 2018).



Figura 9. Transporte axonal de las fibras de \alpha-sinucleína. Las fibras de α -sinucleína pueden ser internalizadas tanto en el compartimento del soma como en el axonal. Las fibras de α -sinucleína se transportan mediante los microtúbulos tanto anterógradamente como retrógradamente (Bieri et al., 2018).

Secreción de *a*-sinucleína

Dado que α -sinucleína no es una proteína secretable ya que carece de péptido señal, se pensaba que α -sinucleína era exclusivamente intracelular. Más tarde, se detectó niveles de α -sinucleína en LCR y plasma de pacientes de Parkinson (Borghi et al., 2000, El-Agnaf et al., 2003, Llorens et al., 2016). Por tanto, α -sinucleína puede ser secretada por las células. De hecho, hay tipos neuronales que pueden secretar α -sinucleína al medio *in vitro* (El-Agnaf et al., 2003, Emmanouilidou et al., 2010, Danzer et al., 2011). Aunque, el mecanismo exacto de la liberación de α -sinucleína no está del todo

definido. Tampoco se conoce si las formas oligoméricas y fibriladas de α -sinucleína se secretan mediante la misma vía.

Fontaine *et al.*, muestra que la liberación de α -sinucleína puede estar mediada por el complejo DnaJ/chaperona Hsc70 (Fontaine et al., 2016). También, Lee *et al.*, define que USP19 tiene actividad de tipo chaperona y está involucrada en la liberación de α -sinucleína (Lee et al., 2016). Hoy en día, no sabemos si USP19 y el complejo DnaJ/chaperona Hsc70 trabajan conjuntamente o independientemente. Algunos estudios apuntan a los exosomas no canónicos como vía de secreción, aunque los niveles de α -sinucleína detectados son muy bajos (Lee et al., 2005, Emmanouilidou et al., 2010).

Por otro lado, la agregación de α -sinucleína disminuye cuando ciertos anticuerpos monoclonales anti- α -sinucleína se añaden al medio de cultivo. También, animales inyectados intracranealmente con fibras de α -sinucleína presentan una reducción de la patología después de administrarles estos mismos anticuerpos. Por lo tanto, la accesibilidad de estos anticuerpos sugiere que α -sinucleína no se secreta en vesículas (Tran et al., 2014).

1.9. Modelos experimentales de la EP

In vitro: Fibras de α-sinucleína

Uno de los mayores obstáculos para elucidar el rol patológico de α -sinucleína ha sido la falta de un buen modelo que ayude a estudiar la agregación de α -sinucleína, especialmente en neuronas. En los modelos animales que expresan formas mutadas de α -sinucleína se observan agregados de tipo LB, pero solo en ratones de edad muy avanzada. Los síntomas propios de la vejez y los que generan los agregados de α -sinucleína se pueden confundir en estos modelos animales, además dificulta el estudio de los efectos tempranos que produce la agregación de α -sinucleína (Masliah et al., 2000, Lee et al., 2002). Por el contrario, los cultivos neuronales derivados de estos animales generan unos agregados distintos a los que se observan en el cerebro.

Las fibras de α -sinucleína generadas a partir de α -sinucleína monómerica recombinante no están fosforiladas (Volpicelli-Daley et al., 2011). No obstante, los agregados que se generan *in vitro* e *in vivo* son α -sinucleína fosforilada (p- α -sinucleína). Los agregados generados comparten características con las inclusiones identificadas en los LB y LN. Estas características son: agregados insolubles en detergente, hiperfosforilación, ubiquitinación y estructura filamentosa cuando se observa en el microscopio electrónico (Spillantini et al., 1998a).

Las neuronas son capaces de internalizar las fibras de α -sinucleína. Fibras de α -sinucleína marcadas con FLAG se hallan en el interior de la célula cuatro días después

de ser añadidas al medio (Aulic et al., 2014). Además, las fibras de α -sinucleína agregan la α -sinucleína endógena. Gracias al uso de dispositivos microfluídicos y fibras de α -sinucleína marcadas con myc, se observa la agregación de α -sinucleína endógena. Siete días después de añadir fibras de α -sinucleína en uno de los compartimentos del dispositivo microfluídico, se observan agregados de p- α -sinucleína que no colocalizan con el marcaje de myc (Volpicelli-Daley et al., 2011).

La agregación de α -sinucleína es dependiente del tiempo (Volpicelli-Daley et al., 2011). In vitro, cuatro días después de añadir las fibras de α -sinucleína, se observan pequeños agregados de p-α-sinucleína en los terminales presinápticos y axones. Más tarde, hasta diez días después de la presencia de las fibras de α -sinucleína, los agregados crecen y por su estructura serpentinosa parecen LN. Esto permite una examinación cuidadosa de la formación de los agregados de α -sinucleína, además la muerte neuronal es despreciable hasta los catorze días después de la presencia de fibras de α -sinucleína en el cultivo (Volpicelli-Daley et al., 2014). In vivo, se inyectan fibras de α -sinucleína en distintas regiones cerebrales del ratón y se estudia la propagación de α -sinucleína y la formación de LBs y LNs (Luk et al., 2012a, Masuda-Suzukake et al., 2013, Masuda-Suzukake et al., 2014). Luk et al., inyecta en el estriado dorsal de ratones WT fibras de α -sinucleína. Los agregados de p- α -sinucleína se observan en el lugar de la inoculación a los 30 días después de la intervención y en las zonas directamente interconectadas con el estriado (Luk et al., 2012b). Las zonas afectadas por la formación de inclusiones de p- α -sinucleína son ipsilaterales al inóculo, exceptuando la amígdala que presenta inclusiones bilateralmente, ya que el estriado proyecta a amígdala bilateralmente (Pan et al., 2010). Ratones examinados a 90 y 180 días después de ser inoculados, muestran un aumento de agregación de p- α -sinucleína. Sin embargo, las poblaciones serotonérgicas (núcleo rafe) y noradrenérgicas (locus coeruleus) no presentan agregados, sugeriendo que las neuronas monoaminérgicas no son igual de susceptibles a la transmisión de la α-sinucleína. Además, la agregación de p-α-sinucleína resultaba en una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la SN pars compacta, pero no en el área tegmental ventral adyacente (Luk et al., 2012a).

In vivo: Modelos animales

Existen varios modelos animales que pueden ser útiles para la experimentación. Aunque, el más usado son los modelos murinos, también existen otros modelos mamíferos como *Macaca mulatta*, e modelos invertebrados como *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* (Lu and Vogel, 2009, Dimitriadi and Hart, 2010, Wentzell and Kretzschmar, 2010). Los modelos murinos son de gran utilidad debido a su tamaño, su progenie abundante, gestación corta y que su genoma está completamente mapeado. Especialmente, el ratón *Mus musculus* es un perfecto candidato para el estudio de enfermedades humanas dada su alta homología con el genoma humano (Mouse Genome Sequencing et al., 2002).

Aquí, se definen los modelos empleados en esta tesis. Los animales knockout de α -sinucleína se denominan K240 y los animales que expresan la α -sinucleína WT humana son los S240.

Los ratones que no expresan α -sinucleína apenas muestran un fenotipo anormal, por lo contrario, animales deficientes en α -sinucleína, β -sinucleína y γ -sinucleína muestran unos botones presinápticos pequeños y sobreviven solamente alrededor de un año (Fernandez-Chacon et al., 2004, Burre et al., 2010, Greten-Harrison et al., 2010).

Los animales que sobreexpresan la α -sinucleína humana WT presentan fallos en la coordinación motora posiblemente debido a la agregación de α -sinucleína en regiones de la corteza y la SN, pero no se observan acumulaciones de α -sinucleína en la médula espinal, células gliales ni en la unión neuromuscular (Fleming et al., 2004).

2. La proteína priónica celular

2.1. Reseña histórica

Stanley Benjamin Prusiner ganó el premio nobel en fisiología o medicina en 1997 por su trabajo sobre la causa de la encefalopatía espongiforme bovina y su equivalente en los humanos la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD, del inglés Creutzfeldt-Jakob disease). Este trabajo de 1982 contenía por primera vez la palabra prión para referirse a la proteína mal plegada infecciosa que causaba estas enfermedades (Prusiner, 1982).

Aunque fue a mediados del siglo XVIII, cuando se identificaron los primeros casos de enfermedades espongiformes transmisibles (EETs), las cuales representan un conjunto de enfermedades neurodegenerativas que pueden padecer tanto los humanos como los animales (Kovacs and Budka, 2008). En 1732, ganaderos europeos se percataron que sus ovejas y cabras padecían tembladera (scrapie, en inglés), una enfermedad letal de origen parasitario que más tarde se creyó que podía estar causada por un virus dada su capacidad infectiva (Detwiler, 1992). A principios del siglo XX, en 1930, se describieron los primeros casos de EET en humanos, llamada CJD, una enfermedad fatal que afecta de forma progresiva el cerebro. En 1959, Igor Klatzo relaciono la enfermedad de CJD con la de kuru, una enfermedad restringida a la zona de Papúa Nueva Guinea, donde ingerían las vísceras y cerebro de los fallecidos como parte de un ritual de canibalismo (Klatzo et al., 1959).

Experimentalmente, extractos de cerebro originarios de ganado que presentaba scrapie eran inoculados en chimpancés y se observaba la transmisión de la enfermedad. Por lo tanto, juntamente con los casos de kuru, se creía que un agente vírico, al igual que en el scrapie de los animales, estaba involucrado (Gajdusek, 1977). Aunque no provocaba una respuesta inmunológica y no se transmitía a través de la leche materna.

Fue Stanley B. Prusiner, quien consiguió purificar cerebros de enfermos que permitieron el estudio de fracciones ricas en partículas infecciosas. Mediante este protocolo se identificó moléculas puramente proteicas, y no mostraban ácidos nucleicos, así los bautizó con el nombre de prión.

Los priones son proteínas que pierden su estructura conformacional definida y son resistentes a proteasas, nucleasas, luz ultravioleta (Alper, 1972), radiaciones ionizantes y a la modificación con hidroxilamina, pero perdían su capacidad infectiva si se trataban con agentes desnaturalizantes, como el fenol. Mediante la purificación de extractos de cerebros de hámster infectados con scrapie se pudo identificar un polipéptido de 27 a 30 kDa que correspondía a la PrP^c, como era resistente a proteasas, esta proteína se denominó PrP^{sc} o también PrP^{res} (Basler et al., 1986).

Animales transgénicos deficiente en PrP^c, demostró que esta proteína era la causante y necesaria para las EETs.

Dada la transmisibilidad de estas enfermedades salió a la luz la hipótesis del prión, una conformación aberrante de la PrP^c, que es capaz de infectar una neurona sana y convertir su PrP^c endógena en una forma citotóxica y por este motivo no hay una respuesta inmunológica (Prusiner, 1991, Aguzzi et al., 2008).

Las EETs o enfermedades priónicas son un conjunto de enfermedades neurodegenerativas. Estas enfermedades incluyen Kuru, CJD, Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) e imsomnio familiar fatal en humanos, pero también los animales presentan enfermedades priónicas.

2.2. Las prionopatías

Las EETs o prionopatías son enfermedades neurodegenerativas fatales, que hoy en día no tienen tratamiento y tienen una prevalencia bastante baja. Quienes las sufren manifiestan trastornos neurológicos progresivos que incluye disfunción del control motor, sensorial y presentan déficits cognitivos, puede manifestarse en grupos de edades distintas. Las EETs afectan el sistema nervioso central y se caracterizan por; la pérdida progresiva de neuronas, que da lugar a una vacuolización neuronal que da una apariencia espongiforme al tejido, no presentan una respuesta inmune ni inflamatoria importante, presenta astrogliosis, microgliosis, amiloidosis e inclusiones anormales de PrP^{sc} en neuronas, e incluso en astrocitos y microglia (Figura 10).



Figura 10. Características histopatológicas de las EETs. Análisis histológico e inmunohistoquímico de muestras de animales sanos (fila inferior) y animales infectados (fila superior). Múltiples vías neurodegenerativas están implicadas en las enfermedades espongiformes, la conversión de la proteína nativa PrP^c a su forma PrP^{sc} da lugar a la enfermedad. En los cerebros de los individuos infectados se observan varias anomalías. La acumulación de depósitos de PrPsc se detecta gracias al anticuerpo contra la proteína priónica, mediante la tinción de Golgi detectamos una degeneración sináptica y una pérdida dendrítica, el marcaje de hematoxilina-eosina muestra su degeneración típica espongiforme, gracias a los anticuerpos anti GFAP (del inglés, glial fibrillary acidic protein) detectamos los astrocitos reactivos (astrogliosis) y la muerte neuronal se analiza usando anticuerpo caspasa-3 (en rojo) y DAPI para marcar núcleos (en azul) (Soto and Satani, 2011).

Las EETs se pueden agrupar según el huésped y la etiología. Estas enfermedades pueden ser de origen genético, infeccioso o esporádico. A continuación se explican las prionopatías en humanos.

2.2.1. Enfermedades priónicas en humanos

Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

A pesar de que la CJD es la enfermedad priónica más común en los humanos, anualmente, se diagnostica a 1-2 individuos por cada millón de la población mundial. Su origen puede ser esporádico, iatrogénico, familiar o genético (Gambetti et al., 2003, Sikorska et al., 2012).

El CJD esporádico (sCJD) se caracteriza por un curso de la enfermedad rápido presenta demencia progresiva, alteraciones visuales y en el cerebelo, mioclonía y mutismo. Generalmente, la enfermedad empieza entre los 55-75 años. Desde la aparición del primer síntoma, la supervivencia de la enfermedad es corta ya que dura de 3 a 6 meses, en muchos casos no llega a los 2 años.

El CJD iatrogénico presenta signos similares al sCJD, es debido a la transmisión del patógeno durante la práctica médica, como tratamientos hormonales o cirugía.

Formas genéticas de CJD presentan una mutación en el gen de la PrP^c, los síntomas son también similares al sCJD, pero la duración de la enfermedad es más larga (Kovacs et al., 2002).

La variante de CJD (vCJD) se caracteriza por alteraciones del comportamiento, pérdida de memoria, cambios de personalidad y depresión. Posteriormente, el individuo presenta síntomas neurológicos en forma de alteraciones sensoriales, ataxia, mioclonía y demencia progresiva. Es debido a la ingesta de alimentos contaminados que provienen de ganado vacuno que padece encefalopatía espongiforme bovina (BSE, del inglés bovine spongiform encephalopathy). Normalmente, aparece alrededor de los 26 años y alrededor de 15 meses después del primer síntoma clínico el individuo fallece (Spencer et al., 2002).

Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker

Es una forma de EET, hereditaria autosómica dominante causada por una mutación en el gen de la proteína PrP^c, muchos pacientes de GSS presentan la mutación P102L. Se caracteriza por un inicio temprano de la enfermedad entre los 30 y 60 años, y una progresión entre 6 meses y 13 años. Afecta a 1 de cada 100 millones de individuos al año. Los síntomas clínicos son pérdida de memoria, ataxia cerebelar progresiva, demencia, disartria y dismetría ocular (Kovacs and Budka, 2009, Matamoros-Angles et al., 2017).

Insomnio familiar fatal

Es una enfermedad hereditaria priónica dominante autosómica causada por la mutación D178N en el gen de la proteína PrP^c, y ligada al polimorfismo M129V. El insomnio familiar fatal se caracteriza por un severo desorden en el sueño, disautonomia, comportamientos anormales y disfunciones en el sistema motor. Se caracteriza por una atrofia primaria selectiva del núcleo talámico que se expande hacia otras zonas cerebrales debido a la progresión de la enfermedad. Se han reportado unos 100 casos hasta el día de hoy. La enfermedad aparece entre los 20 y 72 años con una esperanza de vida de entre 8 y 72 meses (Llorens et al., 2017b).

También, se ha descrito una forma esporádica de la enfermedad, que no está ligada a mutaciones en el gen de *Prnp*, y que presenta un fenotipo similar al insomnio familiar fatal (Montagna et al., 2003).

<u>Kuru</u>

Esta enfermedad se ha identificado geográficamente en Papúa Nueva Guinea. Debido a los rituales de canibalismo que realizan, órganos de humanos son ingeridos por mujeres y niños. Así, se produce una infección priónica entre humanos. Kuru presenta un progreso infectivo rápido y sus signos clínicos son ataxia cerebelar, temblores y movimientos lentos e involuntarios.

La incidencia aumentó en los años 1940 y 1950. En los años 50, el 1-2% de la población murió debido a esta enfermedad. En los años siguientes, el número de casos de Kuru ha disminuido y parece que la enfermedad se ha extinguido, aunque no se puede asegurar, ya que el período de incubación de la enfermedad puede llegar a los 50 años y en el futuro podría salir algún caso aislado (Liberski, 2013).

2.3. Gen PRNP

Estudios genéticos revelan que el gen *PRNP* se localiza en el cromosoma 20, región p12/p13 en los humanos y en el cromosoma 2 en ratón. El gen de *PRNP* Tiene una longitud de 20 kb y está compuesto de 2 exones en humanos o por 3 exones en rata o ratón. Además se han identificado genes parálogos en gallinas, anfibios, reptiles y peces pero no se ha descrito en organismos más primitivos como insectos, cefalópodos o protozoos (Mehrpour and Codogno, 2010).

Mutaciones en el gen de *PRNP* está ligado a las prionopatias. Siete diferentes mutaciones puntuales están asociadas a la enfermedad CJD, 10 mutaciones están asociadas a GSS y la mutación de 178N causa IFF. Se han descrito varios polimorfismos del gen, siendo el polimorfismo del codón 129, que puede constar de metionina o valina, importante en la manifestación y duración de la enfermedad. El análisis de tejidos humanos en adultos y fetos ha confirmado que *PRNP* es ubicuo pero su perfil

de expresión puede variar, los niveles más altos de expresión se observan en el sistema nervioso central y los testículos (Makrinou et al., 2002)

Se han descrito genes homólogos a PRNP.

PRND, que se localiza en el mismo locus de *PRNP* consta de 3 kb, contiene dos exones y codifica para una proteína de 179 aminoácidos, llamada Doppel, esta proteína comparte similitud en estructura y tipología con PrP^c. Doppel comparte aproximadamente el 25% de la secuencia de aminoácidos con el carboxilo terminal globular de PrP^c y se expresa en varios tejidos durante el desarrollo fetal aunque en los astrocitomas, un tumor glial, *PRND* se sobreexpresa, y Doppel se localiza en el citoplasma de las células tumorales (Sakaguchi, 2007).

El tercer gen que se encuentra en este locus, es *PRNT* solo se ha identificado en el humano. *PRNT* presenta tres splicing alternativos, y se expresa exclusivamente en los testículos del adulto. Podría ser que este gen no codificara para ninguna proteína.

La proteína Shadoo que se codifica por el gen *SPRN*. *SPRN* se encuentra en el cromosoma 7 de los ratones y en el cromosoma 10 de los humanos. Su expresión es estrictamente cerebral y tiene ciertas similitudes con *PRNP* (Watts et al., 2007).

2.4. Estructura de la proteína priónica celular (PrP^c)

La proteína priónica celular o PrP^c es una glicoproteína de 253 aminoácidos en humano, altamente conservado entre especies, su peso molecular es de 25 a 35kDa en geles de poliacrilamida. La PrP^c contiene un péptido señal de los aminoácidos 1 al 22 y consta de tres dominios; el dominio amino terminal, el dominio central y el dominio carboxilo terminal (Linden et al., 2008, Mehrpour and Codogno, 2010) (Figura 11).

Dominio amino terminal: este dominio es largo y flexible, sin estructura secundaria. Una vez escindido el péptido señal, le sigue una región polibásica (aminoácidos 23 al 27) importante para el correcto tráfico intracelular. Contiene una región repetitiva compuesta por octapéptidos de la secuencia PHGGGWGQ (aminoácidos del 51 a 90). Dada esta secuencia de repeticiones de ocho aminoácidos (OR, del inglés octarepeats), hay varios residuos de histidina que le confieren la capacidad de unirse a cobre, y se conoce que el cobre induce la endocitosis de PrP^c. Además la expansión del dominio del octarepeat se define como la causa genética de las prionopatias.

Dominio central: este dominio incluye dos partes, el clúster con carga (CC), de los aminoácidos 95 al 111, que presenta carga positiva y la región hidrofóbica (HR, del inglés hydrophobic region), de los aminoácidos 112 al 130, que en alguna formas de PrP^c se usa como anclaje transmembrana.

Dominio carboxilo terminal: está estructurado y es globular, incluye tres estructuras en hélices alfa y dos secuencias que forman estructuras en beta. Además contiene dos sitios de glicosilación, con lo que la proteína puede estar no glicosilada, mono y di glicosilada, estas tres formas de la proteína se encuentran simultáneamente presentes en la célula. Esta proteína también presenta un puente disulfuro entre la cisteína 179 y la cisteína 214, la cual es esencial para el correcto plegamiento de la proteína. Finalmente, presenta un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI) del aminoácido 231 al 253, por lo que, está anclada a membrana.





La PrP^c es una glicoproteína ubicua, altamente conservada entre los mamíferos, el RNA mensajero (mRNA) de PrP^c durante la embriogénesis se expresan en el tubo neural de los ratones y sus niveles de expresión aumentan en el cerebro mientras el desarrollo avanza. En el sistema nervioso central del adulto, PrP^c y su mRNA se distribuyen en las neuronas de la neocorteza y del hipocampo, células de purkinje cereberales, y motoneuronas. Se localiza en membranas sinápticas y dominios presinápticos, sobretodo en balsas lipídicas, por lo que a PrP^c se la involucra en la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal. Aun así, grandes cantidades de esta proteína se han encontrado en el corazón, en el músculo esquelético, en tejidos intestinales, el útero y los testículos. También, se expresa en el sistema inmune, en células madre hematopoyéticas y compartimentos mieloides y linfoides maduros (Sarnataro et al., 2017).

El dominio GPI

El dominio GPI maduro se sintetiza en el RE y es transferido a la proteína por una transamidasa GPI que simultáneamente escinde el péptido señal del carboxilo terminal para unir el GPI. Estos dominios tienen diversas funciones descritas y pueden estar envueltos en distintas vías biológicas, como la transducción de señales, respuesta immunológica y en la patogénesis de las prionopatias (Nosjean et al., 1997, Chesebro et al., 2005). Pero, son críticos para el mantenimiento de la morfologia celular de la proteína, dada la estructura compleja del dominio GPI (Figura 12) se sugiere que GPI podría presentar alguna función biológica, como un segundo mensajero de los receptores de la célula.

Recientemente, se ha descrito un rol importante para el dominio GPI, este podría formar parte de la patogénesis de las enfermedades priónicas. Animales transgénicos que expresan una forma de PrP^c sin el dominio GPI en las neuronas demuestran que PrP^c no se expresa en la membrana celular pero sí que se encuentra en el lumen del RE y al aparato de Golgi, incluso se encuentra secretada en el medio extracelular. Animales transgénicos inoculados con el prión, PrPsc, no desarrollan síntomas clínicos típicos de una enfermedad priónica, están sanos y son viables pero los cerebros de estos animales presentan placas amiloides de PrPsc. Por lo tanto, es posible que la falta del dominio GPI no pare la replicación de PrP^{sc} que termina depositando, pero probablemente previene la neurotoxicidad. Por otro lado, en células infectadas con prión, la ausencia del dominio GPI reduce la conversión, aun así este PrP sin el dominio GPI puede convertirse a PrPsc, esto sugiere que el cambio conformacional de PrPc a PrPsc necesita la unión a la membrana lipídica (Chesebro et al., 2005). No solo eso, sino que la fusión de PrP^c con un dominio transmembrana en el carboxilo terminal bloquea la conversión a PrP^{sc} y este tipo de PrP^c no se encuentra en las balsas lipídicas (Kaneko et al., 1997).

Se ha investigado mucho sobre los mecanismos intercelulares usados para la propagación de la forma PrP^{sc} y si su anclaje a membrana podría modular esta característica (Caughey et al., 2009). Esta propagación podría ser debido a la división celular, contacto celular, exosomas y nanotubos (Porto-Carreiro et al., 2005, Gousset and Zurzolo, 2009). Cualquiera de estos procesos podría incluir una transferencia intercelular de membrana conteniendo PrP^{sc}. Especificamente, el uso de nanotúbulos se ha observado en el interior de los orgánulos de la via endolisosomal y que resulta en la acumulación celular de PrP^{sc} (Zhu et al., 2015b). Otros estudios han publicado que el dominio GPI de la PrP^{sc} da lugar a la formación de oligómeros que aumentan la actividad neurotóxica e infectiva pero limita la formación de placas amiloides en el citosol (Caughey et al., 2001, Silveira et al., 2005).



Figura 12. Representación esquemática del dominio GPI de PrP^c**.** Muestra un grupo alquil-acil glicerol, cuatro grupos fosfato, uno inositol, una glucosamina, una NAc-galactosamina, una galactosa, un grupo ácido siálico, tres grupos manosa y tres grupos etanolamina (Sarnataro et al., 2017).

2.5. Biosíntesis de PrP^c

PrP^c es una proteína que sufre varios cambios postraduccionales en el RE o aparato de Golgi. En el RE el péptido señal del amino terminal se escinde y el del carboxilo terminal se escinde y se une al dominio GPI, posteriormente, se unen dos cadenas de oligosacáridos y se forma un puente disulfuro entre las cisteínas 179 y 214. En el aparato de Golgi, las cadenas de oligosacáridos son modificadas y se añade ácido sálico. PrP^c es hidroxilada en la prolina 44. Finalmente, llega a la membrana celular donde se ubica en balsas lipídicas.

2.5.1. Procesamiento proteolítico

PrP^c es una proteína que sufre un proceso endoproteolítico; existen dos procesos de escisión, α-cleavage y β-cleavage. Bajo condiciones fisiológicas, α-cleavage ocurre en el dominio hidrofóbico, entre los aminoácidos 110/111 (región importante para la conversión de PrP^c), produce el fragmento carboxilo terminal de 17 kDa, llamado C1. C1 está anclado a la membrana plasmática mientras que el fragmento amino terminal, de 9 kDa se denomina N1.

 β -cleavage ocurre dentro o al lado de las regiones de octarepeats, entre los amimoácidos 90/91 dando lugar a los fragmentos llamados C2 y N2.

El fragmento C1 cambia al fragmento C2 bajo condiciones patológicas, la endoproteolisis de la proteína seguramente juega un papel importante en la propagación de PrP^{sc}. Durante la enfermedad, α -cleavage ocurre menos frecuentemente que β -cleavage (Sarnataro et al., 2017).

Experimentos realizados en cultivos celulares infectados con prión, sugieren que los niveles de β -cleavage son elevados y eso aumenta los niveles de ROS (del inglés reactive oxygen species), lo cual correlaciona con el aumento de la conversión priónica (Watt and Hooper, 2005).

2.5.2. Topología

PrP^c es una proteína anclada a la membrana celular, específicamente en balsas lipídicas, mayoritariamente, se encuentra hacia el espacio extracelular. Otras formas de PrP^c también se han descrito, PrP^{Ntm} y PrP^{Ctm}. El dominio GPI que se encuentra en el carboxilo terminal es el responsable de las dos formas transmembrana que puede adoptar PrP^c aunque no sean comunes forman parte de la biosíntesis de la proteína. PrP^{Ntm} tiene el amino terminal en el lumen del RE mientras que PrP^{Ctm} expone el amino terminal hacia el lado citoplasmático (Udenfriend and Kodukula, 1995, Sarnataro et al., 2017).

PrP^{Ntm} y PrP^{Ctm} comparten la misma región hidrofóbica, llamada TM1 la cual se localiza en los aminoácidos 111-134, pero ambos tipos se extienden hacia el otro lado de la membrana, el espacio intracelular. Su generación se debe a un inusual stop en la cadena polipeptídica y una regulación ineficiente de la secuencia señal del amino terminal que previene la translocación cotranslacional de la PrP^c. En animales transgénicos que expresan estas formas de PrP^c se ha descrito un fenotipo patológico. De hecho, se ha observado que alteraciones en el delicado balance de las distintas formas de PrP^c incrementa la expresión de PrP^{Ctm} dando lugar a una prionopatía (Hegde et al., 1998, Hegde et al., 1999).

2.5.3. Endocitosis e internalización

PrP^c se puede rápidamente internalizar de la membrana celular. Esta internalización puede ser crucial para desempeñar sus funciones. El mecanismo de internalización de PrP^c aún no se conoce del todo ya que tanto la endocitosis dependiente de clatrina como dependiente de caveola podrían estar operativas, y ambos podrían ser igual de importantes (Aguzzi et al., 2008).

Para la endocitosis dependiente de clatrina, PrP^c necesita abandonar las balsas lipídicas antes de internalizarse, dado que la estructura rígida de las balsas lipídicas impide que

las proteínas involucradas en la cobertura puedan llegar a la localización idónea para empezar la endocitosis. Cuando PrP^c se une a los iones de cobre mediante los octarepeats (Sunyach et al., 2003, Taylor et al., 2005b), PrP^c abandona las balsas lipídicas y parece que después el receptor lipoproteico de baja densidad (LRP1, del inglés low-density lipoprotein receptor-related protein 1) modula la endocitosis de PrP^c (Taylor and Hooper, 2007), también los proteoglicanos de sulfato de heparina forman parte del complejo para endocitar la PrP^c (Sunyach et al., 2003) aunque se desconoce cómo actúan en concreto.

2.6. Interacción con otras proteínas

Se describe que PrP^c puede ejercer su función mediante la interacción con otras proteínas de la superficie celular. Proteínas ancladas a membrana por un dominio GPI necesitan interaccionar con un adaptador transmembrana para influenciar en la señalización intracelular. También, se ha definido la PrP^c como un receptor, esto podría explicar parte de las funciones descritas (Aguzzi et al., 2008). Muchas de estas interacciones tienen un papel en la función de las vesículas sinápticas. Aunque, desafortunadamente, la relevancia fisiológica de muchas uniones se desconoce.

Varias proteínas pueden unirse a PrP^c, receptores (de glutamato o acetilcolina) (Beraldo et al., 2011, Carulla et al., 2011), proteínas de membrana (integrina β 1, proteoglicanos) (Lofgren et al., 2008, Loubet et al., 2012), laminina (Beraldo et al., 2011), insulina (Zhu et al., 2015a) y también con proteínas G (Adgrg6) expresadas en células de Schwann (Kuffer et al., 2016). De hecho, existe una larga lista de moléculas que interaccionan con PrP^c (Aguzzi et al., 2008) (Wulf et al., 2017).

No obstante, no solo pueden unirse proteínas sino que también amiloides. Péptidos diseñados en hoja β (Kuffer et al., 2016) y la propia conformación Scrapie de PrP^c se unen a PrP^c (Aguzzi et al., 2013). Recientemente, se ha descrito que el dominio flexible de PrP^c se une a los β -amiloide que están presentes en la EA y esta unión tiene efectos neurotóxicos (Nygaard and Strittmatter, 2009),

2.7. Funciones fisiológicas

PrP^c está implicada en distintas funciones neuronales fisiológicas como la proliferación y diferenciación celular (Steele et al., 2006), la homeostasis del cobre (Vassallo and Herms, 2003), la neuroprotección en Alzheimer e isquemias (McLennan et al., 2004, Vergara et al., 2015) entre otras. Además, es el principal actor en la replicación del prión.

Estudios en ratones deficientes de la PrP^c no han deslumbrado la verdadera función de esta proteína. Estos animales son viables, fértiles y no muestran defectos anatómicos o de desarrollo. Aunque en el hipocampo se han reportado anormalidades

en la estructura y electrofisiologia, también hay pérdida de las células de purkinje en el cerebelo y cambios tanto en la memoria como en el aprendizaje, y alteraciones en los ritmos circadianos (Legname, 2017, Sarnataro et al., 2017). A continuación, se describen algunas de las funciones más estudiadas de PrPc.

PrP^c en la homeostasis del cobre

Distintos estudios explican la función de PrP^c en el metabolismo del cobre, es un metal esencial que se requiere para catalizar la actividad de varias enzimas. PrP^c se une a iones de cobre mediante cuatro histidinas que se encuentran en las repeticiones de los OR (Brown et al., 1997). Esta unión es dependiente del pH y en presencia de cobre, el amino terminal de PrP^c flexible se convierte en una proteina más estructurada. Una vez unido a cobre, PrP^c se endocita via clatrina. En animales transgénicos que no expresan *PRNP*, se describe un 50% menos de la concentración de cobre en la sinapsis (Herms et al., 1999). Esto podria indicar que PrP^c regula la concentación de cobre en la sinapsis. Así, la unión de PrP^c al cobre, afavorece la reducción de Cu²⁺ a Cu⁻ y previene la formación de ROS (Liu et al., 2011). En las células de animales que no expresan PrP^c, muestran una menor resistencia al estrés oxidativo.

PrP^c en el sistema immune

El sistema immune presenta un papel importante en las enfermedades prionicas, la PrP^c se expresa en las células del sistema hematopoyético, donde puede estar implicada en la renovación de las células madre hematopoyéticas (Isaacs et al., 2006).

El rol de PrP^c en la inmunidad adaptiva e innata es complejo. PrP^c se expresa en compartimentos mieloides y limfócitos maduros, como limfocitos T y B, células natural killer (NK), plaquetas, monocitos y células dendríticas. Cuando los limfocitos T se activan, eso resulta en una sobreregulación de PrP^c. La PrP^c de los limfócitos T interactúa con la proteina asociada a la cadena zeta 70 (ZAP-70, del inglés zeta-chain associated protein-70), una señal transduccional responsable de la activación y proliferación de las células T. La expresión de interleuquina-2 por las células T aumenta en presencia de PrP^c. Por lo tanto, PrP^c podria tener importancia en el desarrollo, activación y proliferación de las células T (Hu et al., 2008, Mehrpour and Codogno, 2010).

PrP^c en el sistema olfativo

Recientemente, usando animales deficientes en el gen *PRNP*, se ha reportado la importancia de PrP^c en el procesamiento normal de la información que proviene del sistema olfativo. Estos hallazgos sugieren la necesidad de PrP^c para la percepción del olor. En resumen, se cree que PrP^c esta involucrado en el desarrollo del sistema

nervioso central y su diferenciación, a la vez que el crecimiento neurítico implicado en el sistema olfativo (Le Pichon et al., 2009, Wilson and Nixon, 2009).

PrP^c en la sinapsis

La sinapsis se ha descrito como un punto importante en la transmisión priónica. Muchos estudio de microscopia electrónica muestran que PrP^c se localiza en los botones sinápticos, principalmente en la presinapsis (Fournier et al., 1995, Moya et al., 2000). Aunque otros estudios describen una distribución más amplia de PrP^c (Mironov et al., 2003). La pérdida de la sinapsis y la deposición de PrPsc en los terminales sinápticos son cambios patológicos que ocurren en las enfermedades prionicas, pacientes con encefalopatías espongiformes presentan una reducción de la neurotransmisión y de vesículas sinápticas como los exosomas en el cerebro (Ferrer et al., 1999). Ratones y hamsters infectados con prión presentan registros electrofisiológicos de corteza e hipocampo anormales, esto refuerza la idea del daño sináptico en las enfermedades prionicas (Barrow et al., 1999). En estadios tardios de la enfermedad, las acumulaciones de PrPsc en los sinaptosomas correlacionan con las alteraciones en el sistema GABAérgico (Bouzamondo-Bernstein et al., 2004).

En ratones deficiendes de la PrP^c, los niveles de la transmisión glutamatérgica, receptores GABAA que modulan la inhibición rápida y la hiperpolarización se ven reducidos o son nulos (Carleton et al., 2001, Mallucci et al., 2002). Algunos de estos hallazgos se pueden explicar por las alteraciones en las corrientes de calcio y potasio (Herms et al., 2001).

PrP^c y la antiapoptosis

Neuronas derivadas de animales que no expresan la PrP^c son más susceptibles a la inducción de la apoptosis, cuando estas se deprivan de suero (Kuwahara et al., 1999). Aunque, muchas estudios indican que PrP^c tiene una función citoprotectora.

PrP^c inhibe la conformación proapoptótica de Bax y del citocromo c producidos por la mitocondria (Roucou et al., 2005). En la búsqueda de proteínas que protegen las células cancerosas de la apoptosis, se ha usado una línea celular, MCF-7 de cáncer de pecho, resistente a la apoptosis inducida por TNF- α , en este contexto PrP^c esta extremadamente sobreexpresada. La sobreexpresión de PrP^c en MCF-7 convierte las células sensibles a la apoptosis por TNF- α en células resistentes (Diarra-Mehrpour et al., 2004).

Los niveles de PrP^c aumentan después de una infarto cerebral (Shyu et al., 2005).Por otro lado, en modelos murinos isquémicos que no expresan PrP^c mantienen niveles más altos de infarto cerebral que los animales que expresan PrP^c (McLennan et al., 2004). Además, la sobreexpresión de adenovirus que expresan PrP^c reducen las infartos cerebrales en cerebros de rata y hay mejoras neurológicas después de un infarto isquémico (Shyu et al., 2005). Algunos grupos han publicado que ratones deficientes en PrP^c aumentan la activación de la caspasa-3 después de una isquemia. También, un aumento en la fosforilación de Erk-1/-2, STAT-1, and JNK- 1/-2 se ha identificado, sugiriendo que PrP^c está involucrado en la señalización celular (Spudich et al., 2005), además, una reducción en la fosforilación de Akt en la materia gris sugiere que en ausencia de PrP^c la vía antiapoptótica de fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt no está absolutamente activa (Weise et al., 2006).

PrP^c en el comportamiento

Dado que PrP^c se expresa en el hipocampo, la habilidad del aprendizaje se ha estudiado en animales que no expresan dicha proteina. Ratones colocados en una piscina deben aprender a encontrar una plataforma sumergida que reside siempre en la misma posición, para guiarse tienen objetos en el exterior de la piscina. Esta navegación requiere una gran abilidad cognitiva, en los casos donde el hipocampo esta dañado se demuestra una gran dificultad. Los resultados demuestran que no hay diferencias significativas en el aprendizaje entre animales que expresan o no PrP^c (Bueler et al., 1992).

Por otro lado, durante el reconocimiento de un objeto nuevo los animales transgénicos que no expresan PrP^c, aumentan su actividad motora y muestran niveles más bajos de ansiedad.

2.8. Isoformas del gen PRNP

2.8.1. La hipótesis del prión

La hipótesis del prión mantiene que las EETs son enfermedades infecciosas causadas por la conversión de una proteína que el huésped codifica, sensible a proteasas, conocida como la PrP^c, a una proteína aberrante, la PrP^{sc}, que es resistente a proteasas. La hipótesis también establece que el agente infeccioso es una proteína, ya que no contiene ácidos nucleicos. Ya sea por sus mutaciones o por un proceso infectivo exógeno, PrP^c cambia su conformación a PrP^{sc}. PrP^{sc} que es insoluble se deposita en el citoplasma y es capaz de generar más formas aberrantes de PrP^c, generando así un pérdida de la propia proteína endógena y aumenta la cantidad de PrP^{sc}, que termina fibrilando y forma agregados, esta agregación es el evento patogénico que da lugar a la neurodegeneración (Aguzzi and Sigurdson, 2004).



Figura 13. Las dos conformaciones del gen *PRNP*. A) Estructura de la PrP^c, la mayoría de su estructura es en hélice α ; 42% hélice α / 3% láminas β . B) Estructura de PrP^{sc} contiene láminas β ; 30% hélices α / 43% láminas β .

Claramente, estas dos isoformas de la proteína presentan una estructura diferente. PrP^c presenta mayoritariamente estructura en hélice α y dos láminas β , mientras que la PrP^{sc} presenta un gran contenido de láminas β en lugar de hélices α (Huang et al., 1994, Huang et al., 1995) (Figura 13). Esta conformación le confiere a PrP^{sc} resistencia a altas temperaturas, a la radiación ionizante y a la luz ultravioleta (Alper, 1972). Además, PrP^{sc} es resistente a enzimas proteolíticas como la proteinasa k e insolubilidad. Ambas tienen localizaciones distintas en la célula. Pero su peso molecular es similar y las dos mantienen sus dos sitios de glicosilación.

Dado que PrP^c es una proteína de membrana y los depósitos de PrP^{sc} se hallan en el citoplasma, el dominio GPI se ha investigado cautelosamente para entender qué papel tiene en la conversión de PrP^c a PrP^{sc}. Además, el dominio carboxilo terminal es la región resistente a la proteinasa k, y que tiene tendencia a formar agregados para formar los depósitos de PrP^{sc} (Aguzzi and Calella, 2009). Aun así, animales transgénicos que expresan una PrP^c sin su dominio GPI (*anchorless*) fueron infectados, desarrollaron una prionopatía, pero no mostraban síntomas clínicos (Chesebro et al., 2005).

Además, experimentalmente se distinguen dos tipos de proteína PrP^{sc}, después de ser tratadas con proteinasa k, según como se separan en un gel de poliacrilamida se pueden distinguir los tipos 1 y 2 (Gambetti et al., 2003, Cali et al., 2006). El tipo 1 afecta la corteza mientras que el tipo 2 es más abundante en el cerebelo. No obstante, ambos tipos se localizan en la corteza parietal.

2.8.2. Modelos de conversión de PrP^c a PrP^{sc}

A pesar de la intensiva investigación durante años, la hipótesis del prión aún no se conoce si es del todo correcta. Si el prion consiste enteramente de la forma PrP^{sc} o si se ayuda de otras proteínas. La forma PrP^c se podría convertir a la PrP^{sc} mediante dos posibles modelos; el modelo de plegamiento o el modelo de nucleación-polimerización (Aguzzi and Sigurdson, 2004) (Figura 14).





<u>Modelo de plegamiento</u>: este modelo postula que el monómero PrP^{sc} es más estable que PrP^c. Tiene que existir una interacción directa entre la PrP^{sc} y la PrP^c, para formar un heterodímero con las dos conformaciones. PrP^c es inducida a transformarse a sí misma en más PrP^{sc}, ya que PrP^{sc} actúa como molde. La presencia de una gran barrera de energía puede prevenir la conversión espontánea de PrP^c a PrP^{sc}. No obstante, hay estudios in vitro que demuestran que una proteína rica en hélices α puede convertirse espontáneamente a una proteína rica en láminas β (Weissmann and Aguzzi, 1999, Satheeshkumar et al., 2004).

<u>Modelo de nucleación-polimerización</u>: este modelo propone que PrP^c y PrP^{sc} están en un equilibrio terminodinámico reversible, que en condiciones normales favorece a PrP^c. Por lo tanto, solo si muchas moléculas monoméricas de PrP^{sc} se agregan, podrán agregar más PrP^{sc}, así PrP^c cada vez más rápido adopta la forma de PrP^{sc}. La fragmentación de los agregados de PrP^{sc} aumenta el número de núcleos infecciosos, que podrán agregar más PrP^{sc} para replicar el agente infeccioso (Aguzzi and Sigurdson, 2004).

Los dos modelos coinciden en la necesidad de la presencia de PrP^c para que exista una infección por priones. De hecho, en los animales deficientes de *PRNP* se demostró que después de ser infectados con prión no desarrollaban una prionopatía, por lo tanto, se necesita la expresión de PrP^c endógena para la existencia de una enfermedad priónica (Weissmann et al., 1994).

2.9. Modelos murinos de PrP^c

A continuación se describen los modelos murinos de PrP^c (Weissmann and Flechsig, 2003, Steele et al., 2007).

Modelos Prnp-knockout

Las primeras líneas de animales transgénicos en los que se había delecionado el gen *PRNP* se generaron entre 1990-1995. Los primeros animales KO para PrP^c fueron llamados *Zurich I (ZH1)* (Bueler et al., 1992). Posteriormente, se desarrolló la línea animal *Edinburgh* (Manson et al., 1994), también KO para PrP^c. Ambos modelos animales no desarrollaban la enfermedad priónica tras la inoculación de prión (Bueler et al., 1993, Weissmann et al., 1994, Aguzzi et al., 2008). Aunque a primera vista no se observó ninguna diferencia en el fenotipo de los animales KO, más tarde se describieron alteraciones en la sinapsis (Collinge et al., 1994), una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo (Brown et al., 2002), y excitotoxicidad por glutamato (Rangel et al., 2007) y una desmielinización en el sistema nervioso periférico (Bremer et al., 2010). Además, al ratón *Edinburgh* se le asociaron alteraciones en los ritmos circadianos (Tobler et al., 1996) y déficits cognitivos (Criado et al., 2005) (Linden et al., 2008).

Años más tarde, se generaron líneas nuevas de animales transgénicos deficientes en PrP^c. Las líneas animales *Nagasaki, RcmO* y *Zurich II* no resultaron ser buenos modelos animales ya que padecían ataxia cerebelar y pérdida de células de purkinje (Sakaguchi et al., 1996, Flechsig et al., 2003). En realidad, este fenotipo se debía a la sobreexpresión de *Prnd* (Shmerling et al., 1998).

El problema de los "flanking genes" y Zurich III

Los animales *Edinburgh* son la única línea animal que se generó en un fondo genético puro. No obstante, los animales *Edinburgh* presentaban muy poca descendencia con lo que resultaba difícil trabajar con esta línea animal (Gerlai, 1996). Aparte de los animales *Edinburgh*, todas las líneas animales *Prnp^{0/0}* disponibles se generaron en células madre embrionarias derivadas de la cepa 129/Sv y luego se mantuvieron en

animales C57BL/6J. Los animales de fondo genético mixto se denominaron B6.129 $Prnp^{0/0}$. Consecuentemente, material genómico proveniente de la línea 129/Sv flanquea el locus de *Prnp* que se localiza en el cromosoma 2. Los genes derivados de la cepa 129/Sv que rodeaban el locus de *Prnp* se denominaron "flanking genes". Para reducir el loci proveniente de la línea 129/Sv en los animales de fondo genético mixto, se retrocruzaron los animales B6.129 $Prnp^{0/0}$ con la línea C57BL/6J (Rangel et al., 2009, Carulla et al., 2015). A pesar de retrocruzar varias generaciones, el locus de *Prnp* persistía flanqueado por un 1% de genes derivados de la línea 129/Sv. Por lo tanto, era complicado concluir si el fenotipo se debía al fondo genético mixto o a la deleción del gen. Así pues, los "flanking genes" podían enmascarar el verdadero resultado cuando se comparaban animales *Prnp*^{0/0} con *Prnp*^{+/+} (Nuvolone et al., 2013).

Recientemente, se ha generado la cepa *Zurich III (ZH3)*. Esta cepa no muestra pérdida de células de purkinje ni una neurodegeneración asociada. Aunque, al igual que las otras cepas PrP^c KO, los animales *ZH3* presentan una neuropatía desmielinizante en el sistema nervioso periférico. Afortunadamente, los animales *ZH3* están desprovistos de los problemas que generan los "flanking genes" ya que se generaron mediante la técnica TALEN (del inglés, transcription activator-like effector nuclease) utilizando animales C57BL/6J (Nuvolone et al., 2016).

| Сера | Mecanismo de generación | Fondo genético |
|---------------------|--|-------------------|
| Wild Type (WT) | Ubicación del gen <i>PRNP</i> en el exón 3. Alrededor del gen <i>PRNP</i> hay zonas no codificantes (UTR). | Control |
| Zurich I (ZH1) | Reemplazamiento de los residuos que se encuentran en posición 4-187 mediante un casete Neo. | C57BL/6J x 129/Sv |
| Edinburgh (Edbg) | Interrupción del ORF (del inglés (Open Reading Frame) en la posición 93 e introducción de un casete Neo. | 129Ola |
| Nagasaki (Ngsk) | Reemplazamiento de parte del intrón 2, el ORF completo y parte del 3' UTR por un casete Neo. | C57BL/6J x 129/Sv |

En la Tabla 1 se recoge un resumen del mecanismo de generación y del fondo genético de las líneas animales que sirven como modelo de PrP^c KO.

| Rcm0 | Reemplazamiento de parte del intrón 2, el ORF completo y parte del 3' UTR por un casete HPRT. | C57BL/6J x 129/Sv |
|---------------------|---|-------------------|
| Zurich II (ZH2) | Reemplazamiento desde 0.27 kb del intrón 2 hasta 0.6 kb de la región adyacente al exón 3 con un lugar loxP. | C57BL/6J x 129/Sv |
| Zurich III (ZH3) | Deleción de 8bp en el exón 3 mediante TALEN. | C57BL/6J |

Tabla 1. Estrategias de generación de ratones Prnp-knockout. Se muestran las líneas de animales transgénicos KO para PrP^c existentes. Se explica el mecanismo para la generación de cada línea animal y el fondo genético. Neo: neomicina fosfotransferasa; HPRT: hipoxantina fosforribosil transferasa. loxP: secuencia derivada del bacteriófago P1. Adaptado de (Weissmann and Flechsig, 2003).

Modelos de sobreexpresión de PrP^c

En el caso de la PrP^c, la sobreexpresión de la PrP^c WT en un modelo animal KO da lugar a la presencia de acúmulos de PrP^c no funcional. La cepa Tga20 sobreexpresa la PrP^c WT murina sobre un animal KO. Los animales Tga20 presentan una excitabilidad neuronal incrementada (Rangel et al., 2009) y desarrollan ataxia y degeneración del sistema nervioso central y periférico a edades avanzadas (Westaway et al., 1994). Por lo tanto la sobreexpresión de PrP^c puede ser patogénica (Ma et al., 2002).

También, se generaron animales que sobreexpresan la PrP^c humana. La cepa denominada Tg340, sobreexpresa la PrP^c WT humana en un animal KO. Estos animales expresan en el codón 129 de PrP^c una Metionina (Padilla et al., 2011).

Modelos de expresión de formas truncadas de PrP^c

A parte de los animales KO y sobreexpresantes de PrP^c, también se generaron animales con regiones de PrP^c delecionada. Los animales que expresan formas truncadas de PrP^c presentan fenotipos distintos según la región delecionada. Estos animales transgénicos nos dan información sobre la función de cada región de PrP^c (Shmerling et al., 1998, Li et al., 2007a).

Región amino terminal

Los OR de la PrP^c parecen ser los principales mediadores de la neuroprotección de PrP^c en experimentos realizados *in vitro* ya que se ha observado que la sobreexpresión de

formas truncadas carentes de los OR o la inserción de repeticiones promueve la muerte celular y altera la susceptibilidad al estrés oxidativo (Sakudo et al., 2003, Yin et al., 2006). Contrariamente, modelos animales que carecen de los OR de PrP^c no presentan un fenotipo neurodegenerativo, por lo tanto esta región no es crítica para la función neuroprotectora de PrP^c (Shmerling et al., 1998, Li et al., 2007b). Más tarde, se ha relacionado esta función neuroprotectora a la región polibásica adyacente que corresponde a los residuos 23-31 (Turnbaugh et al., 2011).

Dominio central

En animales transgénicos se ha observado que la eliminación del CD da lugar a un fenotipo neurodegenerativo progresivo y letal (Baumann et al., 2007). Además, se ha observado que los péptidos sintéticos que mimetizan el dominio central de PrP^c resultan ser neurotóxicos *in vitro* (Gavin et al., 2005). El mutante en la región PrP Δ 105-125 presenta una toxicidad muy elevada, como se ha publicado parece que la falta de esta región produce un aumento de la afinidad de PrP^c por su hipotético receptor responsable de la cascada de señalización neurotóxica (Li et al., 2007a).

Mutaciones en la región hidrofóbica central de PrP^c da lugar a alteraciones en el procesamiento proteolítico de la proteína y de estructura, consecuentemente, se modifica su paso por el retículo endoplasmático y su orientación en la membrana lipídica. Esta forma transmembrana se ha relacionado con procesos neurodegenerativos (Hegde et al., 1998).

Región carboxilo terminal

El extremo carboxilo terminal de PrP^c consta del dominio GPI, el cual es necesario para el anclaje de la proteína a la membrana e importante para mantener la estructura de PrP^c. Los animales que expresan la PrP^c sin dominio GPI se denominan *anchorless*. Los animales *anchorless* expresan bajos niveles de PrP^c intracelular soluble y no se ha descrito un fenotipo patológico (Chesebro et al., 2005).

3. Reelina

3.1. Descripción general

Reelina es una glicoproteína secretable altamente conservada. Reelina está involucrada en el neurodesarrollo y en la plasticidad sináptica y aprendizaje del adulto. En el neurodesarrollo, Reelina se secreta por las células Cajal-Retzius (CR) que se localizan en la zona marginal (MZ, del inglés marginal zone) de la neocorteza. Reelina es esencial para la organización citoarquitectónica de la corteza e hipocampo (Del Rio et al., 1997, D'Arcangelo et al., 1999). También, se encarga de la correcta migración y localización de las células Purkinje, lo cual es necesario para la expansión de las células granulares durante el desarrollo del cerebelo (Mariani et al., 1977, Rakic and Caviness, 1995).

En los ratones adultos, un número reducido de células mantiene la expresión de Reelina ya que durante los primeros días de vida más del 95% de CR mueren por apoptosis. Reelina se sintetiza principalmente por interneuronas GABAérgicas de la neocorteza e hipocampo, por células mitrales glutamatérgicas del bulbo olfativo, células granulares del cerebelo y también se produce en células piramidales de la capa II de la corteza entorrinal y piriforme (Alcantara et al., 1998). En adulto, la expresión de Reelina es importante para regular la sinaptogénesis, la plasticidad neuronal, aprendizaje y memoria (Weeber et al., 2002, Lee and D'Arcangelo, 2016, Yu et al., 2016).

El gen de Reelina, *Reln*, en ratones y humanos está altamente conservado. En ratones, *Reln* se localiza en el cromosoma 5 mientras que en humanos se encuentra mapeado en el cromosoma 7q22. El gen contiene 65 exones que codifica un mRNA de 12 kb el cual se traduce a 3461 aminoácidos. La proteína de 450 kDa tiene una región central que consiste en ocho repeticiones, cada repetición está formada por 350-390 aminoácidos que presentan un motivo EGF {D'Arcangelo, 1995 #958}. El amino terminal está glicosilado y el carboxilo terminal es necesario para el correcto plegamiento de la proteína, una deleción en esta región resulta en una proteína sin estructura que impide la secreción de la proteína al medio extracelular. También, se ha sugerido que esta región es importante para la actividad intracelular (Del Rio et al., 1997, Knuesel, 2010). Reelina tiene dos lugares proteolíticos y produce un total de cinco fragmentos distintos. La función fisiológica de cada fragmento de Reelina se desconoce (Figura 15). Las metaloproteinasas dependientes de zinc de la familia astacina/adamalisina cortan en el lugar cercano al amino terminal, pero la identidad de las proteasas que cortan en el carboxilo terminal se desconocen (Knuesel, 2010).



Figura 15. Estructura proteica de Reelina. El gen de Reelina codifica una proteína con un peso molecular de 450 kDa. Reelina se procesa proteolíticamente por varias proteinasas en dos sitios para dar cinco fragmentos distintos (Knuesel, 2010).

3.2. Reelina en el desarrollo

Durante el desarrollo cerebral, los movimientos migratorios neuronales desde el lugar de nacimiento hasta su localización final son esenciales para la formación y correcto funcionamiento del circuito neuronal (Ohshima, 2014). La corteza cerebral está estructurada en seis capas horizontales (L1-L6) y cada capa contiene un tipo de población neuronal única.

En mamíferos, el desarrollo cortical empieza con la formación de la preplaca (PP), que en ratones corresponde al estadio embrionario 10.5 (E10.5). La PP está poblado por neuronas postmitóticas. Seguidamente, se forma la placa cortical (PC) a E11.5 que divide la PP en la subplaca y la MZ. La MZ dará lugar a la capa L1 mientras la PC desarrollará las capas de L2 a L6 y la SP se mantendrá debajo de la L6 en la corteza postnatal (Molliver et al., 1973, Rakic, 1976, Herrmann et al., 1994). Las células CR, originadas en la PP, son las primeras en migrar a la MZ. Las CR son de las primeras en madurar en la neocorteza y son las principales en secretar la proteína Reelina, la cual es importante para la laminación cortical normal ya que controla la organización de la PC (Bar et al., 2000, Yu et al., 2016).

Reelina se une a los receptores de membrana; VLDLR (del inglés very low density lipoprotein receptor) y a ApoER2 (del inglés apolipoprotein receptor 2). Esta unión

induce la fosforilación del adaptador proteico intracelular, Disabled 1 (Dab1) mediante la quinasa tirosina de la familia Src (SFKs) (Trommsdorff et al., 1998, Arnaud et al., 2003, Bock and Herz, 2003, Jossin et al., 2003, Kuo et al., 2005). Dab1 forsforilado activa los complejos Crk/CrkL-C3G, que estimulan Rap1 (del inglés Ras-proximate-1). Rap1 es importante para el control de la migración neuronal ya que estabiliza F-actina. Además, la unión de Reelina a sus receptores activa la vía fosfotidilinositol-3quinasa/proteína quinasa B (PI3K/AKT) que controla Tau, una proteína dedicada a la estabilización de microtúbulos. Por lo tanto, daños en la cascada de señalización que genera Reelina da lugar a una morfología anormal del hipocampo, cerebelo y neocorteza. Los animales que no expresan la proteína Reelina, llamados *reeler*, muestran una laminación invertida de la corteza cerebral (Figura 16), un pequeño cerebelo no laminado (Knuesel, 2010) y una laminación errónea del hipocampo que genera daños en la plasticidad sináptica y graves problemas en el aprendizaje (Goffinet, 1984).



Figura 16. Capas de la neocorteza. Esquema de la migración neuronal neocortical y los defectos del posicionamiento en animales deficientes de Reelina. A) Migración y localización laminar de la corteza desde el estadio embrionario 11.5 al 16.5. B) Animales *reeler*, muestran una corteza invertida (Kwan et al., 2012).

3.3. Reelina en adulto

Reelina también es importante en el cerebro del adulto a pesar de su baja expresión comparada durante el neurodesarrollo. Reelina está involucrada en varias respuestas neuronales y lleva a cabo varias funciones según la vía de activación.

En el adulto, Reelina sigue controlando el citosqueleto de actina y la dinámica de los microtúbulos. Una vez Reelina se une a sus receptores, se fosforila Dab1 que activa

principalmente la vía PI3K/Akt, que termina inhibiendo la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), la cual es una de las principales quinasas que fosforila la proteína Tau estabilizante de microtúbulos (D'Arcangelo et al., 1999, Bock et al., 2003). En estudios recientes de Reelina se indica que es necesaria para el desarrollo de la estructura dendrítica (Niu et al., 2004).

La unión de Reelina a VLDLR y ApoER2 en los terminales postsinápticos aumenta la neurotransmisión glutamatérgica ya que Reelina modula la actividad del receptor NMDA (del inglés N-methyl-D-aspartic acid) (Chen et al., 2005, Sinagra et al., 2005). Además, la señalización de Reelina a través de la vía dependiente de PI3K aumenta la transmisión sináptica de glutamato ya que aumenta la expresión de los receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico), este proceso es independiente a la actividad de Src (Qiu et al., 2006). Por lo tanto, Reelina adquiere funciones como modulador de plasticidad, lo cual está relacionado con la sinapsis, memoria y aprendizaje.

El receptor NMDA modulado por Reelina, contribuye a la activación de la vía MEK/Erk1/2 (del inglés extracelular signal-regulated kinases 1/2) dando lugar a la expresión de genes involucrados en el aprendizaje y plasticidad sináptica (Doehner and Knuesel, 2010). Sorprendentemente, aunque Reelina induce la fosforilación de Erk1/2 no requiere la actividad de ApoER2 y VLDLR y solo es parcialmente dependiente de Dab1. La activación de Erk1/2 y el aumento de calcio aumenta la fosforilación y translocación al núcleo del factor de transcripción CREB (del inglés cAMP-response element binding protein), que da lugar a la expresión de genes implicados en la sinapsis (Telese et al., 2015).

Experimentos realizados en cultivos neuronales han demostrado que Reelina aumenta el LTP (del inglés long-term potentiation) del hipocampo, LTP está definido como un mecanismo molecular implicado en el aprendizaje y memoria. Para el aumento de LTP mediado por Reelina, Reelina requiere la expresión de ambos receptores, VLDLR y ApoER2. Un splicing alternativo de ApoER2 es necesario para inducir un aumento de LTP dependiente de Reelina y formación de memoria *in vivo*. Molecularmente, Reelina se une a esta variante de ApoER2 que activa las quinasas de la familia Src que fosforilan la subunidad NR2A y NR2B del receptor NMDA a través de PSD95 (del inglés postsynaptic density protein 95) y este complejo genera un flujo de calcio en el terminal postsináptico (Beffert et al., 2005, Chen et al., 2005). Estudios genéticos a posteriori, demostraron que Dab1 también es necesario para el aumento de LTP en hipocampo (Trotter et al., 2013, Lee and D'Arcangelo, 2016)(Figura 17).

Además de todos los datos reportados sobre los efectos postsinápticos de Reelina, Reelina también tiene efectos presinápticos. Reelina mediante los receptores ApoER2 y VLDLR, PI3K y el flujo de calcio causa un aumento rápido de la neurotransmisión espontánea, este efecto se debe a la movilización de vesículas sinápticas que contienen VAMP7 (del inglés vesicle-associated membrane protein 7) (Hellwig et al., 2011, Bal et al., 2013).

La señalización termina cuando Dab1 ubiquitinizado es degradado por el proteosoma y Reelina se dirige al lisosoma, mientras que los receptores pueden ser reciclados a membrana (VLDLR) o también ir al lisosoma (ApoER2) (Bock et al., 2004, Morimura et al., 2005, Duit et al., 2010).



Figura 17. Cascada de señalización generada por Reelina. Reelina se une a VLDLR y ApoER2 en la edad adulta, participa en plasticidad sináptica, memoria y aprendizaje (Qiu et al., 2006).

En animales *reeler*, se expresa menos receptores de NMDA en el hipocampo, así se ratifica el hecho que Reelina es importante para el tráfico y generación de receptores glutamatérgicos. También, se estudió el comportamiento de ratones deficientes en uno de los receptores, VLDLR o ApoER2, estos animales muestran problemas en la memoria pero aparentemente presentan unas funciones motoras y coordinación normal a diferencia de los animales postnatales *reeler* o deficientes en Dab1 que presentan severos ataques atáxicos dado el fallo en el desarrollo cerebelar (Weeber et al., 2002).

3.4. Reelina en neurodegeneración

Como hemos explicado Reelina juega un papel importante en el cerebro adulto, promoviendo la maduración de las dendritas, la sinaptogénesis, la transmisión sináptica y la plasticidad. Así, se ha estudiado el papel de Reelina en distintas enfermedades. Por un lado, los animales *reeler* presentan un compartamiento similar a los casos de esquizofrenia (Costa et al., 2002). Por otro, gracias a estudios genéticos se

han identificado mutaciones en *Reln* involucradas en la epilepsia (Dazzo et al., 2015) y que pueden ser un factor de riesgo para el autismo (De Rubeis et al., 2014).

La implicación de Reelina también se ha estudiado en las enfermedades neurodegenerativas. De hecho, Reelina se ha propuesto como posible biomarcador de la EA.

Reelina en la Enfermedad de Alzheimer

En la EA se ha estudiado la expresión de Reelina, la activación de la señalización y la interacción con sus receptores. VLDLR y ApoER2 son miembros de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL, del inglés low-density lipoprotein), un grupo de receptores de lipoproteínas que se expresan en la superficie de las neuronas donde se unen a la apolipoproteína E (ApoE) y al colesterol secretados por células gliales. No obstante, VLDLR y ApoER2 también se han identificado como receptores de Reelina (D'Arcangelo et al., 1995, Hiesberger et al., 1999, Trommsdorff et al., 1999). Dado que estos receptores son compartidos, se cree que Reelina tiene un papel importante en la EA. Además, en la EA algunos polimorfismos del gen que codifica ApoE se consideran un riesgo para padecer dicha enfermedad y la unión de Reelina a sus receptores esta inhibida por ApoEɛ3 y ApoEɛ4 (D'Arcangelo et al., 1999).

La observación de animales *reeler* y deficientes en ApoER2 y VLDLR muestran acúmulos de Tau hiperfosforilada (Hiesberger et al., 1999). Tau, una proteína asociada a microtúbulos, se encuentra hiperfosforilada y forma acúmulos intraneuronales que dan lugar a la neurodegeneración, una marca típica de la EA. Las vías de señalización mediadas por Reelina e involucradas en la regulación de la fosforilación de Tau incluyen la actividad de GSK3 y de la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5, del inglés cyclin-dependent kinase 5). Por lo tanto, en condiciones fisiológicas Reelina inhibe la fosforilación de Tau mediante la vía de GSK3B (Beffert et al., 2002, Beffert et al., 2004).

In vitro, la presencia de Reelina en el medio de los cultivos celulares aumenta la proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP, del inglés amyloid precursor protein) y reduce la generación de los oligómeros de β -amiloide. Además, hay una interacción directa entre el dominio central de Reelina y el dominio extracelular E1 de APP, parece que esta unión es necesaria para el correcto crecimiento neurítico *in vivo* e *in vitro* (Hoe et al., 2009). También, se ha demostrado que Dab1 se puede unir al motivo citoplasmático NPxY de APP, esta unión parece afectar el tráfico y procesamiento de ApoER2 y APP. En células COS7, donde se sobreexpresa Dab1 resulta un aumenta de APP y ApoER2 en la superficie celular, y una reducción de la β -secretasa de APP (Hoe et al., 2006). Contrariamente, otros grupos reportan que bajo estas condiciones, la β -secretasa aumenta en células HEK y genera agregaciones, eso

se debe a que la β -secretasa procesa la proteína APP para su forma amiloidogénica (Parisiadou and Efthimiopoulos, 2007).

En pacientes que padecen la EA, hay cambios en los niveles de Reelina que dan lugar a la fosforilación anormal de Tau. Por otro lado, en casos tempranos de Alzheimer, hay una reducción drástica en el número de células CR y células piramidales de la capa II de la corteza entorrinal (Baloyannis, 2005, Chin et al., 2007). En LCR de la EA se ha identificado un aumento del fragmento 180 de Reelina, además, existen cambios en el patrón de glicosilación de Reelina (Saez-Valero et al., 2003, Botella-Lopez et al., 2006). Por otro lado, los niveles de mRNA de la secuencia completa de Reelina aumentan en la corteza frontal de la EA, eso podría deberse a cambios transcripcionales compensatorios, pero no se observa un aumento de la proteína entera o de 310 kDa en la EA, por lo que, en la EA hay alteraciones en el procesamiento proteolítico de la proteína Reelina (Hibi and Hattori, 2009). En el microscopio confocal, se ha encontrado que Reelina está asociada pero no colocaliza con las especies fibrilares de β -amiloide. Por otro lado, los depósitos de los oligómeros de β -amiloide muestran un alto grado de colocalización con Reelina (Doehner et al., 2010). Además, animales transgénicos que se usan como modelos de la EA, Reelina se localiza en las placas amiloides.

Reelina en otras enfermedades neurodegenerativas

Paralelamente, la expresión de Reelina se ha estudiado en la demencia frontotemporal (FTD, del inglés frontotemporal dementia). Se ha sugerido que la señalización de Reelina está involucrada en esta patología. En algunos casos de FTD, se ha identificado cambios en Tau. Dado que Tau forma parte de la cascada de señalización de Reelina, en Saez-Valero *et al.*, han publicado la detección de Reelina en LCR de FTD (Saez-Valero et al., 2003). Aunque no hay diferencias significativas entre los niveles de LCR de FTD y EA, la banda de 180 kDa de Reelina tiende a ser mayor en FTD que en pacientes de Alzheimer. Por otro lado, el deterioro de la cognición es peor en los casos analizados de FTD que de la EA. Aunque, poco se ha descrito del papel y cambios de expresión de Reelina en la EP. Se ha reportado una sobreexpresión del fragmento 180 de Reelina en el LCR de enfermos de Parkinson (Botella-Lopez et al., 2006).

Finalmente, las EETs y la EA comparten características neuropatológicas y moleculares. En las EETs, la PrP^c se convierte en una forma anómala resistente a proteinasa k, la PrP^{sc} (Prusiner, 1991). En la EA, la proteína APP debido a un proceso proteolítico da lugar a una superproducción del péptido β -amiloide (Mattson, 2004). La acumulación de PrP^{sc} y β -amiloide en el SNC resulta en la neurodegeneración. Además, recientemente se ha descrito la participación de PrP^c en la EA y la implicación de Dab1 en el procesamiento de APP. No obstante, los cambios de expresión de Reelina en las prionopatías no han sido estudiados.

OBJETIVOS

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común. La EP se caracteriza por la pérdida neuronal masiva en la sustancia nigra y por la presencia de agregados. Fue James Parkinson quién describió la *Parálisis Agitans* en 1817, que más tarde, se la denominó la enfermedad de Parkinson (EP). En 1912, Friedrich H. Lewy identificó agregados neuronales en distintas zonas del cerebro de pacientes de Parkinson. Estos agregados se denominan cuerpos de Lewy (LB, del inglés Lewy body) o neurita de Lewy (LN, del inglés Lewy neurite). El principal componente de estos agregados es la α -sinucleína.

Por otro lado, en 1982, Stanley B. Prusiner describió la proteína priónica celular (PrP^c), una proteína que debido a la conversión de su estructura adquiere patogenicidad. Este agente proteico infeccioso puede propagarse entre distintas especies y puede replicarse en el huésped a expensas de la misma proteína endógena. Así se conoce la famosa, propagación priónica. Pero recientemente, también se han descrito otras proteínas que pierden su estructura y pueden propagarse de célula a célula, como la α sinucleína.

Varios mecanismos se han descrito para la propagación de la α -sinucleína patológica. Algunas de las vías propuestas son la liberación de α -sinucleína a través de exosomas, internalización mediante endocitosis, receptor ligado a endocitosis o por difusión pasiva, e incluso, recientemente, se han descrito el papel de nanotúbos como posible mecanismo de propagación de α -sinucleína *in vitro*. Dado se ha descrito el papel de la PrP^c como posible receptor de los oligómeros de β -amiloides en la enfermedad de Alzheimer. Es así, como nos planteamos el posible papel de PrP^c como receptor de α sinucleína.

Por último, Reelina una glicoproteína secretable que juega un papel importante durante el neurodesarrollo, se ha estudiado en la enfermedad de Alzheimer (EA). Se ha observado que los niveles de Reelina aumentan en el cerebro y líquido cefaloráquideo en la EA. Previamente, en nuestro grupo se ha publicado las modificaciones de la proteína Disabled1 (Dab1) en prionopatías. Dab1 se localiza en el citosol y forma parte de la cascada de señalización de Reelina. Se ha mostrado la existencia de una correlación entre la deposición de PrP^{sc}, β -amiloide y la fosforilación de Dab1. También, se ha descrito que el péptido recombinante PrP (106-126) induce la fosforilación de Dab1 *in vitro*. Por lo tanto, debido a estas variaciones en Dab1, aquí describimos los niveles de Reelina en la enfermedad priónica de Creutzfeldt-Jakob y en las α -sinucleinopatías.

En base a estos hechos, el principal objetivo planteado en esta tesis doctoral es el estudio de la PrP^c en la EP como posible neuroreceptor y analizar la expresión de la Reelina en enfermedades neurodegenerativas.
Para llevar a cabo este estudio se plantean los objetivos que se exponen a continuación:

- Objetivo 1: Estudiar la propagación de las protofibrillas de α-sinucleína y formación de α-sinucleína fosforilada según la dosis genética de la PrP^c en modelos in vivo e in vitro mediante la inoculación de protofibrillas de α-sinucleína en animales Prnp^{0/0}, Prnp^{+/+} o sobreexpresantes de la proteína PrP^c (Tga20). Así como, el uso de dispositivos microfluídicos para monitorizar el transporte de α-sinucleína.
- Objetivo 2: Determinar el dominio de PrP^c implicado en la unión a las protofibrillas de α-sinucleina *in vitro*, mediante construcciones truncadas de PrP^c.
- Objetivo 3: Estudiar los cambios de expresión de Reelina en distintas enfermedades neurodegenerativas mediante el procesamiento de muestras humanas de corteza frontal.
- Objetivo 4: Analizar el aumento de Reelina en modelos animales inoculados con prión y cultivos celulares.

RESULTADOS

La presente Tesis Doctoral, titulada "Funciones de la proteína priónica celular, α sinucleína y Reelina en enfermedades neurodegenerativas", se presenta como un compendio de dos publicaciones realizadas durante el periodo de doctorado, Capítulo I y Capítulo III, junto con el Capítulo II con resultados no publicados.

<u>Capítulo I</u>

Involvement of Cellular Prion Protein in α -Synuclein Transport in Neurons.

Urrea L, Segura-Feliu M, Masuda-Suzukake M, Hervera A, Pedraz L, García Aznar JM, Vila M, Samitier J, Torrents E, Ferrer I, Gavín R, Hagesawa M, Del Río JA.

Mol Neurobiol. 2017 Feb 22. doi: 10.1007/s12035-017-0451-4. [Epub ahead of print].

Referencia: Urrea, L., M. Segura-Feliu, M. Masuda-Suzukake, A. Hervera, L. Pedraz, J. M. Garcia Aznar, M. Vila, J. Samitier, E. Torrents, I. Ferrer, R. Gavin, M. Hagesawa and J. A. Del Rio (2017). "Involvement of Cellular Prion Protein in alpha-Synuclein Transport in Neurons." Mol Neurobiol.

Capítulo II

Disease-specific Changes in Reelin Protein and mRNA in the Neocortex and Cerebrospinal Fluid in Neurodegenerative Dementias

Laura Urrea^{1,*}, Laia Lidón^{1,*}, Franc Llorens², Pau Pastor³, Inga Zerr⁴, Daniel Alcolea^{*}, Alberto Lleó^{*}, Rosalina Gavín¹, Isidre Ferrer⁵, José A. Del Río¹En preparación.

En preparación

<u>Capítulo III</u>

Reelin Expression in Creutzfeldt-Jakob Disease and Experimental Models of Transmissible Spongiform Encephalopathies.

Mata A*, Urrea L*, Vilches S, Llorens F, Thüne K, Espinosa JC, Andréoletti O, Sevillano AM, Torres JM, Requena JR, Zerr I, Ferrer I, Gavín R, Del Río JA.

Mol Neurobiol. 2016 Oct 10. [Epub ahead of print].

Referencia: Mata, A., L. Urrea, S. Vilches, F. Llorens, K. Thune, J. C. Espinosa, O. Andreoletti, A. M. Sevillano, J. M. Torres, J. R. Requena, I. Zerr, I. Ferrer, R. Gavin and J. A. Del Rio (2016). "Reelin Expression in Creutzfeldt-Jakob Disease and Experimental Models of Transmissible Spongiform Encephalopathies." Mol Neurobiol.

Capítulo I:

Involvement of Cellular Prion Protein in α-Synuclein Transport in Neurons

Urrea L, Segura-Feliu M, Masuda-Suzukake M, Hervera A, Pedraz L, García Aznar JM, Vila M, Samitier J, Torrents E, Ferrer I, Gavín R, Hagesawa M, Del Río JA.

Resumen:

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa que presenta agregados intracelulares llamados cuerpos de Lewy (LB, del inglés Lewy body) y pérdida neuronal en la sustancia nigra. La principal proteína que se encuentra agregada en los LB es la α -sinucleína. α -sinucleína es una proteína que se encuentra, mayoritariamente, en los terminales presinápticos. La forma desplegada de α -sinucleína, denominada oligomérica, es capaz de propagarse neuronalmente y formar agregados. Varios mecanismos se han descrito para la propagación de α -sinucleína, en este caso proponemos la proteína priónica celular (PrP^c) como receptor neuronal.

Animales con distinta dosis genética de *PRNP* son inoculados intracranealmente con protofibrillas de α -sinucleína de ratón. Cuarenta y cinco días después, se observa agregación de α -sinucleína fosforilada (p- α -sinucleína) en distintas zonas cerebrales. Los animales Tga20, que sobreexpresan la PrP^c, presentan mayor número de agregados de p- α -sinucleína. No obstante, los animales que no expresan PrP^c también pueden formar agregados de p- α -sinucleína aunque en menor grado.

Además, se desarrollan unos dispositivos microfluídicos para monitorizar el transporte de α -sinucleína *in vitro*. Los dispositivos constan de dos compartimentos que están separados entre ellos por cien microcanales que debido a su tamaño solo permiten el paso de los axones. Cultivos neuronales primarios provenientes de animales *Prnp^{+/+}*, *Prnp^{0/0}* y Tga20 son sembrados en estos dispositivos y tradados con protofibrillas de α -sinucleína. Observamos que en los casos que PrP^c se sobreexpresa, el transporte de las protofibrillas de α -sinucleína tiende a aumentar.

Finalmente, se analiza la unión de PrP^c y α -sinucleína. Las protofibrillas de α -sinucleína se unen con mayor afinidad a las células HEK293 transfectadas con PrP^c que en células transfectadas con un vector vacío. Analizamos el dominio de PrP^c implicado en esta unión. Anteriormente, se ha descrito que el dominio central cargado es necesario para la interacción con los β -amiloides. Mediante construcciones truncadas de PrP^c observamos que el dominio central cargado es la región implicada en la unión a α -sinucleín



Involvement of Cellular Prion Protein in α -Synuclein Transport in Neurons

Laura Urrea^{1,2,3,4} • Miriam Segura-Feliu^{1,2,3,4} • Masami Masuda-Suzukake⁵ • Arnau Hervera^{1,2,3,4} • Lucas Pedraz⁶ • José Manuel García Aznar⁷ • Miquel Vila^{8,9} • Josep Samitier¹⁰ • Eduard Torrents⁶ • Isidro Ferrer^{4,11,12,13} • Rosalina Gavín^{1,2,3,4} • Masato Hagesawa⁵ • José Antonio del Río^{1,2,3,4}

Received: 23 November 2016 / Accepted: 7 February 2017 © The Author(s) 2017. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract The cellular prion protein, encoded by the gene *Prnp*, has been reported to be a receptor of β -amyloid. Their interaction is mandatory for neurotoxic effects of β -amyloid oligomers. In this study, we aimed to explore whether the cellular prion protein participates in the spreading of α -synuclein. Results demonstrate that *Prnp* expression is not mandatory for α -synuclein spreading. However, although the pathological spreading of α -synuclein can take place in the absence of *Prnp*, α -synuclein expanded faster in PrP^C-overexpressing mice. In addition, α -synuclein binds strongly on PrP^C-expressing cells, suggesting a role in modulating the effect of α -synuclein fibrils.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12035-017-0451-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

José Antonio del Río jadelrio@ibecbarcelona.eu

- ¹ Molecular and Cellular Neurobiotechnology, Institute of Bioengineering of Catalonia (IBEC), Parc Científic de Barcelona, Baldiri Reixac 15-21, E-08028 Barcelona, Spain
- ² Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain
- ³ Center for Networked Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Barcelona, Spain
- ⁴ Institute of Neuroscience, University of Barcelona, Barcelona, Spain
- ⁵ Department of Dementia and Higher Brain Function, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan
- ⁶ Bacterial infections: antimicrobial therapies. Institute of Bioengineering of Catalonia (IBEC), Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain

Published online: 22 February 2017

Keywords Synuclein · Amyloid spreading · Prnp · Microfluidic devices

Introduction

The cellular prion protein (PrP^{C}) , a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein, participates in several neural functions [1–3]. Relevantly, one of the most recently described functions of the protein points to PrP^{C} is as a receptor for β -amyloid (A β) [4]. Indeed, today it is well established that A β oligomers can bind with great affinity to PrP^{C} [5, 6, 4, 7, 8] and to recombinant prion protein (e.g. [9,

- ⁷ Multiscale in Mechanical and Biological Engineering (M2BE), Aragon Institute of Engineering Research, Department of Mechanical Engineering, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain
- ⁸ Neurodegenerative Diseases Research Group, Vall d'Hebron Research Institute-Center for Networked Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain
- ⁹ Catalan Institution for Research and Advanced Studies (ICREA), Barcelona, Spain
- ¹⁰ Nanobioengineering Group, Institute for Bioengineering of Catalonia, (IBEC), Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain
- ¹¹ Institut de Neuropatologia, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Spain
- ¹² Departamento de Patologia y Terapeutica Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain
- ¹³ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Barcelona, Spain

Deringer

Mol Neurobiol

10]). After binding, it was also proposed, although with some controversy [9, 11-13], that this interaction plays a crucial role in neurotoxic effects of AB oligomers such as inhibition of long-term potentiation (LTP), neuronal cell death and memory impairment in some mouse models of Alzheimer's disease [14, 6, 4, 15–17]. Amyloid aggregates are present in many neurodegenerative diseases, and their formation occurs in a multistep process including the misfolding of healthy soluble proteins and their association into amyloid fibrils that form cell inclusions. In fact, among other aggregates (e.g. SOD1, CEPB3, TDP-43, etc.), those of Tau and α-synuclein, characteristic of tauopathies/Alzheimer's disease and Parkinson's disease, respectively, showed cell-to-cell transport in healthy cells through their uptake of misfolded polymers, which can propagate and spread throughout the neural parenchyma [18-23].

α-Synuclein is a key player in the pathogenesis of synucleinopathies, including Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy [24]. Transmission of synthetic α -synuclein aggregates has been demonstrated in several cellular and animal models (see [25–27] for reviews). Several groups have reported that α synuclein shows prion-like propagation in wild-type mice [28-30]. However, the basis of the spreading process remains poorly understood although cell-to-cell transport via exocytosis has been suggested [31-33]. For this reason, PrP^C is proposed as an AB receptor (see above), and in this study, we aimed to explore whether PrP^C is involved in the propagation and spreading of α -synuclein. Results demonstrated that α synuclein could propagate and spread in mice lacking or overexpressing Prnp, including wild-type mice. However, increased quantities of p- α -synuclein can be seen in the motor cortex of PrP^C-overexpressing mice as compared to Prnp⁺ and Prnp^{0/0} mice. In addition, in vitro experiments also corroborated that although not required to trigger a-synuclein transport, Prnp overexpression enhances transported α -synuclein. In fact, *a*-synuclein binds strongly to Prnp-transfected HEK293 cells in contrast to mock-transfected ones. Moreover, the absence of the charged cluster (CC) domain of PrP^{C} impairs α -synuclein binding in transfected cells. In conclusion, our results point to a non-mandatory but relevant role of *Prnp* in α -synuclein transport.

Material and Methods

Mouse Strains and Genotyping Adult male C57Bl6/129sv-*Prnp*^{0/0} (B6129 *Prnp*^{Zrchl/Zrchl} Zurich I) mice were purchased from the European Mouse Mutant Archive (EMMA, Monterotondo, Italy) [34]. We backcrossed to C57BL/6 J for at least 8–9 generations to obtain 6–7% of 129 microsatellites in B6.129 *Prnp*^{0/0} and control littermates B6.129 *Prnp*^{+/+} [35]. These *Prnp*^{0/0} and *Prnp*^{+/+} mice were used in the present

Deringer

study. Specific primers for Prnp genotyping were designed in our laboratory based on the original P3 and P10 primers as described [34]: neo: 5'-gccttctatcgccttcttgac-3'; 3' NCnew: 5'gctacaggtggataacccctc-3' and P10new: 5'cataatcagtggaacaagccc-3' [36]. Forty cycling conditions were 45" 95 °C; 45" 62 °C; 1' 72 °C, followed by a final extension at 72 °C for 5 min. Prnp-overexpressing mice (Tga20) were purchased from EMMA (Monterotondo, Italy). They were generated as described by Marek et al. [37] and backcrossed in our lab with B6.129 Prnp^{0/0} mice for seven generations [36]. The backcrossed mice were used in the study. For Tga20 mice, the transgene was detected using primers specific to the Tg20 allele 5'-caaccgacgtgaagcattctgccta-3' and 5'cctgggactccttctggtaccgggtgacgc-3' as indicated [38]. The Ethics Committee on Animal Experimentation (CEEA) of the University of Barcelona approved all procedures described in this study. All housing, breeding and procedures were performed under the guidelines and protocols #276/16 and #141/ 15 of CEEA.

Preparation of Recombinant α -Synuclein Monomer and Fibrils Mouse and human α -synuclein complementary DNAs (cDNAs) in bacterial expression plasmid pRK172 were used. a-Synuclein was expressed in Escherichia coli BL21 (DE3) cells and purified using boiling, Q-sepharose ion exchange chromatography and ammonium sulphate precipitation. Purified a-synuclein protein was dialyzed against 30 mM Tris-HCl, pH 7.5, and cleared using ultracentrifugation at 113,000g for 20 min. Protein concentration was determined with reverse phase HPLC. Proteins were loaded on an Aquapore RP-300 column (Brownlee) Perkin Elmer (Waltham, MA, USA) (equilibrated in 0.09% trifluoroacetic acid with a linear gradient of acetonitrile 0 to 50% at a flow rate of 1 ml/min). Purified mouse a-synuclein monomer (7 mg/ml) in 30 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 0.1% NaN3, was incubated at 37 °C in a shaking incubator at 200 rpm for 72 h. α-Synuclein fibrils were pelleted by spinning at 113,000g for 20 min and then suspended in PBS. α-Synuclein fibrils were sonicated with an ultrasonic homogenizer (VP-5S) Taitec (Nishikata, Japan) (at high power for 10 cycles (30 s on, 30 s off at 10 °C) before use. Aliquots of sonicated and non-sonicated fibrils were processed for transmission electron microscope (TEM) analysis and negative staining (Supplementary Fig. 1). In parallel, SDS-PAGE and western blot revealed the presence of a relevant 17 KDa and upper bands >35 KDa after sonication typical of protofibril preparations (Supplementary Fig. 1). To determine the concentration, fibrils were dissolved in 7 M guanidine hydrochloride and analysed with RP-HPLC as described above. Generated fibrils were tested to insure that they were endotoxin-free to avoid unwanted effects as described [39].

Mol Neurobiol

Transmission Electron Microscopy Procedures Fibril solutions were fixed to carbon-forward-coated copper supports, and negative staining was performed using a 2% PTA-based (phosphotungstic acid) stain (pH 7.4), after which samples were placed in silica-based desiccant for a minimum of 2 h. Finally, we proceeded to TEM observation using a Leica electron microscope (Wetzlar, Germany) at SCT, University of Barcelona, Barcelona, Spain (Supplementary Fig. 1).

Stereotaxic Surgery Five- to 6-month-old mice were anaesthetised with 50 mg/kg pentobarbital sodium and then were unilaterally injected with 5 μ g (1 μ g/ μ L solution) of recombinant mouse sonicated a-synuclein into postcommissural striatum (A-P 3.5 mm; M-L: 3.5 mm; D-V -0.9 mm from Bregma) at a rate of 0.1 µL/min. In parallel, some mice (n = 3) were sham-operated (Supplementary Fig. 1d). In these mice, the skull was opened and a glass pipette was placed in the abovementioned coordinates. After 10 min, the pipette was removed and the skin sutured. Shamoperated and fibril-injected mice were anaesthetised 45 days later with isofluorane and perfused with 4% buffered paraformaldehyde (pH 7.3). For immunohistochemistry, free-floating sections were rinsed in 0.1 M PBS, and endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in 3% H₂O₂ and 10% methanol dissolved in 0.1 M PBS. After extensive rinsing, sections were incubated in 0.1 M PBS containing 0.2% gelatin, 10% normal serum, 0.2% glycine and 0.2% Triton X-100 for 1 h at room temperature. Afterwards, the sections were incubated for 24 h at 4 °C with the primary antibody: p-αsynuclein (p129S, clone 81A (cat. ab184674), 1:2000 diluted, Abcam, Cambridge, UK). After that, the sections were incubated with secondary biotinylated antibodies (2 h, 1:200 diluted) and streptavidin-horseradish peroxidase complex (2 h, 1:400 diluted). Peroxidase activity was revealed with 0.025% diaminobenzidine (DAB) and 0.003% hydrogen peroxide. After rinsing, the sections were mounted onto slides, dehydrated and coverslipped with Eukitt[™] (Merck, Darmstadt, Germany). Samples were photodocumented using an Olympus (Hamburg, Germany) BX61 microscope equipped with a cooled digital DP72L camera. For quantification of Lewy body-like (LBL) p-a-synuclein-positive aggregates in motor cortex, equivalent sections at the level of the frontal cortex between Bregma 0 and 1 were selected (2-3 sections per mouse), and the total number of neuronal aggregates (LBL) of p- α -synuclein in layer V (300 μ m w × 150 μ m h box) was counted using a $\times 40$ objective (oil immersion Zeiss, N.A. 0.85). Statistical analysis of the obtained data was performed with Bonferroni post hoc test (multiple comparison test) using GraphPad Prism 6 (Mac OsX, Graphpad). Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). Differences between groups were considered statistically significant at **P < 0.01 and *P < 0.05.

Microfluidic Devices Two different devices were used in an optimized modification of our previous design of large dualchamber, open neuronal co-culture and of designs reported by Taylor et al. [40]. The open microfluidic device consists of two main open chambers interconnected by 100 microchannels. The large chamber areas (9 mm × 16 mm) facilitate effective cell culture and easy handling. The small cross-section areas of microchannels (3 μ m × 10 μ m or 10 μ m × 10 μ m) restrict the crossing of cortical neuron cell bodies but permit the passage of neuronal processes. The microfluidic device was made of poly(dimethylsiloxane) (PDMS) using standard photolithography and soft lithography.

Primary Embryonic Neuronal Cultures E15.5 mouse embryo brains were dissected and washed in ice-cold 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) containing 6.5 mg/ml glucose. The meninges were removed and the cortices isolated. Tissue pieces were trypsinized for 15 min at 37 °C. After the addition of horse serum and centrifugation, cells were dissociated by trituration in 0.1 M PBS containing 0.025% DNAse with a fire-polished pipette. Dissociated cells were plated at $\sim 10,000$ cells/mm² on one of the two reservoirs of microfluidic devices (A and B in Fig. 3) coated with poly-Dlysine (Sigma, Madrid, Spain). The culture medium was Neurobasal supplemented with 2 mM glutamine, 6.5 mg/ml glucose, antibiotics and B27 (Invitrogen-Life Technologies, Barcelona, Spain). After 72 h, 5 µM AraC (cytosine β-Darabinofuranoside hydrochloride, Sigma) was added for 48 h to inhibit the growth of dividing non-neuronal cells. For characterization, cultures were immunostained using anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP, cat. z0334; 1:500, Sigma), basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor olig2 (cat. AB9610, 1:200; Abcam) and class III \beta-tubulin (TUJ1, cat. 801201, 1:3000; Biolegend, CA, USA). Cultures contained up to 90% neurons (TUJ1-positive) and were used after 5-7 days in vitro. In parallel, some cultures were stained with Fluo4-AM (1 mg/ml, F14201, Invitrogen-Life Technologies) to confirm axonal interconnection between reservoirs prior to their processing.

Plasmids and Construction of PrP^C-Deleted Forms Mouse PrP^C-encoding plasmid (pcDNA 3.1 backbone) and PrP^C-IRES-GFP were provided by D. A. Harris (Boston University School of Medicine, Boston, MA, USA) and PrP^C-truncated form Δ F35 by A. Aguzzi (University Hospital Zürich, Institute for Neuropathology, Switzerland). To generate deletion constructs Δ CD, Δ CC, Δ HR and Δ CR, the PrP^C-encoding plasmid was used as a template for inverse PCRs, and the inserts obtained were fused. Briefly, a primer set was designed for each construct in order to amplify the entire plasmid, except for the region of *Prnp* to be deleted, i.e. regions 95–133, 95–110, 112–133 and 105–125 for Δ CD,

Springer

 ΔCC , ΔHR and ΔCR , respectively. Primers (Ecogen) were as follows: CD (F: 5'-AGCAGGCCCATGATCCATTTTG-3', R: 5'-ATGGGTACCCCCTCCTTGGC-3'); CC (F: 5'-GTGG CAGGGGCTGCGGCAG-3', R: 5'-ATGGGTACCCCCTC CTTGGCC-3'); HR (F: 5'-AGCAGGCCCATGATCCATT TG-3', R: 5'-TGCCACATGCTTGAGGTTGG-3'); CR (F: 5'-TACATGCTGGGGGGGGCGCC-3', R: 5'-TTTT GGTTTGCTGGGCTTGTTC-3'). After amplification (Accuprime Taq Polymerase[™], Invitrogen), the blunt ends of the amplimers were phosphorylated using the T4 kinase reaction (Invitrogen) and then religated (Fast-Link LigaseTM, Epicentre Biotech.). An aliquot of each ligation reaction was electroporated into Escherichia coli DH5a, and transformants were selected for ampicillin resistance. Twenty-five candidates were selected and screened with sequence analysis (Terminator Big Dye[™] v3.1, Applied Biosystems).

Cell Culture and Transfection HEK293 cells (ATCC CRL-1573TM, American Type Culture Collection, MD, USA) were maintained in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Invitrogen-Life Technologies), 10% foetal bovine serum (FBS, Invitrogen-Life Technologies) and 1% penicillin/ streptomycin (Invitrogen-Life Technologies) in 75 cm² culture bottles in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. One day before transfection, cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and without antibiotics, on poly-D-lysine (Sigma) coated plates. Transfection was performed using Lipofectamine Plus (Invitrogen-Life Technologies), according to the manufacturer's instructions as indicated [41].

Caspase-3 Activity Twenty-four hours after transfection, cells were scraped and lysed for 20 min on ice in cold lysis buffer (50 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA pH 8, 10% glycerol, 1% Triton X-100) containing 1x protease inhibitor cocktail and phosphatase inhibitors. Lysates were centrifuged at 12000g for 5 min at 4 °C and supernatants were collected. Protein concentration was determined using a BCA protein assay kit (Pierce). The caspase-3 activity assay, with Ac-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-DEVD-AFC, Sigma) as a substrate, was performed as previously described [42].

Immunocytochemical Procedures One day before transfection, counted HEK293 cells were seeded onto poly-D-lysine (0.01 μ g/ μ l) coated glass coverslips (12 mm Ø). Three days post-transfection, mouse α -synuclein (1 μ g/ml medium) was added to the culture media. Treatment with α -synuclein was maintained for 3 days. Cells were fixed in 4% buffered paraformaldehyde (Sigma) and then permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma) in 0.1 M PBS. A similar fixation procedure was used for microfluidic devices (see [43] for details). After fixation, and extensive rinsing with 0.1 M PBS, cultures were blocked with 10% FBS in 0.1 M PBS prior to incubation

D Springer

with primary antibodies. Neurons were identified using a class III β -tubulin antibody (1:3000 diluted; Biolegend). PrP^C was detected using anti-mouse 6H4 (1:500, Prionics; Schlieren, Switzerland), which recognizes the sequence DYEDRYYRE of the prion protein (human PrP^C: aa 144–152), α -synuclein (1:500 diluted; Cell Signalling) and p- α -synuclein (mouse and human) (p129S/81A; 1:400 diluted; Abcam). After incubation with primary antibodies, cells were incubated with the pertinent Alexa Fluor-tagged secondary antibodies (Alexa-488 goat anti-mouse or Alexa-568 goat anti-rabbit) (Invitrogen-Life Technologies). Finally, cells were stained with 0.1 μ M DAPI (Sigma) diluted in 0.1 M PBS, mounted on MowiolTM (Calbiochem, San Diego, CA, USA) and viewed using an Olympus BX61 fluorescence microscope.

Western Immunoblot Samples were homogenized in 10% wt/vol of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4/150 mM NaCl/0.5% Triton X-100/0.5% Nonidet P-40, and a mixture of protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland) and phosphatase inhibitors (10 mM tetra-sodium pyrophosphate, 200 µM sodium orthovanadate and 10 mM sodium fluoride). After this, samples were centrifuged at 15,000g for 20 min at 4 °C. The resulting supernatant was normalized for protein content using BCA kit (Thermo Scientific Pierce, Paisley, UK). Cell extracts were boiled at 100 °C for 10 min, followed by 6% SDS electrophoresis and were then electrotransferred to nitrocellulose membranes for 1 h at 4 °C. Membranes were then blocked with 5% fat milk in 0.1 M Tris-buffered saline (pH 7.4) for 1 h and incubated overnight in 0.5% blocking solution containing primary antibodies. After incubation with peroxidase-tagged secondary antibodies (1:2000 diluted, Sigma), membranes were revealed with an ECL-plus chemiluminescence western blot kit (Amershan-Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). In some experiments, peroxidase activity was revealed using a high sensitivity ECLchemiluminescence kit (QuantaRed™, Thermo Scientific). In our experiments, each nitrocellulose membrane was used to detect α -synuclein (1:1000; Cell Signalling), p- α -synuclein (1:1000, p129S/81A; Abcam), β-actin (1:20,000; Sigma), βtubulin (1:10,000; Sigma) and class III β-tubulin antibody (1:5000; Biolegend).

Densitometry and Statistical Processing For quantification, developed films were scanned at 2400×2400 dpi (i800 MICROTEK high quality film scanner), and the densitometric analysis was performed using the Quantity One Image Software Analysis (Biorad, Barcelona, Spain). Statistical analysis of the obtained data was performed with Bonferroni post hoc test (Multiple comparison test) using GraphPad Prism 6 (Mac OsX, Grahpad). Data are presented as mean \pm SEM. Differences between groups were considered statistically significant at **P* < 0.05.

Mol Neurobiol

Results

 α -Synuclein Transport in $Prnp^{+/+}$, $Prnp^{0/0}$ and Tga20 Mice Adult Prnp^{+/+}, of recombinant endotoxin-free mouse α -synuclein (Fig. 1) in the postcommissural striatum, and the presence of phosphorylated α -synuclein (p- α -synuclein, p129S/81A-positive), were analysed 45 days later. Both sham- and non-operated mice presented the described pattern of p- α -synuclein in the adult mouse telencephalon (Supplementary Fig. 1, [44]). The antibody p129S/81A showed minor cross-reactivity with phosphorylated Neurofilament L. Indeed, several telencephalic regions showed background staining including the cingulate and parietal neocortex, hippocampus, striatum and some telencephalic axonal tracts (e.g. mamillothalamic tract) (Supplementary Fig. 1) [44]. However, aggregated forms of p-a-synuclein such as Lewy body-like (LBL) or Lewy neurite-like (LNL) forms were never observed after immunohistochemistry using the p129S/81A antibody in the telencephalon of non-operated and sham-operated mice, only appearing in the telecephalon after α -synuclein fibril injections (Supplementary Fig. 1). High magnification of LBL observed in the neocortex and amygdala 45 days after mouse α -synuclein striatal injections can be seen in Supplementary Fig. 1f, g. As observed, these aggregates were clearly identifiable over the background even using Ni-DAB development.

As indicated, the mice were processed after 45 days postinjection ($Prnp^{+/+}$ (n = 6); $Prnp^{0/0}$ (n = 6) and Tga20 (n = 7))) in order to determine whether the regional distribution of p- α synuclein was similar in the different *Prnp* genotypes (Figs. 1 and 2, Supplementary Fig. 1). Injection of mouse α -synuclein sonicated fibrils into postcommissural striatum induced p- α synuclein pathology bilaterally throughout the brain, including striatum, amygdala, stria terminalis, substantia nigra and neocortex (Figs. 1 and 2, Supplementary Fig. 1). The anatomical and cellular distribution of p- α -synuclein aggregates was

Fig. 1 p- α -Synuclein pathology in the telencephalon of $Prnp^{0/0}$, $Prnp^{+/+}$ and Tga20 mice injected with mouse α -synuclein fibrils in the postcommissural striatum. **a**-**c** Schemes illustrating the location of p- α -synuclein deposits (*asterisks*) shown in panels (**d**–**0**). **d**-**0** High power

photomicrographs showing p- α synuclein labelling in the striatum (d-f); neocortical layer V (g-i); amygdala (j-l) and S. nigra (m-o) of *Prnp*⁰⁰ (d, g, j, m), *Prnp*⁺⁺ (e, h, k, n) and Tga20 (f, i, l, o) mice. Note the relevant accumulation of p- α -synuclein labelling in intracellular deposits of retrograde-labelled projecting neurons. *Scale bar*: d = 100 µm pertains to e-o



D Springer



Fig. 2 Increased α-synuclein labelling as LBL aggregates in the neocortex in Tga20 mice. **a**-**c** Examples of p-α-synuclein aggregates in the motor cortex of *Prmp*^{0:0}, *Prmp*^{+/+} and Tga20 mice injected with mouse α-synuclein fibrils in the postcommissural striatum. Note the relevant accumulation of p-α-synuclein labelling in intracellular deposits of retrograde-labelled neurons in the cortical layer V of Tga20 mice. The LBL and LNL aggregates can be clearly seen over the pale background in the cortex. **d** Graph illustrating the quantification of the neuronal aggregates in the different genotypes. Each count represents one section. (Mice number *Prmp*^{+/+} (*n* = 5); *Prmp*^{0:0} (*n* = 4) and Tga20 (*n* = 6)). In addition, the mean ± SEM is also plotted. **P* < 0.05 and ****P* < 0.01, ANOVA Bonferroni post hoc test. *Scale bar*: **a** = 100 µm pertains to **b** and **c**

observed in Prnp^{+/+}, Prnp^{0/0} and Tga20 mice, as previously reported for wild-type mice in another study using similar α synuclein fibrils and protocols [30]. At the cellular level, p- α synuclein was mainly located in neurites and the neuronal perikaryon (as thick LBL or LNL aggregates) (Figs. 1 and 2, Supplementary Fig. 1e, f). At these post-inoculation times, p-a-synuclein labelling was observed bilaterally in the striatum, substantia nigra, amygdala, and entorhinal cortex and, ipsilaterally, in the motor cortex. However, although α synuclein pathology was observed in the absence of *Prnp*. histological examination and quantitative analysis of genotypes determined increased p-\alpha-synuclein staining as LBL in the ipsilateral motor cortex of Tga20 mice compared to $Prnp^{0/0}$ and $Prnp^{+/+}$ ($Prnp^{0/0} = 11.86 \pm 0.91$; $Prnp^{+/+} = 19.80 \pm 2.25$; Tga20 = 27.56 ± 2.19 (mean \pm SEM). $Prnp^{0/0}$ vs $Prnp^{+/+}$, mean diff -7.94, t = 2.669, 95% CI of diff = -15.63 to -0.2592. $Prnp^{0/0}$ vs Tga20, mean diff -15.70, t = 5.159, 95% CI of diff = -23.56to -7.84. *Prnp*^{+/+} vs Tga20, mean diff -7.756, t = 2.795, 95%

D Springer

Mol Neurobiol

Fig. 3 Analysis of α -synuclein transport using microfluidic devices. **a** 2D representation of the two PDMS devices used in the present study, b, c Double immunofluorescence photomicrographs illustrating TUJ1/GFAP (b) or TUJ1/olig2 (c) staining in primary cultured neurons in the devices. d Primary cortical cultures of the $Prnp^{+/+}$ were maintained in the devices for 7 days. Then, mouse α -synuclein fibrils were added to A reservoir (asterisk), and their transport to B reservoir was analysed with immunocytochemistry (d-h) and western blot (i). d Examples of double-labelled neurons (TUJ1/ α -synuclein) in B reservoir (indicated with camera icon) showing α -synuclein labelling (arrows). e, f Examples of p- α -synuclein-labelled neurons and neurites (arrows) in A reservoir (indicated with camera icon). g, h Examples of p-α-synucleinlabelled neurons and axons (arrows) in B reservoir (indicated with camera icon). i Western blot showing the presence of α -synuclein (17 kDa band) in both cellular extracts (A and B) and the absence in the culture medium of B in contrast to A reservoir, avoiding passive fluid transport. Membranes were reblotted with an antibody against β tubulin or TUJ1 for standardization and characterization. Scale bar: b, d, e, g and $h = 40 \ \mu m$

CI of diff = -14.92 to -0.59; ANOVA Bonferroni multiple comparison test) (Fig. 2). These data strongly suggest that although non-mandatory, *Prnp* overexpression enhances the regional transport of p- α -synuclein pathology in living mice.

Development of Microfluidic Devices to Monitor a-Synuclein Fibril Transport &-Synuclein intracellular transport has been studied in vitro using commercial microfluidic devices (e.g. [45-48]). Our laboratory has developed two microfluidic designs based on previously published devices of our group (Fig. 3) [43]. Two different types of microgrooves (both 1 mm length) were generated for this study: 100 microgrooves of 3 μ m (high) × 10 μ m (wide) sections and 100 microgrooves of 10 (high) \times 10 μ m (wide) sections (Fig. 3a). Results in protein transport were similar for the two devices since microfluidic pressures were controlled to avoid non-specific non-neuronal transport (see below). As noted, α synuclein transport in vitro can be done both anterogradely and retrogradely [45–47]. Thus, we cultured $Prnp^{+/+}$ embryonic (E15.5) cortical neurons for 5-7 days in our devices to ensure crossing of axons between A and B. Under these conditions, around \approx 85% of the devices showed large numbers of crossing axons after Fluo4-AM staining between reservoirs (Supplementary Fig. 2a, b). In addition, immunohistochemical analysis demonstrated that a large number of TUJ1positive neurons with fewer astrocytes (glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive) and oligodendrocytes (olig2positive) were observed in the devices (Fig. 3b, c). Recombinant (1 µg/ml) mouse (Fig. 3) or human (Supplementary Fig. 3) a-synuclein fibrils were added to one of the reservoirs (mainly in A; (A *) in Fig. 3) following the protocol of [46] with different volumes of medium between reservoirs (B > A; 100 μ l), and their transport $(A \Rightarrow B)$ were analysed 5 days later with immunocytochemistry (Fig. 3d-h, Supplementary Fig. 3) or western blot (Fig. 3i and Supplementary Figs. 2 and 4).

Mol Neurobiol



First, we aimed to determine endogenous α -synuclein and p- α -synuclein labelling in our devices. At these stages, a very low α -synuclein immunostaining was observed in untreated devices in both A and B reservoirs. In addition, after using the p- α -synuclein (p129S/81A) antibody, no labelling was

observed in the absence of α -synuclein fibril cultures. However, after α -synuclein fibril treatment in A (Fig. 3d), immunoreacted cultures showed the presence of relevant α synuclein staining in the perikaryon, neurites and axons of cultured TUJ1-positive neurons in B (Fig. 3d). In addition,

O Springer

relevant p-a-synuclein labelling was observed in morphologically identified neurons located in both reservoirs (A and B) (Fig. 3e-h). More relevantly, $p-\alpha$ -synuclein aggregates (after mouse or human fibril treatment) were detected in identified axons and in the cytoplasm of cultured neurons in A as well in B (Fig. 3e-h, Supplementary Fig. 3b-g). In addition, to avoid the presence of passive transport of α -synuclein, we developed the detection of the protein in cell extracts and media of both reservoirs using the QuantaRedTM-enhanced chemifluorescent HRP substrate (Thermo Fisher, cat. 15159) (Fig. 3i and Supplementary Figs. 2 and 4). After mouse α synuclein fibril incubation in A, results revealed the presence of α -synuclein in both cellular extracts (A and B), with the absence in the culture media of B in contrast to the media of A reservoir, indicating the absence of passive fluidic flux between A \Rightarrow B (Fig. 3i and Supplementary Figs. 2 and 4) [43, 46]. In our devices, although different α -synuclein bands could be detected in A, the low molecular weight of α synuclein (≈17 kDa) was mainly detected in B, as also recently reported by [47](Fig. 3, Supplementary Figs. 2 and 4). α-Synuclein transport was always observed in those devices showing large connectivity between A and B reservoirs (Fig. 3, Supplementary Figs. 3 and 4). However, in those displaying few axon numbers crossing between reservoirs (Supplementary Fig. 3), α -synuclein was almost absent in B (cell and media) and was only detected in the cellular and media extracts of A. This reinforced the notion of a specific axonal transport of α -synuclein fibrils between neurons displaying low endogenous levels of α -synuclein at these time points in culture (Supplementary Fig. 2). Thus, these devices are well suited to monitor cellular transport of mouse or human α -synuclein fibrils.

In Vitro Transport of *α*-Synuclein under Prnp Dosage As indicated above, PrP^C has been described as a receptor for βamyloid [4, 49]. Although the participation of PrP^{C} in the intercellular β-amyloid transport in microfluidic devices remains elusive, its expression seems to be needed to trigger βamyloid-mediated effects in treated neurons (see the "Introduction" section for references). Primary cortical cultures from Prnp^{+/+}, Prnp^{0/0} and Tga20 embryos were treated with exogenous recombinant mouse α -synuclein fibrils, and both the binding in treated cells and their transport was analysed with western blot or immunocytochemistry (Fig. 4). First, we checked the percentage of devices without the α-synuclein transport. Results indicated that 14.28% $(Prnp^{0/0})$, 22.22% $(Prnp^{+/+})$ and 16.66% (Tga20) of the cultures showed no α -synuclein transport in our microfluidic devices. In fact, these cultures displayed very few axons crossing between reservoirs as determined by Fluo4-AM staining (see example in Supplementary Fig. 2a). Second, we analysed the presence of exogenous α -synuclein in neurons in B reservoir after treatment in A. We were able to determine the

D Springer

Mol Neurobiol

presence of α -synuclein in neurons, irrespective of the *Prnp* genotype (Fig. 4a–d). Since neuronal presence of α -synuclein fibrils cannot be ascertained in a quantitative basis by simple fluorescence analysis, we processed parallel samples for western blot. Indeed, after protofibril treatment in A, western blots revealed increased α -synuclein/tubulin ratio in Tga20 than in WT and Prnp^{0/0} cultured neurons in A suggesting a tendency of higher protofibril binding in presence of larger PrP^C amounts ($Prnp^{0/0} = 0.344 \pm 0.07$; $Prnp^{+/+} = 0.386 \pm 0.08$, Tga20 = 0.56 ± 0.14 (mean \pm SEM)) (Fig. 4b). Next, western blot results corroborated that α -synuclein protofibrils could be transported to neurons from A to B irrespective of the Prnp genotype (Fig. 4). However, although not statistically significant (ANOVA Bonferroni post hoc test), values for transported *a*-synuclein were slightly higher in Tga20derived primary neuronal cultures as compared to wild-type and $Prnp^{0/0}$ (Fig. 4c) $(Prnp^{0/0} = 0.467 \pm 0.09;$ $Prnp^{+/+} = 0.5561 \pm 0.106$, Tga20 = 0.7801 ± 0.206 (mean \pm SEM)).

Increased Binding of *α*-Synuclein in Prnp-Transfected Cells Various possibilities have been proposed regarding α -synuclein interaction with plasma membrane [50–52, 48]. Thus, due to the in vitro and in vivo observations, we aimed to determine whether PrP^C overexpression enhanced a-synuclein interaction with cells (Figs. 5 and 6 and Supplementary Fig. 5). We increased PrP^C expression in a cellular system with very low PrP^C expression, low endogenous α -synuclein binding properties [48] and lack of expression of other α -synuclein binding proteins (LAG3, neurexin 1ß or APLP1) (HEK293 cells, Fig. 5) to analyse the binding of α -synuclein mouse protofibrils. First, HEK293 cells were transfected with PrP^C-IRES-GFP, incubated with sonicated mouse α -synuclein protofibrils (1 μ g/ml) and processed for α -synuclein immunolabelling (Fig. 5b). Results revealed that most GFP-positive HEK203 cells were labelled with the α synuclein antibody (Fig. 5b). In a second set of experiments, HEK293 cells were transfected either with fulllength Prnp (pcDNA-Prnp) or mock (pcDNA) plasmids and then incubated 24 h later with mouse a-synuclein fibrils; their cellular binding was analysed using western blot and immunocytochemistry for PrP^{C} and α -synuclein (Fig. 5a, c-h). Blots indicated the presence of the 17 kDa α -synuclein band only in protein extracts of Prnptransfected cells after α -synuclein treatment (Fig. 5a). This increased binding was also corroborated by immunocytochemistry in which α -synuclein labelling was prominent in identified double-labelled Prnp-expressing cells in contrast to non-expressing HEK293 cells (Fig. 5c-h). Fluorescence microscopy observation developed in 314 (PrP^C-positive) identified cells from three different experiments demonstrated that 91.08% of the analysed cells Mol Neurobiol



Fig. 4 Determination of α -synuclein transport in neuronal cultures from mouse embryos carrying differing *Prnp* dosages. Recombinant mouse α synuclein protofibrils were added to A reservoir (*asterisk*), and its binding to neurons in A reservoir as well as their transport towards B were analysed by western blot in cellular extracts. **a**–**d** Examples of doublelabelled *Prnp*^{0/0} (**a**, **b**) and *Prnp*^{+/-} (**c**, **d**) neurons (TUJ1/ α -synuclein) in B reservoir showing discrete cytoplasmatic α -synuclein labelling (*arrows*). **e** Examples of western blot determination of one device for each *Prnp* genotype for α -synuclein. Anti- β -tubulin and anti-*PrP*^C monoclonal antibodies were used for standardization and genotype

characterization. Notice that PrP^C was present in WT and Tga20 cells at the time of treatment. PrP^C is downregulated shortly after plating neurons, and their levels increased over time in culture (see also [68] for details). f-g Densitometric analysis (see the "Material and Methods" section for details) were performed, and quantification was represented as the ratio between α -synuclein/\beta-tubulin detected in A reservoir after protofibril treatment (b) and ratio between α -synuclein/\beta-tubulin detected in B vs A reservoirs (c). Results for each device are represented by a single plot in the scatter plot. In addition, mean \pm SEM is also plotted

with relevant α -synuclein labelling were also positive for PrP^{C} (Fig. 5c, d). In contrast, a discrete puncta-like labelling of α -synuclein was observed randomly distributed over mock-transfected HEK293 cells with negligible levels of PrP^{C} (Fig. 5e). At high magnification, although not exclusive, we determined a strong co-localization of the α -synuclein and PrP^{C} labelling in discrete membrane regions of transfected cells, suggesting relevant cellular

binding of protofibrils in regions with high PrP^{C} presence (Fig. 5f-h).

Involvement of the Charged Cluster Domain of PrP^C in α-Synuclein Binding It has been described how the residues of the CC of PrP^C are involved in binding β-amyloid with PrP^C [53]. Hence, we aimed to determine whether this domain also participates in α-synuclein binding (Fig. 6). After cloning, the

Deringer



Fig. 5 Increased binding of α-synuclein in *Prnp*-transfected HEK293 cells. **a** Western blot shows increased labelling of the 17 KDa α-synuclein band in HEK293 cells transfected with mouse *Prnp*-encoding plasmid in contrast to mock-transfected cells. Anti-β-tubulin monoclonal antibody was used for standardization, and anti-PrP^C antibody was used to check PtP^C overexpression after transfection. Notice that HEK293 cells showed a very low endogenous PrP^C expression. The upper bands observed after protofibril treatment corresponded to non-monomeric forms of α-synuclein. **b** Examples of double-labelled GFP/α-synuclein HEK293 cells after transfection of PrP^C-IRES-GFP. Note the presence of the relevant labelling in the two transfected cells in comparison to the disperse α-synuclein labelling in non-transfected cells (*arrows*). **c**-**e**

expression of all PrP^C variants in HEK293 cells were tested by western blotting (Supplementary Fig. 5). The endogenous level of *Prnp* expression in HEK293 was low (Fig. 5a), and all PrP^C-modified proteins were detectable (Supplementary Fig. 5). However, expression of Δ F35 was markedly lower than that of the rest of the deleted forms, representing less than 50% of the expression of full-length PrP^C (Supplementary Fig. 5). At this point, we considered the fact that some of these constructs are able to induce cell death when overexpressed in cell lines [54, 1]. Results indicate that only Δ F35 increased

🖄 Springer

Fluorescence photomicrographs showing examples of double-labelled cells PrP^{C} (d) overexpressing cells and α -synuclein (c). HEK293 cells were transfected with *Prnp*-encoding plasmid (c, d) or mock-transfected cells (e). *Arrows* in c and d point to double-labelled cells, and the *asterisk* in d labels a PrP^{C} -positive/ α -synuclein-negative HEK293 cell. *Arrows* in e point to α -synuclein labelling in mock-transfected cells. f–h High magnification photomicrograph illustrating the distribution of α -synuclein (f) in PrP^{C} -transfected HEK293 cells (g). Notice the relevant colocalization in several domains of the transfected cell including the plasma membrane (arrows in g and h). *Scale bars*: b, e = 25 µm. c, f = 25 µm belongs to d; g and h, respectively

caspase 3 activity in transfected cells in contrast to other PrP^C constructs (relative fluorescence units (RFU) Δ F35/pcDNA = 2.15 ± 0.38; Δ CC/pcDNA = 0.92 ± 0.27; Δ HR/pcDNA = 1.11 ± 0.21; PrP^C/pcDNA = 1.14 ± 0.09; mean ± SEM) (Supplementary Fig. 5). After these results, we ignored Δ F35 in the next experiments and focused on the central domain (Δ CC and Δ HR) of PrP^C (Figs. 5 and 6). In the experiments, we reduced the amount of the cDNA to half during cell transfection to ensure clear immunocytochemical detection of transfected cells. After transfection and





Fig. 6 a Scheme of the ΔCC , ΔHR maps and the full-length PrP^C , **b**, **c** Fluorescence photomicrographs showing examples of double-labelled PrP^C/α -synuclein cells (*arrows*). **d**, **e** Fluorescence photomicrographs showing examples of double-labelled cultures using the 6H4 PrP^C and α -synuclein antibodies. Note the absence of double-labelled cells in these

immunocytochemistry, only 5.83% (22 of 377, n = 3) of the Δ CC-labelled cells were α -synuclein-positive (Fig. 6d–g) in contrast to Δ HR/ α -synuclein (96.49% (110 of 114, n = 3)) (Fig. 6h–k) and PrP^C/ α -synuclein (91.08% (286 of 314 cells, n = 3) (Fig. 5c–h and Fig. 6b, c), indicating the participation of the CC domain of PrP^C in α -synuclein binding to PrP^C-transfected HEK293 cells.

Discussion

In this study, we determined that α -synuclein fibrils can be transported to different brain regions of wild-type mice after injection in the postcommissural striatum. Our results reinforce the notion that the spreading of p- α -synuclein pathology does not occur by diffusion or non-specific transport [45]. The transport observed in our experiments was similar to that reported in other studies using wild-type mice [29, 28], with relevant p- α -synuclein deposits in the striatum, substantia nigra, amygdala and neocortex. The anatomical connections between the striatum, substantia nigra, amygdala and neocortex are well described in the literature (e.g. [55]) and support

examples (*arrows*) and the background staining of α -synuclein labelling in non-transfected cells. **h–k** Fluorescence photomicrographs showing examples of double-labelled Δ HR/ α -synuclein cells (*arrows*) after treatment over the labelling of non-transfected cells. *Scale bar*: **b**, **d**, **f**, **h** and **j** = 40 µm pertains to **c** and **e**, respectively

the observed transport of α -synuclein. Although it has been reported to exist anterograde and retrograde transport of α synuclein (see above), in our experiments, transported α synuclein seemed to be more often transported retrogradely in the brain parenchyma, as suggested in other works [29, 28]. Our results also demonstrate for the first time that $p-\alpha$ synuclein pathology after injection could spread to different brain regions in the absence of PrP^C. Thus, Prnp expression is not mandatory for α -synuclein transport in the mouse brain, although increased levels of α -synuclein transport can be seen in wild-type and overexpressing mice. In fact, it has been reported that the absence of PrP^C does not modify the appearance or temporal evolution of p- α -synuclein deposits in transgenic mice overexpressing human α -synuclein driven by a platelet-derived growth factor-ß promoter [56]. Furthermore, changes on Prnp dosage do not alter α -synuclein expression in adult mice (not shown). Although data using additional models of synucleinopathies (e.g. A53T mice) have not been published, the present results are in line with these observations [56]. However, we also determined an increased number of motor pyramidal neurons displaying LBL aggregates in Prnp-overexpressing mice which suggest that, as also

D Springer

reported for β -amyloid, PrP^C might participate in the cellular binding of α -synuclein and its expansion.

The interaction of several amyloids to PrP^C is well characterized [14, 6, 4, 15-17]. We determined, using two different Prnp constructs, that their overexpression can enhance the binding of α -synuclein in HEK293 cells with low endogenous capability of α -synuclein binding (see also [48] for details). Several studies have reported the interaction of endogenous peptides of the amyloid family with the plasma membrane [57–61]. In fact, the interaction of $A\beta$, human or rat amylin, $PrP_{(106-126)}$ or α -synuclein fibrils with plasma membrane has been well described [57-60, 62], and several putative interactions with plasma membrane proteins have been described as well (e.g. APP [59] or GRP78 [51]). To this concern, a recent study of Mao and coworkers [48] reviewed in [63] points to the lymphocyte-activation gene 3 (LAG3/CD223) as the neuronal receptor of α -synuclein. LAG3 showed increased binding properties to α -synuclein protofibrils as compared to neurexin 1ß, and APLP1 in SH-SY5Y-overexpressing cells [48]. mRNA levels of LAG3 do not change between Prnp genotypes (GEO database ref. GSE16223). However, and since a functional interaction between LAG3 with PrPC cannot be ruled out, we hypothesise that PrP^C as well as other proteins (e.g. GRP78) may cooperate with LAG3 in neuronal α-synuclein transport. This is also relevant if considered that the absence of LAG3 does not fully impair α -synuclein protofibril transport in vitro and in vivo [48].

Although not described for other fibrillar peptides, PrP^{C} has been reported as a receptor for A β (see above). The present study indicates that PrP^{C} might contribute to enhanced binding of α -synuclein fibrils to the plasma membrane, in line with other studies, reporting an increased level of binding between A β and PrP^{C} during ageing in several mouse models of Alzheimer's disease [15]. In addition, our data suggest that the CC domain actively participates in α -synuclein binding. Residues located in the CC domain (aa 90–110 or aa 91–115) have been involved in binding with β -amyloid [64, 53] in cooperation with the N-terminal residues 23–58 [53]. As these PrP^{C} domains have been revealed as putative pharmacological targets for Alzheimer's disease [65–67], our data might also enhance the eligibility of PrP^{C} as a putative target to modulate α -synuclein expansion.

Acknowledgements The authors thank Tom Yohannan for the editorial advice and the IBEC Nanotechnology Platform staff for their generous help. This research was supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through the project (BFU2015-67777-R) (MINECO/FEDER), the Spanish prion network (Prionet Spain, AGL2015-71764-REDT) (MINECO/FEDER), the Generalitat de Catalunya (SGR2014-1218), CIBERNED (Pl2014/02-4 (Rapid dementias), PRY-14-114 and PRY2016-02, La Caixa Obra Social Foundation and La Marató de TV3) to J.A.D.R. J.M.G.A. was supported by the European Research Council (ERC) through the project ERC-2012-StG 306751 and the MINECO (DPI2015-64221-C2-1-R). M.V. was supported by Fondo de Investigación Sanitaria-Instituto de Salud Carlos III. E.T.

Springer

was supported by MINECO/FEDER (BIO2015-63557-R). I.F. was supported by the Seventh Framework Programme of the European Commission, grant agreement 278486: DEVELAGE and Instituto de Salud Carlos III–Fondos FEDER, a way to build Europe FIS PIE14/ 00034 and PI14/00757. J.S. was supported by the Seventh Framework Programme of the European Commission, grant agreement 228685-2: BOND and Instituto de Salud Carlos III (PI10/01171); MINECO/ FEDER (TEC2015-72718-EXP) and the Botin Foundation. M.S.-F was supported by CIBERNED, A.H was supported by La Caixa Obra Social Foundation and L.U. was supported by a fellowship from the Marató TV3 foundation. L.P. is grateful to the Generalitat de Catalunya for its financial support through the FI Programme (2015-FI-B-00817).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interests.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- del Rio JA, Gavin R (2016) Functions of the cellular prion protein, the end of Moore's law, and Ockham's razor theory. Prion 10(1): 25–40
- Nicolas O, Gavin R, del Rio JA (2009) New insights into cellular prion protein (PrPc) functions: the "ying and yang" of a relevant protein. Brain Res Rev 61(2):170–184
- Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR (2008) Physiology of the prion protein. Physiol Rev 88(2):673–728
- Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. Nature 457(7233):1128–1132
- Dohler F, Sepulveda-Falla D, Krasemann S, Altmeppen H, Schluter H, Hildebrand D, Zerr I, Matschke J et al (2014) High molecular mass assemblies of amyloid-beta oligomers bind prion protein in patients with Alzheimer's disease. Brain 137(Pt 3):873–886
- Freir DB, Nicoll AJ, Klyubin I, Panico S, Mc Donald JM, Risse E, Asante EA, Farrow MA et al (2011) Interaction between prion protein and toxic amyloid beta assemblies can be therapeutically targeted at multiple sites. Nat Commun 2:336
- Zou WQ, Xiao X, Yuan J, Puoti G, Fujioka H, Wang X, Richardson S, Zhou X et al (2011) Amyloid-beta42 interacts mainly with insoluble prion protein in the Alzheimer brain. J Biol Chem 286(17): 15095–15105
- Ganzinger KA, Narayan P, Qamar SS, Weimann L, Ranasinghe RT, Aguzzi A, Dobson CM, McColl J et al (2014) Single-molecule imaging reveals that small amyloid-beta1-42 oligomers interact with the cellular prion protein (PrP(C)). Chembiochem 15(17): 2515–2521
- Balducci C, Beeg M, Stravalaci M, Bastone A, Sclip A, Biasini E, Tapella L, Colombo L et al (2010) Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. Proc Natl Acad Sci U S A 107(5):2295–2300
- Nieznanski K, Surewicz K, Chen S, Nieznanska H, Surewicz WK (2014) Interaction between prion protein and Aβ amyloid fibrils revisited. ACS Chem Neurosci 5(5):340–345

Mol Neurobiol

- Calella AM, Farinelli M, Nuvolone M, Mirante O, Moos R, Falsig J, Mansuy IM, Aguzzi A (2010) Prion protein and Aβ-related synaptic toxicity impairment. EMBO Mol Med 2(8):306–314
- Cisse M, Sanchez PE, Kim DH, Ho K, Yu GQ, Mucke L (2011) Ablation of cellular prion protein does not ameliorate abnormal neural network activity or cognitive dysfunction in the J20 line of human amyloid precursor protein transgenic mice. J Neurosci 31(29):10427–10431
- Kessels HW, Nguyen LN, Nabavi S, Malinow R (2010) The prion protein as a receptor for amyloid-beta. Nature 466(7308):E3–E4 discussion E4-5
- Barry AE, Klyubin I, Mc Donald JM, Mably AJ, Farrell MA, Scott M, Walsh DM, Rowan MJ (2011) Alzheimer's disease brainderived amyloid-beta-mediated inhibition of LTP in vivo is prevented by immunotargeting cellular prion protein. J Neurosci 31(20):7259–7263
- Kostylev MA, Kaufman AC, Nygaard HB, Patel P, Haas LT, Gunther EC, Vortmeyer A, Strittmatter SM (2015) Prion-proteininteracting amyloid-beta oligomers of high molecular weight are tightly correlated with memory impairment in multiple Alzheimer mouse models. J Biol Chem 290(28):17415–17438
- Um JW, Strittmatter SM (2013) Amyloid-beta induced signaling by cellular prion protein and Fyn kinase in Alzheimer disease. Prion 7(1):37–41
- Scott-McKean JJ, Surewicz K, Choi JK, Ruffin VA, Salameh AI, Nieznanski K, Costa AC, Surewicz WK (2016) Soluble prion protein and its N-terminal fragment prevent impairment of synaptic plasticity by Aβ oligomers: implications for novel therapeutic strategy in Alzheimer's disease. Neurobiol Dis 91:124–131
- Hall GF, Patuto BA (2012) Is tau ready for admission to the prion club? Prion 6(3):223–233
- Dehay B, Fernagut PO (2016) Alpha-synuclein-based models of Parkinson's disease. Rev Neurol (Paris)
- Hasegawa M (2016) Molecular mechanisms in the pathogenesis of Alzheimer's disease and tauopathies-prion-like seeded aggregation and phosphorylation. Biomolecules 6(2)
- Kraus A, Groveman BR, Caughey B (2013) Prions and the potential transmissibility of protein misfolding diseases. Annu Rev Microbiol 67:543–564
- Lee S, Kim HJ (2015) Prion-like mechanism in amyotrophic lateral sclerosis: are protein aggregates the key? Exp Neurobiol 24(1):1–7
- Wu JW, Hussaini SA, Bastille IM, Rodriguez GA, Mrejeru A, Rilett K, Sanders DW, Cook C, Fu H, Boonen RA, Herman M, Nahmani E, Emrani S, Figueroa YH, Diamond MI, Clelland CL, Wray S, Duff KE (2016) Neuronal activity enhances tau propagation and tau pathology in vivo. Nat Neurosci 19(8):1085–1092. doi:10.1038/nn. 4328
- Braak H, Del Tredici K (2008) Invited article: nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. Neurology 70(20):1916– 1925
- Le NT, Narkiewicz J, Aulic S, Salzano G, Tran HT, Scaini D, Moda F, Giachin G et al (2015) Synthetic prions and other human neurodegenerative proteinopathies. Virus Res 207:25–37
- Fernandez-Borges N, Erana H, Venegas V, Elezgarai SR, Harrathi C, Castilla J (2015) Animal models for prion-like diseases. Virus Res 207:5–24
- Walker LC, Jucker M (2015) Neurodegenerative diseases: expanding the prion concept. Annu Rev Neurosci 38:87–103
- Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VM (2012) Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. Science 338(6109):949–953
- Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann DM, Hasegawa M (2013) Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. Brain 136(Pt 4):1128– 1138

- Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Kubo M, Shimozawa A, Akiyama H, Hasegawa M (2014) Pathological alpha-synuclein propagates through neural networks. Acta Neuropathol Commun 2:88
- Desplats P, Lee HJ, Bae EJ, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, Spencer B, Masliah E et al (2009) Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. Proc Natl Acad Sci U S A 106(31):13010–13015
- Angot E, Brundin P (2009) Dissecting the potential molecular mechanisms underlying alpha-synuclein cell-to-cell transfer in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord 15(Suppl 3): S143–S147
- Emmanouilidou E, Vekrellis K (2016) Exocytosis and spreading of normal and aberrant alpha-synuclein. Brain Pathol 26(3):398–403
- Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M et al (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. Nature 356(6370):577–582
- 35. Carulla P, Llorens F, Matamoros-Angles A, Aguilar-Calvo P, Espinosa JC, Gavin R, Ferrer I, Legname G et al (2015) Involvement of PrP(C) in kainate-induced excitotoxicity in several mouse strains. Sci Rep 5:11971
- Rangel A, Madronal N, Gruart A, Gavin R, Llorens F, Sumoy L, Torres JM, Delgado-Garcia JM et al (2009) Regulation of GABA(A) and glutamate receptor expression, synaptic facilitation and long-term potentiation in the hippocampus of prion mutant mice. PLoS One 4(10):e7592
- Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, Brandner S, Aguzzi A et al (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. EMBO J 15(6):1255–1264
- Steele AD, Emsley JG, Ozdinler PH, Lindquist S, Macklis JD (2006) Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 103(9):3416–3421
- Kim C, Lv G, Lee JS, Jung BC, Masuda-Suzukake M, Hong CS, Valera E, Lee HJ et al (2016) Exposure to bacterial endotoxin generates a distinct strain of alpha-synuclein fibril. Scientific reports 6: 30891
- Taylor AM, Blurton-Jones M, Rhee SW, Cribbs DH, Cotman CW, Jeon NL (2005) A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. Nat Methods 2(8):599–605
- Llorens F, Carulla P, Villa A, Torres JM, Fortes P, Ferrer I, del Rio JA (2013) PrP(C) regulates epidermal growth factor receptor function and cell shape dynamics in Neuro2a cells. J Neurochem 127(1):124–138
- Gurtu V, Kain SR, Zhang G (1997) Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. Anal Biochem 251(1):98–102
- Reginensi D, Carulla P, Nocentini S, Seira O, Serra-Picamal X, Torres-Espin A, Matamoros-Angles A, Gavin R et al (2015) Increased migration of olfactory ensheathing cells secreting the Nogo receptor ectodomain over inhibitory substrates and lesioned spinal cord. Cell Mol Life Sci 72(14):2719–2737
- Sacino AN, Brooks M, Thomas MA, McKinney AB, McGarvey NH, Rutherford NJ, Ceballos-Diaz C, Robertson J et al (2014) Amyloidogenic alpha-synuclein seeds do not invariably induce rapid, widespread pathology in mice. Acta Neuropathol 127(5):645– 665
- 45. Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Patel TP, Tanik SA, Riddle DM, Stieber A, Meaney DF, Trojanowski JQ et al (2011) Exogenous alpha-synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. Neuron 72(1):57–71
- Freundt EC, Maynard N, Clancy EK, Roy S, Bousset L, Sourigues Y, Covert M, Melki R et al (2012) Neuron-to-neuron transmission

Springer

of alpha-synuclein fibrils through axonal transport. Ann Neurol $72(4){\rm :}517{\rm -}524$

- Brahic M, Bousset L, Bieri G, Melki R, Gitler AD (2016) Axonal transport and secretion of fibrillar forms of alpha-synuclein, Aβ42 peptide and HTTExon 1. Acta Neuropathol 131(4):539–548
- 48. Mao X, Ou MT, Karuppagounder SS, Kam TI, Yin X, Xiong Y, Ge P, Umanah GE, Brahmachari S, Shin JH, Kang HC, Zhang J, Xu J, Chen R, Park H, Andrabi SA, Kang SU, Goncalves RA, Liang Y, Zhang S, Qi C, Lam S, Keiler JA, Tyson J, Kim D, Panicker N, Yun SP, Workman CJ, Vignali DA, Dawson VL, Ko HS, Dawson TM (2016) Pathological α-synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. Science 353(6307). doi:10.1126/ science.aah3374
- Biasini E, Turnbaugh JA, Unterberger U, Harris DA (2012) Prion protein at the crossroads of physiology and disease. Trends Neurosci 35(2):92–103
- Kumar P, Segers-Nolten IM, Schilderink N, Subramaniam V, Huber M (2015) Parkinson's protein alpha-synuclein binds efficiently and with a novel conformation to two natural membrane mimics. PLoS One 10(11):e0142795
- Bellani S, Mescola A, Ronzitti G, Tsushima H, Tilve S, Canale C, Valtorta F, Chieregatti E (2014) GRP78 clustering at the cell surface of neurons transduces the action of exogenous alpha-synuclein. Cell Death Differ 21(12):1971–1983
- Zabrocki P, Bastiaens I, Delay C, Bammens T, Ghillebert R, Pellens K, De Virgilio C, Van Leuven F et al (2008) Phosphorylation, lipid raft interaction and traffic of alpha-synuclein in a yeast model for Parkinson. Biochim Biophys Acta 1783(10):1767–1780
- Younan ND, Sarell CJ, Davies P, Brown DR, Viles JH (2013) The cellular prion protein traps Alzheimer's Aβ in an oligomeric form and disassembles amyloid fibers. FASEB J 27(5):1847–1858
- Vilches S, Vergara C, Nicolas O, Mata A, Del Rio JA, Gavin R (2016) Domain-specific activation of death-associated intracellular signalling cascades by the cellular prion protein in neuroblastoma cells. Mol Neurobiol 53(7):4438–4448
- Smith AD, Bolam JP (1990) The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. Trends Neurosci 13(7):259–265
- Steele AD, Zhou Z, Jackson WS, Zhu C, Auluck P, Moskowitz MA, Chesselet MF, Lindquist S (2009) Context dependent neuroprotective properties of prion protein (PrP). Prion 3(4):240–249

- McHattie SJ, Brown DR, Bird MM (1999) Cellular uptake of the prion protein fragment PrP106-126 in vitro. J Neurocytol 28(2): 149–159
- Kawahara M, Kuroda Y, Arispe N, Rojas E (2000) Alzheimer's beta-amyloid, human islet amylin, and prion protein fragment evoke intracellular free calcium elevations by a common mechanism in a hypothalamic GnRH neuronal cell line. J Biol Chem 275(19):14077–14083
- White AR, Maher F, Brazier MW, Jobling MF, Thyer J, Stewart LR, Thompson A, Gibson R et al (2003) Diverse fibrillar peptides directly bind the Alzheimer's amyloid precursor protein and amyloid precursor-like protein 2 resulting in cellular accumulation. Brain Res 966(2):231–244
- Zheng W, Wang L, Hong Y, Sha Y (2009) PrP106-126 peptide disrupts lipid membranes: influence of C-terminal amidation. Biochem Biophys Res Commun 379(2):298–303
- Grey M, Linse S, Nilsson H, Brundin P, Sparr E (2011) Membrane interaction of alpha-synuclein in different aggregation states. J Parkinsons Dis 1(4):359–371
- Jo E, McLaurin J, Yip CM, St George-Hyslop P, Fraser PE (2000) Alpha-synuclein membrane interactions and lipid specificity. J Biol Chem 275(44):34328–34334
- Wood H (2016) Parkinson disease: LAG3 facilitates cell-to-cell spread of alpha-synuclein pathology. Nat Rev Neurol 2(12):678. doi:10.1038/nrneurol.2016.164
- Maciejewski A, Ostapchenko VG, Beraldo FH, Prado VF, Prado MA, Choy WY (2016) Domains of STIP1 responsible for regulating PrPC-dependent amyloid-beta oligomer toxicity. Biochem J 473(14):2119–2130
- Risse E, Nicoll AJ, Taylor WA, Wright D, Badoni M, Yang X, Farrow MA, Collinge J (2015) Identification of a compound that disrupts binding of amyloid-beta to the prion protein using a novel fluorescence-based assay. J Biol Chem 290(27):17020–17028
- Nieznanski K, Choi JK, Chen S, Surewicz K, Surewicz WK (2012) Soluble prion protein inhibits amyloid-beta (Aβ) fibrillization and toxicity. J Biol Chem 287(40):33104–33108
- Lauren J (2014) Cellular prion protein as a therapeutic target in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis 38(2):227–244
- Mata A, Urrea L, Vilches S, Llorens F, Thune K, Espinosa JC, Andreoletti O, Sevillano AM, Torres JM, Requena JR, Zerr I, Ferrer I, Gavin R, Del Rio JA (2016) Reelin expression in Creutzfeldt-Jakob disease and experimental models of transmissible spongiform encephalopathies. Mol Neurobiol. doi:10.1007/ s12035-016-0177-8

Deringer



Supplementary Fig. 1.

a-b Electron microscopy photomicrograph illustrating recombinant mouse α -synuclein fibers in aggregated stage (**a**) and after sonication procedure (**b**). **c** Western blot of sonicated α -synuclein fibers. Note the appearance of the \approx 17 kDa band as well as the \approx 35 kDa band typical of non-monomeric α -synuclein. Similar band pattern was observed in the case of human α -synuclein fibrils **d-e** Low power photomicrographs illustrating p- α -synuclein staining in sham-operated (**d**) and mouse α -synuclein-operated (**e**) *Prnp*^{+/+} mice. p129S/81A p- α -synuclein labelling can be seen in parietal and cingular neocortex, hippocampus, mamillothalamic tract, fornix, globus pallidus, caudate putamen and white matter. However, after injection, p- α -synuclein deposits as LBL or LNL aggregates (*arrowsin* **e**) can clearly be seen over the background using the p129S/81A antibody. **f-g** High power photomicrographs illustrating p- α -synuclein LBL after mouse fibril injection in neocortex (**f**) or amygdala (**g**). Abbreviations: *A*, amygdala; *CP*, caudate putamen; *EC*, entorhinal cortex; *GP*, globus pallidus; *H*, hippocampus; *T*, thalamus. *Scale bar*: *d* = 500 µm pertains to **e**; *f* = 25 µm pertains to **g**.





Analysis of mouse α -synuclein transport using microfluidic devices. **a-b** Examples of Fluo4-AM labelling (FITC optics) of microfluidic devices after 7 DIV. Note the difference in the number of labelled axons between (a) and (b) in the microchannels. **c** Example of western blotting of α -synuclein in a device without relevant interconnection reservoirs (a case). Two different exposures (10 seg and 4 min) are shown in the panel. Note the presence of a very pale band of α -synuclein in the B cell extract (asterisk) only detectable after 4 min of exposure. In these cultures, no endogenous α -synuclein labelling was observed, demonstrating detected α synuclein in B derived from interneuronal transport of exogenous α -synuclein protofibrils as also demonstrated in α -synuclein (Fig. 4a-d) p- α -synuclein staining Supplementary Anti-β-tubulin (Fig. 3e-h, Fig. 3). was used for protein characterization. *Scale bar*: $a = 400 \mu m$ pertains to **b**.



Supplementary Fig. 3.

Analysis of human α -synuclein fibril transport using microfluidic devices. **a** 2D representation of the two PDMS devices used in the present study. **b-g** Primary cortical cultures of *Prnp*^{+/+} were maintained in the devices for 5-7 days. Then human recombinant α -synuclein was added to A reservoir (*asterisk*) (**b**,**d**,**f**), neuronal presence of p- α -synuclein in A was analysed (**c**), and their transport to B reservoir was analysed with p- α -synuclein immunocytochemistry (**d-g**). **b-c** Examples of double-labelled neurons (TUJ1/p- α -synuclein) in A reservoir (indicated with camera icon) showing p- α -synuclein labelling as LBL (*arrows* in **b** and **c**). **d-g** Examples of p- α -synuclein-labelled neurons and axons (TUJ1-positive, *arrows*) in B reservoir (indicated with camera with camera icon). *Scale bar*: b and f = 40 µm pertains to **c-e** and **g**, respectively.





Overexposed (15 min) uncropped films showing the absence of α -synuclein in cultured media of B in contrast to A reservoir, indicating the absence of fluidic flux between reservoirs illustrated in Fig. 3i.



Supplementary Fig. 5.

a Western blot illustrating the overexpression of the different PrP^{C} constructs ($\Delta F35$, ΔHR , ΔCC , and PrP^{C}) in HEK293 cells. The cellular distribution of the constructs in the plasma membrane can be seen in [54] **b** Histogram illustrating the activation of caspase 3 by the different PrP^{C} constructs (including ΔCD and ΔCR constructs). Data represent the mean ± S.E.M. of three different experiments. *** *P* < 0.01, ANOVA Bonferroni post hoc test.

Capítulo II:

Disease-specific changes in Reelin protein and mRNA in the neocortex and cerebrospinal fluid in neurodegenerative dementias

Laura Urrea^{1,*}, Laia Lidón^{1,*}, Franc Llorens², Pau Pastor³, Inga Zerr⁴, Daniel Alcolea^{*}, Alberto Lleó^{*}, Rosalina Gavín¹, Isidre Ferrer⁵, José A. Del Río^{1,⊠}

Resumen:

Reelina es una glicoproteína secretable implicada en el neurodesarrollo. En el cerebro adulto, Reelina participa en la plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria. Consecuentemente, alteraciones en la expresión de Reelina da lugar a fallos en la sinapsis o a la neurodegeneración. Reelina puede ser escindida por distintas proteasas dando lugar a varios fragmentos. El fragmento de 180kDa detectado mediante inmunoblot correlaciona con la forma activa de Reelina presente en muestras humanas.

Anteriormente, se han estudiado los niveles de Reelina en el líquido cefaloraquídeo (LCR) en la enfermedad de Alzheimer (EA). Aunque varios grupos han reportado resultados contradictorios respecto a los niveles de Reelina en la EA comparado con los casos controles. Recientemente, se ha publicado un aumento de los niveles del RNA (del inglés ribonucleic acid) mensajero (mRNA) en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (sCJD).

En este estudio, se ha determinado los cambios de la proteína Reelina y de su mRNA en distintas enfermedades neurodegenerativas. Se han estudiado los niveles de la EA, demencia por cuerpos de Lewy (DLB, del inglés dementia with lewy bodies), la enfermedad de Parkinson (EP) y la sCJD tipo 1 y 2. Por un lado, se ha observado un aumento del mRNA en la neocorteza de sCJD tipo 1 y una reducción de los niveles en DLB. Además, los niveles del mRNA de Reelina tienden a subir en la EA. Por otro lado, el análisis por densitometria de la banda 180 kDa de Reelina revela que los niveles proteicos presentan un aumento en sCJD tipo 1 y un descenso estadísticamente significativo en la EA. Los niveles de Reelina en la EP se mantienen y en DLB tienden a bajar.

Los niveles bajos de Reelina en la EA y DLB pueden correlacionar con la progresión de la enfermedad. Contrariamente, se ha observado un aumento de Reelina en sCJD. Estas diferencias probablemente se deben a las diferencias de los procesos inflamatorios que se desencadenan en cada enfermedad. **Title:** Disease-specific changes in Reelin protein and mRNA in the neocortex and cerebrospinal fluid in neurodegenerative dementias

Running head: Reelin and neurodegenerative diseases

Authors: Laura Urrea^{1,*}, Laia Lidón^{1,*}, Franc Llorens², Pau Pastor³, Inga Zerr⁴, Daniel Alcolea^{*}, Alberto Lleó^{*}, Rosalina Gavín¹, Isidre Ferrer⁵, José A. Del Río^{1, \boxtimes}

Addresses: 1) [1] Molecular and Cellular Neurobiotechnology, Institute of Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain. [2] Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. [3] Center for Networked Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Barcelona, Spain. [4] Institute of Neuroscience, University of Barcelona. Barcelona, Spain.

2) [1] Department of Neurology, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen, Germany.
[2] Center for Networked Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases, Barcelona, Spain.

3) [1] Fundació per la Recerca Biomèdica i Social Mútua de Terrassa, Terrassa, Barcelona, Spain. [2] Center for Networked Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Barcelona, Spain. [3] Memory and Movement Disorders Units, Department of Neurology, Hospital Universitari Mutua de Terrassa, Terrassa, Barcelona, Spain. [4] Neurogenetics Laboratory, Division of Neurosciences, Center for Applied Medical Research, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain.

4) [1] Department of Neurology, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen, Germany.

[2] German Center for Neurodegenerative Diseases-DZNE Site GöttingenBonn, Germany.

5) [1] Neuropathology, Pathologic Anatomy Service, Bellvitge University Hospital, IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Spain. [2] Department of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona, Hospitalet de Llobregat, Spain. [3] Biomedical Network Research Center on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Institute Carlos III, Hospitalet de Llobregat, Spain. [3] Institute of Neurosciences, University of Barcelona. Barcelona, Barcelona, Spain.

* these authors contributed equally to this work

^{IM} **Correspondence to:** Prof. José Antonio del Río, Molecular and Cellular Neurobiotechnology. Institute of Bioengineering of Catalonia (IBEC). Barcelona Institute of Science and Technology (BIST). Parc Científic de Barcelona. Baldiri Reixac 15-21, E-08028 Barcelona, Spain

Phone: (+34) 93 402 0296

Fax: (+34) 93 402 0183

email (1): jadelrio@ibecbarcelona.eu

Abstract

Reelin is an extracellular glycoprotein that plays crucial roles during development and synapse plasticity of the central nervous system (CNS). Reelin levels in adult brain must be maintained to a certain level to ensure neural homeostasis since its decrease may lead to synaptic dysfunction or neurodegeneration. Indeed, levels changes of Reelin in biological fluids (i.e., cerebrospinal fluid (CSF)) has been analyzed during neurodegeneration (typically Alzheimer's disease (AD)) with conflicting results. In the present study, we expand this analysis to determine changes in Reelin and *Reln* mRNA in AD, Dementia Lewy Bodies (DLB), Parkinson's disease (PD) and Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD).

Introduction

The extracellular glycoprotein Reelin plays relevant roles during development, circuit maturation and synapse maintenance of the central nervous system (CNS)[1-3]. The full length Reelin protein (420 kDa) is cleaved by several extracellular proteases at two sites to generate smaller N-term proteolyzed peptides of 310 kDa and 180 kDa, together with a 190 kDa central domain peptide and additional lower molecular weight C-term peptides. Thus, presence of active form of Reelin in biological samples correlates with the amount of a \approx 180-190 kDa band in Western blots using N-term directed antibodies (i.e., 4G10 or 142). Reelin levels in adult brain must be maintained to a certain level to ensure neural homeostasis since its decrease may lead to synaptic dysfunction or neurodegeneration. Indeed, levels changes of Reelin in biological fluids (i.e., cerebrospinal fluid (CSF)) has been analyzed by several groups during neurodegeneration (typically Alzheimer's disease (AD)). These studies report either decreased[4], increased[5]/[6] or unchanged[7,8] levels of Reelin between AD vs controls cases. In addition to this, very few data is published describing putative Reelin changes in other neurodegenerative diseases (i.e., Dementia with Lewy bodies (DLB) or Parkinson's disease). In a recent publication[9], our group developed a "pilot" study with low number of samples analyzing the changes in *Reln* mRNA levels in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD)[9]. In the present study, we expand our study exploring in detail the putative changes of Reelin and Reln in both the neocortex and CSF in AD, DLB or Parkinson's disease (PD) and in type I and II sCJD compared to control samples. Results indicate an increase of *Reln* in brain parenchyma between sCJD(I) and nsCJD (P = 0.0817) and a reduction between DLB and nonneurodegenerative (nND) subjects (P = 0.0591). Reln levels were similar between AD and nAD. Densitometric analysis of the \approx 180 kDa band of Reelin revealed an increase in sCJD(I) (P = 0.0817) and, surprisingly a statistically significant decrease in AD (P =0.0045).

Methods

Human samples

The brains of control and patients with sCJD, PD, AD and DLB were obtained from 3 to 8 h after death and were immediately prepared for morphological and biochemical studies (Supplementary Table I sCJD; Supplementary Table II for PD, Supplementary Table III for DLB and Supplementary Table IV for AD). CSF from AD, PD, DLB and sCJD was collected and processed as indicated (REF). The main clinical and pathological characteristics of postmortem samples are summarized in Table I-IV. For biochemical studies, samples of the frontal cortex were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. For neuropathological diagnosis, 4% formalin-fixed, formic acid-treated samples were embedded in paraffin. The neuropathological study was carried out on de-waxed 4-µm-thick paraffin sections of the frontal (area 8), primary motor, primary sensory, parietal, temporal superior, temporal inferior, anterior gyrus cinguli, anterior insular, and primary and associative visual cortices; entorhinal cortex and hippocampus; caudate putamen and globus pallidus; medial and posterior thalamus; hypothalamus; Meynert nucleus; amygdala; midbrain (two levels), pons and bulb; and cerebellar cortex and dentate nucleus. The sections were stained with hematoxylin and eosin, Klüver Barrera, and, for immunohistochemistry to glial fibrillary acidic protein (Dako, Glostrup, Denmark, dilution 1:250), CD68 for microglia (Dako, dilution 1:100), β -amyloid (Boehringer, Ingelheim, Germany, dilution 1:50), tau AT8 (Innogenetics, Ghent, Belgium, dilution 1:500), \mathbb{B} B-crystallin (Abcam, Cambridge, MA, USA, dilution 1:200), and PrP^C, (clone 3F4, Dako, dilution 1:100) with and without proteinase K pre-incubation).

Western blotting and quantification

Samples from different sources were processed for western blot. In each detection, randomly selected control and patient-samples were included. The collected samples were homogenized in (10% wt/vol) of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4/150 mM NaCl/0.5% Triton X-100/0.5% Nonidet P-40 and a mixture of protease and phosphatase inhibitors. After this, samples were centrifuged at 15,000 g for 20 minutes at 4º C. The resulting supernatant was normalized for protein content using BCA kit (Pierce). Cell extracts were boiled at 96° C for 3 minutes, followed by 6% SDS electrophoresis, and electrotransferred to nitrocellulose membranes for 2 hours at 4º C. Membranes were then blocked with 5% not-fat milk in 0.1M Tris-buffered saline (pH. 7.4) for 2 hours and incubated overnight in 0.5% blocking solution containing primary antibodies (4G10; 1:1000 diluted. After incubation with peroxidase-tagged secondary antibodies (1:2000 diluted), membranes were revealed by ECL-plus chemiluminescence western blot kit (Amershan-Pharmacia Biotech). In our experiments, each nitrocellulose membrane was used to detect Reelin (4G10, Millipore) and tubulin (1:5000; Sigma). For quantification, developed films were scanned at 2,400 x 2,400 dpi (i800 MICROTEK high quality film scanner), and the densitometric analysis was performed using Quantity One Image Software Analysis (Biorad). Statistical analysis of the obtained data was performed using Kruskal-Wallis test (Multiple comparison test) or Mann-Whiney test (Paired sample comparison) using GraphPad Prism 5.0c software (Mac OS X, Grahpad). Data are presented as mean \pm standard deviation (SD). Differences between groups were considered statistically significant at * P < 0.1; ** P < 0.05.

<u>RT-qPCR</u>

Quantitative real time PCR was performed on total RNA extracted with mirVana's isolation kit (Ambion, Austin, TX, USA) from the cortex of human samples. Purified RNAs were used to generate the corresponding cDNAs, which served as PCR templates for mRNA quantification. PCR amplification and detection were performed with the ROCHE LightCycler 480 detector, using 2x SYBR GREEN Master Mix (Roche) as reagent, following the manufacturer's instructions. The reaction profile was: denaturationactivation cycle (95º C for 10 minutes) followed by 40 cycles of denaturationannealing-extension (95° C for 10 minutes, 72° C for 1 minute, 98° C continuous). mRNA levels were calculated using the LightCycler 480 software. Data were analyzed with SDS 1.9.1 Software (Applied Biosystems) following the 2-44CT method of Applied Biosystems. Primers were as follows: Reln (5'- actctgtcaacagctcaagc -3') and (5'tggtcaattgcccagctttg -3). The results were normalized for the expression levels of the housekeeping qapdh (5'-aggtcggtgtgaacggatttg-3') and (5'gene, tgtagaccatgtagttgaggtca-3'), which were quantified simultaneously with the target gene.

Results

As indicated, data analyzing CSF Reelin levels in AD reported diverse results (see introduction for references). Thus, due that CSF Reelin levels could be affected by sample storage and handling conditions[10], we aimed to correlate their levels in brain parenchyma and CSF in different neurodegenerative diseases. First, Western blotting detection of Reelin using the N-term directed antibodies 4G10 or the ab142 renders similar band pattern labeling (Figure 1) between the different neurodegenerative diseases analyzed. Three relevant bands can easily be defined at \approx 420 kDa, \approx 310 kDa and \approx 180 kDa (Figure 1). In addition, additional bands of lower molecular weight can also be seen. The densitometric analysis of the \approx 180 kDa Reelin band in developed films revealed a statistically significant reduction of Reelin in AD compared to control samples (Figure 2). In contrast, no changes were observed in PD cases compared to controls, and a tendency to decreased levels were seen in DLB subjects. With respect to sCJD, a moderate increase in Reelin were only determined in sCJD(I) cases compared to nsCJD (Figure 2). Next, RT-qPCR experiments of Reln reported a non-statistical increase of *Reln* between AD (V-VI) and controls, in contrast to WB data (Figure 3). Reln increase was also observed between sCJD(I) and controls corroborating, in this case, WB data (Figure 3). In addition, the tendency observed in DLB sowing a moderate reduction in Reelin was also corroborated by RT-qPCR quantification.

Discussion

Our current results, demonstrate a decrease in *Reln* mRNA and protein in frontal cortex of AD and DLB. In contrast, increased levels of Reelin were observed in sCJD(I) and no changes were determined between PD patients and control subjects. With respect to AD, our data corroborate previous studies indicating decreased levels of Reelin during aging and neurodegeneration [4,11,12]. Due that decreased Reelin correlates with cognitive decline in mice models of neurodegeneration, low levels of Reelin signaling could contribute to the clinical symptoms and pathological progression in AD and DLB. On the other hand, Reelin levels are increased in CJD. These changes are likely to be associated with the different astroglial reactivity observed between AD-DLB-PD and sCJD (i.e., see [13] for details) also following other biomarkers involved in inflammatory processes [14,15].

Acknowledgements

The authors thank Tom Yohannan for editorial advice. This research was supported by grants from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MEICO / FEDER) (BFU2015-67777-R), the Spanish Prion Network (Prionet Spain, AGL2015-71764-REDT), the Generalitat de Catalunya (SGR2014-1218), CIBERNED (PRY-2016-2, MFDEND), CERCA Programme / Generalitat de Catalunya and La Marató de TV3 to JADR. IF was funded by the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III – Fondos FEDER, a Way to Build Europe FIS grant PI14/00757 and PI17/00809. L.U. was supported by the Marató the TV3.

Author contributions

L.U., F.Ll. and L.L performed most of the experiments. P.P., A.Ll., D.A., I.Z., I.F., R.G. and J.A.D.R. designed and supervised the work, I.F. and J.A.D.R analyzed results. J.A.D.R. wrote the draft circulated among the authors.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.
References

1. Frotscher M (2010) Role for Reelin in stabilizing cortical architecture. Trends Neurosci 33 (9):407-414.

2. Pujadas L, Gruart A, Bosch C, Delgado L, Teixeira CM, Rossi D, de Lecea L, Martinez A, Delgado-Garcia JM, Soriano E (2010) Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. J Neurosci 30 (13):4636-4649.

3. Beffert U, Weeber EJ, Morfini G, Ko J, Brady ST, Tsai LH, Sweatt JD, Herz J (2004) Reelin and cyclin-dependent kinase 5-dependent signals cooperate in regulating neuronal migration and synaptic transmission. J Neurosci 24 (8):1897-1906.

4. Herring A, Donath A, Steiner KM, Widera MP, Hamzehian S, Kanakis D, Kolble K, ElAli A, Hermann DM, Paulus W, Keyvani K (2012) Reelin depletion is an early phenomenon of Alzheimer's pathology. J Alzheimers Dis 30 (4):963-979.

5. Cuchillo-Ibanez I, Balmaceda V, Mata-Balaguer T, Lopez-Font I, Saez-Valero J (2016) Reelin in Alzheimer's Disease, Increased Levels but Impaired Signaling: When More is Less. J Alzheimers Dis 52 (2):403-416.

6. Saez-Valero J, Costell M, Sjogren M, Andreasen N, Blennow K, Luque JM (2003) Altered levels of cerebrospinal fluid reelin in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. J Neurosci Res 72 (1):132-136.

7. Ignatova N, Sindic CJ, Goffinet AM (2004) Characterization of the various forms of the Reelin protein in the cerebrospinal fluid of normal subjects and in neurological diseases. Neurobiol Dis 15 (2):326-330.

8. Notter T, Knuesel I (2013) Reelin immunoreactivity in neuritic varicosities in the human hippocampal formation of non-demented subjects and Alzheimer's disease patients. Acta Neuropathol Commun 1:27.

9. Mata A, Urrea L, Vilches S, Llorens F, Thune K, Espinosa JC, Andreoletti O, Sevillano AM, Torres JM, Requena JR, Zerr I, Ferrer I, Gavin R, Del Rio JA (2016) Reelin Expression in Creutzfeldt-Jakob Disease and Experimental Models of Transmissible Spongiform Encephalopathies. Mol Neurobiol.

10. Botella-Lopez A, Burgaya F, Gavin R, Garcia-Ayllon MS, Gomez-Tortosa E, Pena-Casanova J, Urena JM, Del Rio JA, Blesa R, Soriano E, Saez-Valero J (2006) Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103 (14):5573-5578.

11. Krstic D, Pfister S, Notter T, Knuesel I (2013) Decisive role of Reelin signaling during early stages of Alzheimer's disease. Neuroscience 246:108-116.

12. Chin J, Massaro CM, Palop JJ, Thwin MT, Yu GQ, Bien-Ly N, Bender A, Mucke L (2007) Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. J Neurosci 27 (11):2727-2733.

13. Llorens F, Thune K, Tahir W, Kanata E, Diaz-Lucena D, Xanthopoulos K, Kovatsi E, Pleschka C, Garcia-Esparcia P, Schmitz M, Ozbay D, Correia S, Correia A, Milosevic I, Andreoletti O, Fernandez-Borges N, Vorberg IM, Glatzel M, Sklaviadis T, Torres JM, Krasemann S, Sanchez-Valle R, Ferrer I, Zerr I (2017) YKL-40 in the brain and cerebrospinal fluid of neurodegenerative dementias. Mol Neurodegener 12 (1):83.

14. Garcia-Esparcia P, Lopez-Gonzalez I, Grau-Rivera O, Garcia-Garrido MF, Konetti A, Llorens F, Zafar S, Carmona M, Del Rio JA, Zerr I, Gelpi E, Ferrer I (2017) Dementia with Lewy Bodies: Molecular Pathology in the Frontal Cortex in Typical and Rapidly Progressive Forms. Front Neurol 8:89.

15. Llorens F, Schmitz M, Ferrer I, Zerr I (2016) CSF biomarkers in neurodegenerative and vascular dementias. Prog Neurobiol 138-140:36-53.



Figure 1

Figure 1. Example of Western blotting determination of Reelin different neurodegenerative diseases. Brain samples were processed as indicated in Material and Methods. Notice the presence of the 3 relevant bands 420, 310 and 180 after incubation with N-term antibody 4G10. Tubulin was included as loading control.





Figure 2. Graphs showing the densitometric study of the 180 kDa band of Reelin in revealed films in different ND. Plots show mean ± S.E.M. of each different type of mouse. Each dot corresponds to one sample. Asterisks indicate statistical differences between groups. ANOVA Bonferroni post hoc test.



Figure 3

Figure 3. Graphs showing the densitometric study of the *Reln* mRNA levels in different ND. Plots also show mean ± S.E.M. of each different sample. Each dot corresponds to one sample. Asterisks indicate statistical differences between groups. ANOVA Bonferroni *post hoc* test.

Capítulo III:

Reelin Expression in Creutzfeldt-Jakob Disease and Experimental Models of Transmissible Spongiform Encephalopathies

Mata A*, Urrea L*, Vilches S, Llorens F, Thüne K, Espinosa JC, Andréoletti O, Sevillano AM, Torres JM, Requena JR, Zerr I, Ferrer I, Gavín R, Del Río JA

Resumen:

Reelina es una glicoproteína que se secreta a la matriz extracelular, es necesaria para la organización citoarquitectónica del sistema nerviosa central. Durante el neurodesarrollo, las neuronas Cajal-Retzius secretan Reelina para la correcta laminación de la corteza. En adultos, Reelina esta sintetizada principalmente por interneuronas GABAérgicas de la neocorteza y regula la plasticidad neuronal y la sinaptogénesis. Reelina se une a los receptores VLDLR (del inglés very low density lipoprotein receptor) y ApoER2 (del inglés apolipoprotein receptor 2) que desencadenan la cascada de señalización. Como consecuencia, Disabled 1 (Dab1) que es un adaptador citosólico se fosforila.

Anteriormente, se ha descrito el papel de Reelina en la Enfermedad de Alzheimer (EA) y se ha reportado que sus niveles de expresión aumentan en la corteza frontal y en el líquido cefalorraquídeo. Incluso, se han detectado placas amiloides que presentan Reelina. En este estudio, describimos los cambios de Reelina en las prionopatías.

En cultivos neuronales tratados con péptidos priónicos recombinantes de humano se observa un aumento de Reelina. Aunque la fosforilación de Dab1 es anterior al aumento de Reelina. Además, se identifica que el aumento de Reelina es dependiente de las especies reactivas de oxígeno que se generan en presencia del prión *in vitro*.

El estudio de muestras de corteza frontal de pacientes de Creutzfeldt-Jakob (CJD, del inglés Creutzfeldt-Jakob disease) demuestra que los niveles de la proteína y RNA (del inglés ribonucleic acid) mensajero de Reelina aumentan. En animales silvestres inoculados intracranealmente con distintas cepas de prión proveniente de ratón se observa que los niveles de Reelina descienden. Aunque, animales Tg340, que expresan PrP^c humana endógena, después de ser inoculados con extracto de cerebro de CJD presentan un aumento de los niveles de proteína y RNA mensajero de Reelina.



Reelin Expression in Creutzfeldt-Jakob Disease and Experimental Models of Transmissible Spongiform Encephalopathies

Agata Mata^{1,2,3,4} • Laura Urrea^{1,2,3,4} • Silvia Vilches^{1,2,3,4} • Franc Llorens⁵ • Katrin Thüne⁵ • Juan-Carlos Espinosa⁶ • Olivier Andréoletti⁷ • Alejandro M. Sevillano^{8,9} • Juan María Torres⁶ • Jesús Rodríguez Requena^{8,9} • Inga Zerr⁵ • Isidro Ferrer^{10,11,12} • Rosalina Gavín^{1,2,3,4} • José Antonio del Río^{1,2,3,4}

Received: 11 July 2016 / Accepted: 28 September 2016 © Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Reelin is an extracellular glycoprotein involved in key cellular processes in developing and adult nervous system, including regulation of neuronal migration, synapse formation, and plasticity. Most of these roles are mediated by the intracellular phosphorylation of disabled-1 (Dab1), an intracellular adaptor molecule, in turn mediated by binding Reelin to its receptors. Altered expression and glycosylation patterns of Reelin in cerebrospinal and cortical extracts have been reported in Alzheimer's disease. However, putative changes in Reelin are not described in natural prionopathies or experimental models of prion infection or toxicity. With this is mind, in the present study, we determined that Reelin protein and mRNA levels in-

Agata Mata and Laura Urrea contributed equally to this study.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12035-016-0177-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

José Antonio del Río jadelrio@ibecbarcelona.eu; jadelrio@ub.edu

- ¹ Molecular and Cellular Neurobiotechnology, Institute of Bioengineering of Catalonia (IBEC), Parc Científic de Barcelona, Baldiri Reixac 15-21, 08028 Barcelona, Spain
- ² Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain
- ³ Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Barcelona, Spain
- ⁴ Institute of Neuroscience, University of Barcelona, Barcelona, Spain
- ⁵ Department of Neurology, German Center for Neurodegenerative Diseases – DZNE, Universitätsmedizin Göttingen, Bonn, Germany

Published online: 10 October 2016

creased in CJD human samples and in mouse models of human prion disease in contrast to murine models of prion infection. However, changes in Reelin expression appeared only at late terminal stages of the disease, which prevent their use as an efficient diagnostic biomarker. In addition, increased Reelin in CJD and in in vitro models does not correlate with Dab1 phosphorylation, indicating failure in its intracellular signaling. Overall, these findings widen our understanding of the putative changes of Reelin in neurodegeneration.

Keywords Reelin · Creutzfeldt-Jakob disease · Dab-1 · Cellular prion protein

- ⁶ Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), Madrid, Valdeolmos, Spain
- ⁷ UMR INRA ENVT 1225, Interactions Hôtes Agents Pathogènes, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse, France
- ⁸ CIMUS Biomedical Research Institute, University of Santiago de Compostela-IDIS, 15782 Santiago de Compostela, Spain
- ⁹ Department of Medicine, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain
- ¹⁰ Institut de Neuropatologia, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain
- ¹¹ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Barcelona, Spain
- ¹² Institute of Neuroscience, University of Barcelona, Barcelona, Spain

D Springer

Introduction

Reelin is an extracellular matrix protein essential for proper neuronal migration in laminated areas of the developing brain [1, 2]. In adulthood, Reelin has been localized in synaptic terminals (especially from GABAergic interneurons) and implicated in neuronal plasticity [3, 4]. In fact, Reelin actively participates as a key actor in several neural processes such us cell survival [5] and synaptic plasticity [6-8] as well as in pathological conditions such as ischemia [9, 10] and neurodegeneration [11-13]. These results point to the maintenance of Reelin protein levels as crucial for correct homeostatic balance in developing and adult nervous system. In neural tissue, Reelin binds to Apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2) and Very Low-Density Lipoprotein Receptor (VLDLR), triggering tyrosine phosphorylation of disabled-1 (Dab1), a cytoplasmic adaptor protein, by kinases of the Src family [14-17]. Following phosphorylation, Dab1 protein recruits the p85a subunit of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), stimulating AKT-phosphorylation, glycogen synthase kinase 3ß (GSK3β), and CrkL [18, 19].

Reelin protein levels in the brain could be modified by several factors such as hormones [20–24], oxidative stress [25], perinatal stress [26], and exercise [27]. Some of these conditions (e.g., hormone misbalance and oxidative stress) are common features in diseases such as schizophrenia [28, 29] and autism [30], as well as neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease [31, 32] and prionopathies [33]. Indeed, Reelin protein levels are altered in schizophrenia [34] and autism [35] as well as in Alzheimer's disease [36–38]. However, very few data have been reported concerning Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) or related models of infective transmissible spongiform encephalopathies (TSEs).

Decreased Reelin levels has been reported in aging [39, 40], mild cognitive dementia, and Alzheimer's disease [36, 41, 42]. Although a low number of Reelin-positive cells have been reported in aged brains, the Reelin decrease in Alzheimer's disease is likely associated with their presence in senile plaques enriched in aggregated *β*-amyloid [24, 43, 44]. In fact, it has been suggested that histologically [39] and biochemically [12], Reelin binds to oligomeric βamyloid preventing its accumulation in senile plaques. This is in contrast to other studies indicating increased levels of Reelin in late stages (Braak stages III-VI) of Alzheimer's disease [38]. Nonetheless, current studies suggest that reduced levels of Reelin in Alzheimer's disease increases the amyloid burden observed in the disease [7, 12, 45]. In addition, a recent study reports that Reelin produced in the presence of aggregated β-amyloid showed altered glycosylation [46] and therefore was a nonfunctional protein [11]. Thus, the combination of low protein levels and non-functional Reelin may constitute a vicious circle that promotes the progression of the cognitive

Springer

impairment in Alzheimer's disease by diminishing synaptic function [13, 47] and cytoskeletal stability [11].

As indicated above, very few data on Reln mRNA or protein levels are reported in Creutzfeldt-Jakob disease or infective prionopathies. In fact, only a recent study analyzing changes in mRNA expression by microarrays in RMLinfected cerebellar organotypic cultures indicated a slight decrease in Reln mRNA at late stages (38 and 45 days) postinfection [48]. This decrease seemed likely to be associated with the relevant granule cell death triggered by the RML infection. In a previous study [49], we determined that mimetic peptides in aggregated form of the human sequence of the cellular prion protein (PrP106-126) were able to increase the phosphorylation of Dab1. In parallel, our studies also pointed to an increase in Dab1 phosphorylation and degradation in CJD patients, especially in those with prion type I and Met/ Met 129 polymorphism [50]. Thus, high levels of p-Dab1 leading to low levels of Dab1 rely on low numbers of βamyloid plaques [50].

Taking this into account and as natural follow-up to our previous studies, we aimed to explore in the present study the putative changes of Reelin levels in prionopathies employing cytotoxicity models using primary neuronal cultures, prion-inoculated mice, and human sporadic CJD postmortem samples. Results demonstrate that neurons incubated with mimetic prion peptides increased Reelin expression likely by reactive oxygen species (ROS) production. In addition, Reelin and *Reln* mRNA are increased in post-mortem samples of CJD patients as well as in CJD-infected Tg340 mice in contrast to mice infected with mouse prions.

Materials and Methods

Mouse Strains and Genotyping

Adult male C57Bl6/129sv-Prnp^{0/0} (B6129 Prnp^{Zrchl/Zrchl} Zurich I) mice were purchased from the European Mouse Mutant Archive (EMMA, Monterotondo, Italy) [51]. We backcrossed to C57BL/6J for at least 8 generations to obtain 6-7 % of 129 microsatellites B6.129 Prnp^{0/0} and control littermates B6.129 Prnp^{+/+}. Specific primers to Prnp genotyping were designed in our laboratory based on the original P3 and P10 primers as described [51]: neo: 5'gccttctatcgccttcttgac-3'; 3' NCnew: 5'-gctacaggtggataacccctc-3' and P10new: 5'-cataatcagtggaacaagccc-3'. 40 cycling condition were 45" 95 °C; 45" 62 °C; 1' 72 °C, followed by a final extension at 72 °C for 5 min. Prnp-overexpressing mice (Tga20) were purchased from EMMA (Monterotondo, Italy). They were generated as described by Marek et al. [52] and backcrossed in our lab with B6.129 Prnp^{0/0} mice for 7 generations. For Tga20 mice, the transgene was detected using primers specific to the Tg20 allele

Mol Neurobiol

5'-caacegacgtgaagcattetgeeta-3' and 5'-cetgggacteettetg gtaccgggtgacgc-3' as indicated [53]. All experiments were performed under the guidelines and protocols of the Ethical Committee for Animal Experimentation (CEEA) of the University of Barcelona, and the protocol for the use of animals in this study was reviewed and approved by the CEEA of the University of Barcelona (CEEA approval no. 276/16 and 141/15).

Mice Inoculated with Different Prion Strains

As model of mouse prion diseases, we used B6.129 Prnp^{+/+} or C57BL/6J intracranially inoculated with two different mouse-adapted prion strains (22L, Mo-BSE) or with GPI-anchorless PrP^{SC} as previously described [54, 55]. As mouse model of sCJD, we used the Tg340 mouse line inoculated with sCJD prions [56]. Tg340 mice were intracranially inoculated with an sCJD isolate obtained from the UK CJD reference center in Edinburgh [55]. Briefly, 6- to 10-week-old female mice were anesthetized and inoculated with 2 mg of brain equivalent (20 µl of a 10 % brain homogenate) in the right parietal lobe using a 25-gauge disposable hypodermic needle. The mice were observed daily and their neurological status was assessed weekly. When clinically progressive TSE disease was evident, the animals were killed and their brains collected. Brains from those animals were dissected and separated brain zones were frozen at -80 °C. Mouse inoculation experiments were carried out in strict accordance with the recommendations in the guidelines of the Code for Methods and Welfare Considerations in Behavioral Research with Animals (Directive 86/609EC), and all efforts were made to minimize suffering. Experiments were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the author's institutions (INIA and INRA; and University of Santiago de Compostela, 15005AE/12/FUN01/PAT05/JRR3).

Human CJD Cases

The brains of 26 patients with sporadic CJD were obtained from 3 to 8 h after death and immediately prepared for morphological and biochemical studies. The main clinical and pathological characteristics are summarized in Table 1. For biochemical studies, samples of the frontal cortex were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until use. The standard neuropathological study was carried out on de-waxed 4-µm thick paraffin sections of several brain regions (see [50] for description).

| estern blot study | | | | | | |
|-------------------|--------|-----|-----------|----------|--|--|
| ase number | Gender | Age | Codon 129 | PrP type | | |
| JD1 | М | 25 | ММ | 1 | | |
| JD2 | M | 79 | MM | 1 | | |
| JD3 | F | 82 | MM | 1 | | |
| JD4 | F | 63 | VV | 1 | | |
| JD5 | F | 54 | MM | 1 | | |
| JD6 | F | 65 | MM | 1 | | |
| JD7 | M | 52 | MM | 1 | | |
| JD8 | M | 61 | MM | 1 | | |
| JD9 | F | 60 | MM | 1 | | |
| | | | | | | |

Table 1 W

| Case number | Gender | Age | Codon 129 | PrP typ |
|-------------|--------|-----|-----------|---------|
| CJD1 | М | 25 | ММ | 1 |
| CJD2 | M | 79 | MM | 1 |
| CJD3 | F | 82 | MM | 1 |
| CJD4 | F | 63 | VV | 1 |
| CJD5 | F | 54 | MM | 1 |
| CJD6 | F | 65 | MM | 1 |
| CJD7 | M | 52 | MM | 1 |
| CJD8 | M | 61 | MM | 1 |
| CJD9 | F | 60 | MM | 1 |
| CJD10 | M | 56 | MM | 1 |
| CJD11 | M | 74 | MM | 1 |
| CJD12 | F | 87 | MV | 1 |
| CJD13 | F | 85 | MM | 1 |
| CJD14 | F | 70 | MM | 1 |
| CJD15 | F | 64 | MM | 1 |
| CJD16 | M | 55 | VV | 1 |
| CJD17 | M | 73 | MM | 2 |
| CJD18 | F | 67 | MM | 2 |
| CJD19 | F | 63 | MM | 2 |
| CJD20 | F | 76 | VV | 2 |
| CJD21 | F | 52 | VV | 2 |
| CJD22 | M | 76 | VV | 2 |
| CJD23 | M | 71 | VV | 2 |
| CJD24 | M | 66 | VV | 2 |
| CJD25 | F | 70 | MV | 2 |
| CJD26 | M | 77 | MM | 2 |
| Control1 | M | 53 | | |
| Control2 | M | 43 | | |
| Control3 | M | 59 | | |
| Control4 | M | 56 | | |
| Control5 | M | 43 | | |
| Control6 | M | 47 | | |
| Control7 | M | 56 | | |
| Control8 | F | 65 | | |
| Control9 | F | 66 | | |
| Control10 | F | 69 | | |

F female, M male, MM methionine, V valine, PrPsc type 1 lower band of glycosylated PrPsc of 21 kD, type 2 lower band of glycosylated PrPsc of 10 kD

Primary Embryonic Neuronal Cultures

E15.5-16.5 mouse embryo brains were dissected and washed in ice-cold 0.1 M PBS containing 6.5 mg/ml glucose. The meninges were removed and the cortices isolated. Tissue pieces were trypsinized for 15 min at 37 °C. After the addition of horse serum and centrifugation, the cells were dissociated by trituration in 0.1 M PBS containing 0.025 % DNAse with a

D Springer

polished pipette. Dissociated cells were plated at ~3000 cells/ mm^2 on plates (Nunc, Denmark) coated with poly-D-lysine (Sigma, UK). The culture medium was Neurobasal supplemented with 2 mM glutamine, 6.5 mg/ml of glucose, antibiotics, and B27 (Invitrogen-Life Technologies, Belgium). After 72 h, AraC 5 μ M (cytosine β -D-arabinofuranoside hydrochloride, C6645-100MG, Sigma) was added for 48 h to inhibit the growth of dividing non-neuronal cells. Cultures contained up to 95 % neurons (TUJ-1+) and were used after 15 days in vitro.

PrP₍₁₀₆₋₁₂₆₎ Peptide Treatments

Prion protein fragments 106-126 (human) and scrambled prion peptide were from Sigma. Peptides (1 µg/ µl) were dissolved in PBS 0.1 M and allowed to spontaneously aggregate at room temperature for 5 h and checked at electron microscopy. After aggregation, PrP₍₁₀₆₋₁₂₆₎ or scrambled peptides were added to the cortical cultures, which were incubated over a range of times from 30 min to 4 days. Afterward, the culture medium was collected at 4 °C and peptide-treated cells were scraped in homogenization buffer containing 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % glycerol, 1 % Triton X-100, protease inhibitor cocktail (Roche Farma), and phosphatase inhibitors (10 mM tetrasodium pyrophosphate 200 µM sodium orthovanadate, and 10 mM sodium fluoride). NADPH oxidase-inhibitor DPI (diphenyleneiodonium chloride) (10 µM) and Nacetyl-L-cysteine (NAC) (20 mM) were from Sigma.

Determination of Cell Death

Cell death was assessed using a propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich) [57]. Briefly, shortly after treatments in 24-well plates, 30 µM PI was added to each well. PI fluorescence was measured using a FL600 Microplate Fluorescence Reader (BioTeck). Spectrofluorometer analysis and settings were as follows: 530-nm excitation, 645nm emission, and data were recorded in relative fluorescence units. As an index of cell death that was not related to actual differences between samples, baseline fluorescence F_{1} was measured 1 h after addition of PI. Subsequent fluorescence readings were taken at several time points (F_{n}) after the onset of the experiment, keeping the cells in the incubator between measurements. Finally, the cells were permeabilized for 10 min at 37 °C with 500-µM digitonin (Sigma Aldrich) to obtain the maximum fluorescence (100 % of cell death or F_{max}). The percentage of cell death (%CD) was calculated as follows: %CD = $100 \times (F_n - F_1)/(F_{\text{max}} - F_1)$ [57].

🖄 Springer

Western Immunoblot

Samples from different sources were processed for western blot, including human post-mortem samples, mice cortical extract, and cultured cells. The collected samples were homogenized in (10 % w/v) of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4/ 150 mM NaCl/0.5 % Triton X-100/0.5 % Nonidet P-40 and a mixture of protease inhibitor cocktail (Roche) and phosphatase inhibitors (10 mM tetrasodium pyrophosphate, 200 µM sodium orthovanadate, and 10 mM sodium fluoride). After this, the samples were centrifuged at 15,000×g for 20 min at 4 °C. The resulting supernatant was normalized for protein content using BCA kit (Pierce). Cell extracts were boiled at 96 °C for 3 min, followed by 6 % SDS electrophoresis, and electro-transferred to nitrocellulose membranes for 2 h at 4 °C. Membranes were then blocked with 5 % non-fat milk in 0.1 M Tris-buffered saline (pH 7.4) for 2 h and incubated overnight in 0.5 % blocking solution containing primary antibodies. After incubation with peroxidase-tagged secondary antibodies (1:2000 diluted), the membranes were revealed by ECL-plus chemiluminescence western blot kit (Amershan-Pharmacia Biotech). In our experiments, each nitrocellulose membrane was used to detect reelin (4G10, Millipore), ApoER2 (Milipore), VLDL (MIllipore), β-actin (1:10,000; Sigma), or tubulin (1:5000; Sigma) PrP^C levels. For Dab1 immunoprecipitation, 1000 µg of total protein was incubated with aDab1 (Exalpha Biologicals, Watertown, MA, USA) at 4 µg in 500-µl total volume overnight at 4 °C. Afterward, immune complexes were precipitated using Protein-G-Sepharose (Amersham-Pharmacia Biotech; Barcelona, Spain) at 4 °C for 90 min. After centrifugation, proteins were eluted in twice-concentrated Laemmli sample buffer at 96 °C for 5 min, followed by 10 % SDS-PAGE and immunoblotting using the anti-phosphotyrosine 4G10 (Upstate Biotechnology Inc., NY, USA). The membranes were reprobed with ab7522 antibody for total Dab1 detection (Abcam, Cambridge, MA, USA) [49, 50].

Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

Quantitative real-time PCR was performed on total RNA extracted with mirVana's isolation kit (Ambion, Austin, TX, USA) from the cortex of CJD patients or from Tg340 mice. Purified RNAs were used to generate the corresponding cDNAs, which served as PCR templates for mRNA quantification. Two different sets of primers were used. First for the Tg340 mice, quantitative RT-PCR assays were performed in duplicate on cDNA samples obtained from the retrotranscription reaction diluted 1:20 in 384-well optical plates (Kisker Biotech, Steinfurt, GE) using the ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). The reactions were carried out using 20× TaqMan gene expression assays for genes and 2× TaqMan Universal PCR Master Mix

Mol Neurobiol

(Applied Biosystems). The reactions were conducted using the following parameters: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The fold change was determined using the Eq. $2^{-\Delta\Delta CT}$. Similar results were obtained using two different housekeeping genes for normalization (HPRT and GUSB). The assay numbers of RT-qPCR analysis were Mm00465200_m1 and Mm00465231_m1 for Reelin, Mm00446968_m1 for HPRT, and Mn00446958_g1 for the GUSB housekeeping genes.

For the human CJD samples, PCR amplification and detection were performed with the ROCHE LightCycler 480 detector, using 2× SYBR GREEN Master Mix (Roche) as reagent, following the manufacturer's instructions. The reaction profile was denaturation-activation cycle (95 °C for 10 min) followed by 40 cycles of denaturation-annealing-extension (95 °C for 10 min, 72 °C for 1 min, 98 °C continuous). mRNA levels were calculated using the LightCycler 480 software. Data were analyzed with SDS 1.9.1 software (Applied Biosystems) following the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method of Applied Biosystems. Primers were as follows: *Reln* (5'-actetgtcaacagctcaagc-3') and (5'tggtcaattgcccagctttg-3'). The results were normalized for the expression levels of the housekeeping gene, *gapdh* (5'aggtcggtgtgaacggatttg-3') and (5'-tgtagaccatgtagttgaggtca-3'), which were quantified simultaneously with the target gene [58].

Immunohistochemistry and In Situ Hybridization

In situ hybridization was carried out as described previously [59] on 40-µm frozen adult brain sections. Both sense and antisense riboprobes were labeled with digoxigenin according to the manufacturer's instructions (Roche Farma). For the immunohistochemistry studies of frozen brain sections, tissue was incubated with primary antibodies overnight, followed by appropriate secondary antibodies. Tissue binding primary antibody was detected using the ABC method. Briefly, free-floating sections were rinsed in 0.1 M PBS, and endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in 3 % H₂O₂ and 10 % methanol dissolved in 0.1 M PBS. After extensive rinsing, sections were incubated in 0.1 M PBS containing 0.2 % gelatin, 10 % normal goat serum, 0.2 % glycine, and 0.2 % Triton-X 100 for 1 h at room temperature. Afterward, sections were incubated for 24 h at 4 °C with the primary antibody: α-calbindin and *a*-parvalbumin (1:2000 diluted; Swant Antibodies, Switzerland). After that, sections were incubated with secondary biotinylated antibodies (2 h, 1:200 diluted) and streptavidin-horseradish peroxidase complex (2 h, 1:400 diluted). Peroxidase activity was revealed with 0.025 % diaminobenzidine (DAB) and 0.003 % hydrogen peroxide. After rinsing, sections were mounted onto slides, dehydrated, and cover-slipped with Eukitt™ (Merck). Samples were photo-documented using an Olympus BX61 microscope equipped with a cooled digital DP72L camera. For cell counting, the radial distribution of Reln-, calbindin-, or parvalbumin-positive cells was analyzed. Positive cells in individual layers were counted with a ×20 objective in 500-µm thick vertical strips covering the entire radial extent of the neocortex.



D Springer

Fig. 1 a, b Example of western blot determination of reelin in $Prnp^{+/r}$, $Prnp^{0.0}$, and Tga20. The quantification of the obtained results is plotted in b. Each *dot* corresponds to one experiment. c-e Low power

photomicrographs illustrating the distribution of Reln mRNA in the cerebral cortex of 3-month-old $Prnp^{0/0}$ (c) and $Prnp^{+/+}$ (d). e Radial distribution of Relnpositive neurons in Prnp^{0/0} and Prnp^{+/+} adult mice. Cortical layers are indicated on the Y axis. Bars represent the mean \pm S.E.M. of the total number of cells counted in eight consecutive sections of four adult mice per genotype. No statistical differences in the numbers of Reln-positive cells were seen between genotypes

Densitometry and Statistical Processing

Results

Adult Cortical Levels of Reelin Are Not Modified by Changes in Prnp Dosage

Endogenous levels of Prnp are reduced around 50 % in CJD patients [60]. This differs from what is reported in infected mice [61]. Therefore, we aimed to determine putative changes in the presence of Reelin in CJD patients and infection models and to determine whether Prnp expression levels correlated with changes in Reelin protein levels (Fig. 1). Cortical brain extracts from Prnp^{o/o}, Prnp^{+/+}, and Tga20 mice were processed for reelin detection with western blotting (Fig. 1a, b).

Fig. 2 a Time course of Reelin, 1 DOT 4 DOT ApoeR2, and VLDL expressions + in cortical cultures exposed to -+ + 80 µM aggregated PrP(106-126) а + + _ for 24 h and 4 days. Tubulin and + actin were used as control loading protein. b Graph of the densitometric values of ApoeR2 420 kD and VLDLR levels in the experiment. Plots show mean ± S.E.M. of five different 180 kD experiments. c Dab1 phosphorylation in the presence 50 kD of $PrP_{(106-126)}$ in *reeler*-derived neurons. The quantification of 160 kD experiments is shown in d. Plots 140 kD show mean ± S.E.M. of two 100 kD different experiments. *P < 0.05, ANOVA Bonferroni post hoc test. 40 kD e Graph of the percentage of the PI fluorescence measures of PrP(106-126) treated cultures. С Wild Type Reeler Plots show mean ± S.E.M. of three different experiments. f Western blot determination of PrP(106-126) reelin protein levels in primary 80 kD α-pDab1 neuronal cultures after PrP(106-126) treatment. Cultures were α-Dab1 80 kD treated with 80 µM PrP(106-126) peptide for one in absence or 80 kD presence of NAC and DPI (see 40 kD the "Material and Methods" section for details). Tubulin was used as control loading protein е PrP(106-126) scrambled

b scrambled PrP(106-126) α-Reelin (G10 Ab) ApoeR2/Acti 0. Satio / α-Tubulin a-ApoeR2 α-VLDLR 8 α-Actin 1 DOT 4 DOT d scrambled Ratio pDab1/Dab' art 0.5 α-Dab1 input α-Actin input 0.0 PrP(106-126 Wild Type f PrP(106 NAC Percentage of PI stair DPI 420 kD -Reelin (G10 Ab) 20 180 kD 184 12m 245 00 50 kD α-Tubulir Time of treatment

untreated

PBS 0.1 M

D Springer

For quantification, developed films were scanned at

2400 × 2400 dpi (i800 MICROTEK high-quality film

scanner), and the densitometric analysis was performed using Quantity One Image software analysis (Biorad,

Windows) and the Gel-Pro analyzer (Media Cybernetics,

Windows). Statistical analysis of the obtained data was

performed using Bonferroni post hoc test (Multiple com-

parison test) using GraphPad Prism 5.0c (Mac OsX,

Grahpad). Data are presented as mean \pm standard error

of the mean (S.E.M.). Differences between groups were

considered statistically significant at *P < 0.05.

Mol Neurobiol

Results indicated no statistically significant differences in Reelin content between genotypes although $Prnp^{o/o}$ showed a ~ 6 % increase compared to wild type ((1.204 ± 0.19 ($Prnp^{o/o}$) vs 1.128 ± 0.055 ($Prnp^{+/+}$) vs 1.065 ± 0.215 (Tga20); mean ± S.E.M.) (Fig. 1b). Next, we aimed to corroborate these results by analyzing *Reln* mRNA expression in the neocortex of *Prnp*^{0/0} and *Prnp*^{+/+} with in situ hybridization (Fig. 1c–e). Qualitative (Fig. 1c, d) and quantitative (Fig. 1e) data corroborated that there were no relevant differences in the *Reln* mRNA expression between the two genotypes.

Increased Reelin Expression in PrP₍₁₀₆₋₁₂₆₎-Treated Primary Cortical Neurons Does Not Correlate with Activation of the Reelin Pathway

Peptides mimicking prion sequences (e.g., human or mouse) have been used as models of prion-mediated cytotoxicity for many years [62-65]. Thus, we aimed to check the effects of PrP(106-126) in modifying Reelin protein levels in primary cortical neurons (Figs. 2 and 3). First, to avoid the effects associated with low endogenous expression of PrP^C levels, these were determined in primary cortical cultures at several days in vitro (DIV) in order to establish the appropriate time window for treatments (Supplementary Fig. 1). Reasonable levels of PrP^C in cultures were detected after 12–15 days in vitro (Supplementary Fig. 1). In a second set of experiments, cortical neurons were maintained in vitro for 15 DIV and incubated with 80 µM aggregated PrP(106-126) [66] for 30 min, 1 day, and 4 days, and Reelin expression levels were analyzed (Figs. 2a and 3). Parallel cultures were incubated with scrambled peptide, 0.1 M PBS, untreated as internal controls (Fig. 2a). In addition, levels of Dab1 phosphorylation were also checked after PrP(106-126) treatment (Fig. 3). Results indicate that in the treated cultures, the upper band of 420 kD

and the lower band of 180 kD of cellular Reelin could be easily distinguished in protein extracts (Fig. 2a and 3). In addition, they showed a 1.25-fold increase in total Reelin at 24 h after $PrP_{(106-126)}$ treatment (P < 0.05, t = 2.819, 95 % confidence interval of diff. = -08.699 to 0.04990 (1 vs 1 day + PrP(106-126))); ANOVA Bonferroni post hoc test (Fig. 3). This Reelin increase can be seen, albeit reduced, 4 days after treatment (1.21-fold increase) (P < 0.05, t = 3249, 95 % confidence interval of diff. = -0.7222 to -0.009744 (4 vs 4 day + PrP₍₁₀₆₋ 126) ANOVA Bonferroni post hoc test) (Fig. 3). Surprisingly, this increase in Reelin is delayed with respect to the increase in p-Dab1 and degradation (Fig. 3). Indeed, increased p-Dab1 was observed shortly after 30 min of incubation with PrP_(106–126) (Fig. 3). This happens prior to the Reelin increase (24 h) suggesting that early Dab1 phosphorylation is not mediated by Reelin (Fig. 3). In addition, this data suggests that these changes in Reelin do not correlate with increased Reelin-mediated signaling. This was also corroborated by analyzing ApoER2 levels [67]. Changes in ApoER2 levels are modulated by Reelin signaling [67]. However, ApoeR2 and VLDLR levels remained constant during these periods, except after 4 days in vitro, they were slightly changed without reaching statistical signification (Fig. 2b). Quantification of ApoeR2/Actin ratio was 0.62 ± 0.02 (untreated) vs $0.41 \pm 0.09 (PrP_{(106-126)}) 1$ day of treatment (mean \pm S.E.M.) and 0.34 \pm 0,03 (untreated) vs 0.59 \pm 0.09 $(PrP_{(106-126)})$ 4 days of treatment (mean \pm S.E.M.). Quantification of VLDLR/Actin ratio was 0.69 ± 0.06 (untreated) vs 0.49 ± 0.09 1 day of treatment (mean \pm S.E.M.) and 0.53 \pm 0.06 (untreated) vs 0.70 \pm 0,10; 4 days of treatment (mean \pm S.E.M.). Changes after 4 days might reflect changes in cell death due to the amyloid treatment. In fact, a higher level of cell death was monitored by using propidium iodide uptake in PrP(106-126)-treated cultures



Fig. 3 a Parallel determination of reelin, p-Dab1, and Dab1 levels in primary neuronal cultures after PrP₍₁₀₆₋₁₂₆₎ treatment. Cultures were treated with 80 μ M PrP₍₁₀₆₋₁₂₆₎ peptide for the times indicated (30 min, 1 day, and 3 days). Reelin-probed membranes were immunoblotted using antibodies against tubulin for standardization. The phosphorylated form



of Dab1 was analyzed by immunoprecipitation and western blotting. Membranes were re-probed with an antibody against total Dab1. **b** Graph of the densitometric values of reelin and p-Dab1 levels. *Plots* show mean \pm S.E.M. of three different experiments

🖄 Springer

compared to controls (PI staining = 62.65 ± 5.16 , PrP₍₁₀₆₋₁₂₆₎ vs 43.77 \pm 3.23, scrambled, at 96 h of treatment) (Fig. 2e). Next, in order to determine whether the fast Dab1 phosphorylation observed after peptide treatment is related with Reelin, we processed primary neuronal cultures obtained from reeler mice. Treatment of reeler-derived cortical neurons lacking reelin with $PrP_{(106-126)}$ is also able to increase p-Dab1 $(0.293 \pm 0.0159 \text{ (scrambled) vs } 0.498 \pm 0.033 \text{ (PrP}_{(106-126)}),$ mean \pm S.E.M., P < 0.05, t = 3.381, 95 % confidence interval of diff. = -0.398 to -0.010; ANOVA Bonferroni post hoc test) (Fig. 2c, d), reinforcing the notion that the presence of reelin is not mandatory in the increased p-Dab1 levels mediated by PrP(106-126). Increased kinase activity and high levels of ROS have been described after prion infection [33, 66, 68-70] and in sCJD patients [33]. Thus, we aimed to explore whether ROS generation in treated cultures participates in the observed changes in Reelin expression. Results showed that the ROS scavenger NAC and the NADPH oxidase inhibitor DPI are able to block Reelin increase mediated by PrP(106-126) (Fig. 2f).

Decreased Reelin Protein Levels in Prion-Inoculated Mice

Prnp^{+/+} were inoculated with 22L or Mo-BSE prions, and cortical levels of Reelin were determined in cortical extracts of terminal mice (137-138 days (22L) and 201-202 days (Mo-BSE)). Developed film demonstrated a decrease in Reelin levels in 22L-inoculated mice $(0.5360 \pm 0.028 \text{ (non-}$ inoculated) vs 0.2990 ± 0.055 (22L inoculated), mean \pm S.E.M., P < 0.05, t = 4.943; 95 % confidence interval of diff. = 0.1188 to 0.4091; ANOVA Bonferroni post hoc test) (Fig. 4). Mo-BSE-inoculated mice also showed reduced Reelin content compared to non-inoculated mice $(0.3510 \pm 0.026 \text{ (Mo-BSE inoculated), mean} \pm \text{S.E.M.},$ P < 0.05, t = 3.602; 95% confidence interval of diff. = 0.0525 to 0.3755 (Fig. 4). This decrease in Reelin could be due to a decrease in Reelin-expressing cells in affected brains. Thus, terminal prion-inoculated mice $(Prnp^{+/+})$ and time-matched $Prnp^{0/0}$ inoculated mice were histologically processed to Reln with in situ hybridization (Fig. 5). Cell counts of revealed sections demonstrated that neither the distribution nor the total number of Reln-positive cells was significantly modified in the neo cortex of the inoculated mice compared with the controls (Fig. 5). As Reelin is expressed mainly by cortical interneurons in adult cortex (mainly in calbindin, calretinin, NPY-, and somatostatin- but rarely on parvalbumin-, cholecystokinin-, or VIP-positive interneurons) [71], we also analyzed the number of calbindin- and parvalbumin-positive interneurons in the neocortex of inoculated and control mice. Results showed similar numbers of calbindin-positive cells in inoculated and non-inoculated mice (Fig. 5b-h). In contrast, the number of parvalbumin-positive cells decreased slightly (≈ 16.3 %) in layers IV–VI of *Prnp*^{+/+}-inoculated mice

Springer



Fig. 4 Example of western blotting determination of Reelin in 22L (a) or Mo-BSE (b)-inoculated mice. c Histograms showing the densitometric study. *Plots* show mean \pm S.E.M. of each different type of mouse. Each *dot* corresponds to one mouse. *Asterisks* indicate statistical differences between groups. **P* < 0.05; ANOVA Bonferroni post hoc test

(Fig. 5c-i) corroborating previous results [72]. Taken together, these results indicate that a direct effect of changes in Reelin protein levels on non-pyramidal neuron populations in inoculated mice is unlikely.

Changes in Reelin Expression in CJD Post-Mortem Samples and CJD-Inoculated Mice

Total levels of Reelin and *Reln* mRNA changes were analyzed in human post-mortem samples of frontal cortex of CJD patients (Tables 1 and 2; Fig. 6). Although the data did not reach a *P* value <0.05 (Type II vs control; t = 0,6165; 95 % confidence interval of diff. = -0.312 to 0.421; ANOVA Bonferroni post hoc test), the results indicated a tendency of higher level of Reelin in CJD patients, especially in type II (5.450 ± 0.490 (type II) vs 4.973 ± 0.490 (type I) vs 4.203 ± 0.4214 (control)) (Fig. 6b). This tendency in CJD patients was also corroborated

Mol Neurobiol

Mol Neurobiol

Fig. 5 a-f Low power photomicrograph illustrating the distribution of Reel- (a, d), calbindin- (CALB) (b, e), and parvalbumin (PARV) (c,f) positive neurons in the neocortex of inoculated Prnp^{+/} and Prnp⁰ mice. g-i Radial distribution of Reln- (g), calbindin- (S.E.M.), and parvalbumin (i)-positive neurons in $Prnp^{0/0}$ and $Prnp^{+/+}$ adult inoculated mice. Calbindinpositive cells were ascertained as interneurons for quantification. Cortical layers are indicated in the S.E.M. axis. Layer VIa + VIb were grouped. Bars represent the mean \pm S.E.M. of the total number of cells counted in eight consecutive sections of two $(Prnp^{+/+})$ and seven $(Prnp^{0/0})$ mice. No statistical differences in the numbers of positive cells were seen between genotypes, except for parvalbumin-positive cells located in layers IV-VI)



by RT-qPCR (1.693 ± 0.382 (type II) vs 1.703 ± 0.5125 (type I) vs 1.090 ± 0.2050 (control)) (Fig. 6c). In parallel, we also aimed to determine mRNA levels of *Reln* in the cerebral cortices of Tg340 mice inoculated with human Met/Met PrP type 1 inoculum (Fig. 6d). Tg340 mice inoculated with sCJD showed a faster evolution of the infective process (around 180 days post-inoculum (DPi)) than 22L in Mo-BSE infected mice). In addition, they showed increased levels of *Reln* mRNA at these days post-inoculation (Fig. 6d) (0.1245 ± 0.013 (Con) vs 0.2210 ± 0.026 (CJD); mean ± S.E.M., 1.71 ± 0.23-fold increase; P = 0.0141; t = 3.248; 95 % confidence interval of diff. = -0.79 to 0.244). In previous DPi, asymptomatic mice (120 DPi) or those with few symptoms (160 DPi), levels of Reelin were identical to control mice (Fig. 6d). Unfortunately, processing

of paraffin-embedded Tg340 mice or post-mortem (CJD) human samples with formic acid impairs the use of current antibodies against Reelin or *Reln* mRNA detection to expand these biochemical data histologically.

Discussion

The glycoprotein Reelin plays relevant roles during development, maturation, and adult synapse maintenance of the nervous system. In addition, it plays a neuroprotective role in Alzheimer's disease against β -amyloid-associated cytotoxicity [12, 47]. Unfortunately, its presence in brain parenchyma decreases during normal development, aging, and neurodegeneration [36, 41, 42]. In addition, in Alzheimer's disease,

Deringer

| Case number | Gender | Age | Codon 129 | PrP type |
|-------------|--------|-----|-----------|----------|
| CJD1 | F | 72 | MM | 1 |
| CJD2 | M | 46 | MM | 1 |
| CJD3 | M | 64 | MM | 1 |
| CJD4 | M | 66 | MM | 1 |
| CJD5 | M | 70 | MM | 1 |
| CJD6 | M | 66 | VV | 2 |
| CJD7 | F | 76 | VV | 2 |
| CJD8 | M | 65 | VV | 2 |
| CJD9 | F | 47 | VV | 2 |
| CJD10 | M | 54 | VV | 2 |
| Control1 | M | 85 | | |
| Control2 | M | 62 | | |
| Control3 | M | 59 | | |
| Control4 | Μ | 39 | | |
| Control5 | M | 78 | | |

F female, *M* male, *MM* methionine, *V*:valine, *PrP^{sc} type 1* lower band of glycosylated PrP^{sc} of 21 kD, *type 2* lower band of glycosylated PrP^{sc} of 10 kD

Reelin seems not to be functional when generated in the presence of β -amyloid [46, 73]. Thus, Reelin-dependent induction of Dab1 phosphorylation appeared reduced in the presence of β -amyloid being unable to modulate the cleavage of ApoER2 [46].These functional changes in Reelin are likely associated to changes in Reelin glycosylation [37]. These changes compromise its capacity to bind to ApoER2, impeding the ability to decrease tau phosphorylation [46, 73]. A reduced Reelin expression is associated with impaired signaling, resulting in cognitive decline [24, 74]. Blockage of reelin signaling is sufficient to impair memory [75]. Thus, impaired Reelin signaling could contribute to the clinical symptoms and pathological progression in neurodegeneration.

Although Reelin expression levels have been characterized in some neural diseases (see the "Introduction" section for references), no data have been published on natural TSEs or on models of prion infection. Bearing this in mind, we sought to determine whether Reelin levels changed in TSEs and to check their putative changes as a putative diagnostic biomarker of prion diseases. First, we determined that levels of Reelin were not modified with different doses of Prnp. This contrasts with a decrease in Reelin in brain extracts of Prnp^{0/0} mice reported by Devanathan and co-workers [76]. This difference could be associated with the use of Zürich I Prnp^{0/0} mice [76] in contrast to C57Bl6/J backcrossed B6.129 mice with lower 129Sv loci (our study; see also [77, 78] for details). In fact, we determined that adult Reln mRNA levels were not modified between $Prnp^{0/0}$, $Prnp^{+/+}$, and Tga20 mice in a previous study [77] as also observed by [79].

🖄 Springer



Fig. 6 Examples of western blotting determination of Reelin (**a**, **b**) and *Reln* mRNA quantification by RT-qPCR (**c**) in sCJD cases compared to controls. However, no statistically significant increased levels of Reelin or *Reln* mRNA can be seen in the sCJD group (types I and II) compared to controls. **d** Histograms showing results of *Reln* mRNA levels (mean \pm S.E.M.) in the cortex of Tg340 mice at 120, 160, and 180 DPI. Each *dot* corresponds to one mouse. *Asterisks* indicate statistical differences between groups and controls. **P* < 0.05; ANOVA Bonferroni post hoc test

Mol Neurobiol

Mol Neurobiol

Our results indicate that Reelin increased in primary cultures when treated with 80 µM aggregated peptides mimicking human PrP^C, in post-mortem cortical samples of CJD patients and in the neocortex of infected mice with sCJD type I inoculum. In contrast, mice inoculated with 22L and Mo-BSE prions showed decreased Reelin levels. In this respect, although a clear explanation is not yet available, differences between mouse prion diseases (22L and Mo-BSE) and sCJD in both human and Tg340 mice could be related to prion strain properties. In fact, similar differences between mice and human TSEs have also recently been reported for Tau content and its phosphorylated form [80]. On the other hand, a recent study reported that Tau, and more specifically p-Tau levels, decreased in brain parenchyma of CJD patients [60]. Reelin acting through Dab1 phosphorylation increases Akt-Pi3K activation, decreasing GSK3ß activity and levels of p-Tau [18, 19]. Thus, it is reasonable to consider that increased levels of Reelin (if functional) in CJD patients (type I and II of PrP) may contribute to maintaining or decreasing levels of p-Tau.

With respect to the in vitro data, we were surprised by the increase in Reelin after peptide treatment, and so we checked previous reported data using similar cultures. It is well known that primary cultures treated with 80 µM PrP(106-126) show activated Akt [66]. However, Simon et al. reported decreased activity of PI3K and Akt in the cerebellum of inoculated mice and neuronal cultures after PrP₍₁₀₆₋₁₂₆₎ (40 µM) incubation [81, 82], as we found with lower doses of $PrP_{(106-126)}$ [66]. In our experience, these differences are likely to be associated with the handling, preparation, and concentration of the PrP(106-126) used for the experiments. High concentrations of PrP(106-126) increase ROS production in treated cells (Fig. 2) (see also [66, 69, 83]). In this study, we showed that the increase in Reelin after PrP₍₁₀₆₋₁₂₆₎ incubation could be linked to a burst of ROS production induced by the peptide. ROS increase runs in parallel to the relevant kinase activation reported after the inoculation of (263 K) [33] or RML [48, 66] prions as well as human prion peptides [66, 68]. In addition, our results also point the need of different approaches (in vivo and in vitro) to analyze prion-derived effects. For example, human-derived peptides are able to induce Dab1 phosphorylation in Reln-derived neurons. Further studies are needed to ascertain the molecular actor/s involved and other kinases are able to increase Dab1 phosphorylation in the absence of reelin as described during development [84].

Due to that mRNA and protein levels in CJD and sCJDinfected mice only occur at the final stages of the disease, we believe that the increased Reelin changes are likely associated with the profound metabolic changes (e.g., cellular stress, inflammation, etc.) strongly present in the last stages of the infective process. In addition, this invites the question of whether the increased Reelin levels observed in CJD and Tg340 mice also correspond to a "non-functional" protein has indicated in AD. In fact, low Dab1 phosphorylation is observed in sCJD PrP type II in the presence of the highest levels of Reelin observed in the study (see [50] for description) and levels of p-Tau (normally decreased by functional Reelin) were higher in similar sCJD samples [60, 85].

Levels of p-Tau and Tau have been suggested as a potential biomarker in prionopathies such as the 14-3-3 protein [60, 85, 86]. Reln was associated as a susceptible gene in Alzheimer's disease but not in Parkinson's disease [87]. However, increased levels of a Reelin band of 180 kD have been determined in CSF of AD, Parkinson's disease [37], and frontotemporal dementia [38]. In these neurodegenerative diseases, whether it is the case that Reelin participates in the onset of the disease or its alteration is a secondary effect of the neurodegeneration still remains elusive. Thus, with the present results, it is reasonable to consider that observed changes in Reelin at advanced stages of the prionopathies are secondary to the degenerative process and are probably associated with the physiological changes observed in the disease [88, 89]. In conclusion, Reelin increase is not associated with the processes linked to early onset of disease and is therefore not a potential biomarker for prionopathies.

Acknowledgments The authors thank Tom Yohannan for the editorial advice and M. Segura-Feliu for the technical assistance. We thank members of the Del Río, Torres, Requena, Zerr and Ferrer groups for stimulating discussions and ideas. We thank members of José Luis Labandeira laboratory (CIMUS) for helping us with the histological processing of the inoculated mice. We also thank Eduardo Soriano for the gift of the reeler mice and Tom Curran for the gift of the Reln in situ probe. This research was supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) (BFU2015-67777-R and TEC2015-72718-EXP), the Spanish prion network (Prionet Spain, AGL2015-71764-REDT), the Generalitat de Catalunya (SGR2014-1218), CIBERNED (PI2014/02-4 (Rapid dementias) and PRY-14-114), and La Caixa Obra Social Foundation, La Marató de TV3 to JADR. R.G. was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS, PI11-00075). I.F. was funded by the Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III-Fondos FEDER, a way to build Europe FIS grants PI14/00757, and CIBERNED (PI2014/02-4). JM.T. was supported by Spanish Ministry Economy and Competitiveness (RTA2012-00004 and AGL2012-37988-C04 projects). J.R.R. was supported by a grant from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) (BFU2013-48436-C2-1-P) I.Z. received support by the Robert-Koch-Institute through funds of Federal Ministry of Health (grant no. 1369-341) and DZNE (German Center for Neurodegenerative Diseases). A.M. was supported by a fellowship from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. S.V was supported by a Juan de la Cierva contract of the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICIM).

Compliance with Ethical Standards

Ethics Statement All experiments were performed under the guidelines and protocols of the Ethical Committee for Animal Experimentation (CEEA) of the University of Barcelona, and the protocol for the use of animals in this study was reviewed and approved by the CEEA of the University of Barcelona (CEEA approval no. 276/16 and 141/15).

Experiments were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the author's institutions (INIA and INRA; and University of Santiago de Compostela, 15005AE/12/FUN01/PAT05/JRR3).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

Springer

References

- D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. Nature 374(6524):719–723. doi:10.1038/374719a0
- Soriano E, Del Rio JA (2005) The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after. Neuron 46(3):389–394. doi:10.1016/j. neuron.2005.04.019
- Groc L, Choquet D, Stephenson FA, Verrier D, Manzoni OJ, Chavis P (2007) NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein reelin. J Neurosci 27(38):10165–10175. doi:10.1523/ JNEUROSCI.1772-07.2007
- Rogers JT, Weeber EJ (2008) Reelin and apoE actions on signal transduction, synaptic function and memory formation. Neuron Glia Biol 4(3):259–270. doi:10.1017/S1740925X09990184
- Ohkubo N, Vitek MP, Morishima A, Suzuki Y, Miki T, Maeda N, Mitsuda N (2007) Reelin signals survival through Src-family kinases that inactivate BAD activity. J Neurochem 103(2):820–830. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04804.x
- Frotscher M (2010) Role for reelin in stabilizing cortical architecture. Trends Neurosci 33(9):407–414. doi:10.1016/j. tins.2010.06.001
- Pujadas L, Gruart A, Bosch C, Delgado L, Teixeira CM, Rossi D, de Lecea L, Martinez A et al (2010) Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. J Neurosci 30(13):4636–4649. doi:10.1523/ JNEUROSCI.5284-09.2010
- Beffert U, Weeber EJ, Morfini G, Ko J, Brady ST, Tsai LH, Sweatt JD, Herz J (2004) Reelin and cyclin-dependent kinase 5-dependent signals cooperate in regulating neuronal migration and synaptic transmission. J Neurosci 24(8):1897–1906. doi:10.1523/ JNEUROSCI.4084-03.2004
- Stary CM, Xu L, Sun X, Ouyang YB, White RE, Leong J, Li J, Xiong X et al (2015) MicroRNA-200c contributes to injury from transient focal cerebral ischemia by targeting reelin. Stroke 46(2): 551–556. doi:10.1161/STROKEAHA.114.007041
- Won SJ, Kim SH, Xie L, Wang Y, Mao XO, Jin K, Greenberg DA (2006) Reelin-deficient mice show impaired neurogenesis and increased stroke size. Exp Neurol 198(1):250–259. doi:10.1016/j. expneurol.2005.12.008
- Cuchillo-Ibanez I, Balmaceda V, Botella-Lopez A, Rabano A, Avila J, Saez-Valero J (2013) Beta-amyloid impairs reelin signaling. PLoS One 8(8):e72297. doi:10.1371/journal.pone.0072297
- Pujadas L, Rossi D, Andres R, Teixeira CM, Serra-Vidal B, Parcerisas A, Maldonado R, Giralt E et al (2014) Reclin delays amyloid-beta fibril formation and rescues cognitive deficits in a model of Alzheimer's disease. Nat Commun 5:3443. doi:10.1038/ ncomms4443
- Durakoglugil MS, Chen Y, White CL, Kavalali ET, Herz J (2009) Reelin signaling antagonizes beta-amyloid at the synapse. Proc Natl Acad Sci U S A 106(37):15938–15943. doi:10.1073/pnas.0908176106
- Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J (1999) Direct binding of reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. Neuron 24(2):481– 489
- Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA et al (1999) Reeler/ disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. Cell 97(6):689– 701

- Bock HH, Herz J (2003) Reelin activates SRC family tyrosine kinases in neurons. Curr Biol 13(1):18–26
- Herz J, Chen Y (2006) Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. Nat Rev Neurosci 7(11):850–859
- Beffert U, Morfini G, Bock HH, Reyna H, Brady ST, Herz J (2002) Reelin-mediated signaling locally regulates protein kinase B/Akt and glycogen synthase kinase 3beta. J Biol Chem 277(51):49958– 49964. doi:10.1074/jbc.M209205200
- Park TJ, Curran T (2008) Crk and Crk-like play essential overlapping roles downstream of disabled-1 in the reelin pathway. J Neurosci 28(50):13551–13562. doi:10.1523/JNEUROSCI.4323-08.2008
- Ma Y, Wu X, Li X, Fu J, Shen J, Li X, Wang H (2012) Corticosterone regulates the expression of neuropeptide Y and reelin in MLO-Y4 cells. Mol Cells 33(6):611–616. doi:10.1007/ s10059-012-0053-y
- Alvarez-Dolado M, Ruiz M, Del Rio JA, Alcantara S, Burgaya F, Sheldon M, Nakajima K, Bernal J et al (1999) Thyroid hormone regulates reelin and dab1 expression during brain development. J Neurosci 19(16):6979–6993
- Lussier AL, Caruncho HJ, Kalynchuk LE (2009) Repeated exposure to corticosterone, but not restraint, decreases the number of reelin-positive cells in the adult rat hippocampus. Neurosci Lett 460(2):170–174. doi:10.1016/j.neulet.2009.05.050
- Buret L, van den Buuse M (2014) Corticosterone treatment during adolescence induces down-regulation of reelin and NMDA receptor subunit GLUN2C expression only in male mice: implications for schizophrenia. Int J Neuropsychopharmacol 17(8):1221–1232. doi:10.1017/S1461145714000121
- Miettinen R, Riedel A, Kalesnykas G, Kettunen HP, Puolivali J, Soininen H, Arendt T (2005) Reelin-immunoreactivity in the hippocampal formation of 9-month-old wildtype mouse: effects of APP/PS1 genotype and ovariectomy. J Chem Neuroanat 30(2–3): 105–118. doi:10.1016/j.jchemmeu.2005.06.003
- Rideau Batista Novais A, Guiramand J, Cohen-Solal C, Crouzin N, de Jesus Ferreira MC, Vignes M, Barbanel G, Cambonie G (2013) N-acetyl-cysteine prevents pyramidal cell disarray and reelinimmunoreactive neuron deficiency in CA3 after prenatal immune challenge in rats. Pediatr Res 73(6):750–755. doi:10.1038/ pr.2013.40
- Palacios-Garcia I, Lara-Vasquez A, Montiel JF, Diaz-Veliz GF, Sepulveda H, Utreras E, Montecino M, Gonzalez-Billault C et al (2015) Prenatal stress down-regulates reelin expression by methylation of its promoter and induces adult behavioral impairments in rats. PLoS One 10(2):e0117680. doi:10.1371/journal. pone.0117680
- Herring A, Donath A, Yarmolenko M, Uslar E, Conzen C, Kanakis D, Bosma C, Worm K et al (2012) Exercise during pregnancy mitigates Alzheimer-like pathology in mouse offspring. FASEB J 26(1):117–128. doi:10.1096/fj.11-193193
- Cotter D, Pariante CM (2002) Stress and the progression of the developmental hypothesis of schizophrenia. The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science 181:363–365
- Pompili A, Arnone B, Gasbarri A (2012) Estrogens and memory in physiological and neuropathological conditions. Psychoneuroendocrinology 37(9):1379–1396. doi:10.1016/j. psyncuen.2012.01.007
- Tareen RS, Kamboj MK (2012) Role of endocrine factors in autistic spectrum disorders. Pediatr Clin N Am 59(1):75–88. doi:10.1016/j. pcl.2011.10.013x
- Forero DA, Casadesus G, Perry G, Arboleda H (2006) Synaptic dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease: emerging mechanisms. J Cell Mol Med 10(3):796–805
- Barron AM, Pike CJ (2012) Sex hormones, aging, and Alzheimer's disease. Front Biosci 4:976–997

Mol Neurobiol

- 33. Pamplona R, Naudi A, Gavin R, Pastrana MA, Sajnani G, Ilieva EV, Del Rio JA, Portero-Otin M et al (2008) Increased oxidation, glycoxidation, and lipoxidation of brain proteins in prion disease. Free Radic Biol Med 45(8):1159–1166. doi:10.1016/j. freeradbiomed.2008.07.009
- Fatemi SH, Kroll JL, Stary JM (2001) Altered levels of reelin and its isoforms in schizophrenia and mood disorders. Neuroreport 12(15):3209–3215
- Fatemi SH, Stary JM, Egan EA (2002) Reduced blood levels of reelin as a vulnerability factor in pathophysiology of autistic disorder. Cell Mol Neurobiol 22(2):139–152
- Herring A, Donath A, Steiner KM, Widera MP, Hamzehian S, Kanakis D, Kolble K, ElAli A et al (2012) Reelin depletion is an early phenomenon of Alzheimer's pathology. J Alzheimers Dis 30(4):963–979. doi:10.3233/JAD-2012-112069
- Botella-Lopez A, Burgaya F, Gavin R, Garcia-Ayllon MS, Gomez-Tortosa E, Pena-Casanova J, Urena JM, Del Rio JA et al (2006) Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A 103(14):5573– 5578. doi:10.1073/pnas.0601279103
- Saez-Valero J, Costell M, Sjogren M, Andreasen N, Blennow K, Luque JM (2003) Altered levels of cerebrospinal fluid reelin in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. J Neurosci Res 72(1):132–136. doi:10.1002/jnr.10554
- Knuesel I, Nyffeler M, Mormede C, Muhia M, Meyer U, Pietropaolo S, Yee BK, Pryce CR et al (2009) Age-related accumulation of reelin in amyloid-like deposits. Neurobiol Aging 30(5): 697–716. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.08.011
- Schiffmann SN, Bernier B, Goffinet AM (1997) Reelin mRNA expression during mouse brain development. Eur J Neurosci 9(5): 1055–1071
- Krstic D, Pfister S, Notter T, Knuesel I (2013) Decisive role of reelin signaling during early stages of Alzheimer's disease. Neuroscience 246:108–116. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.04.042
- Chin J, Massaro CM, Palop JJ, Thwin MT, Yu GQ, Bien-Ly N, Bender A, Mucke L (2007) Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. J Neurosci 27(11):2727–2733. doi:10.1523/JNEUROSCI.3758-06.2007
- Wirths O, Multhaup G, Czech C, Blanchard V, Tremp G, Pradier L, Beyreuther K, Bayer TA (2001) Reelin in plaques of beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. Neurosci Lett 316(3):145–148
- Doehner J, Madhusudan A, Konietzko U, Fritschy JM, Knuesel I (2010) Co-localization of reelin and proteolytic AbetaPP fragments in hippocampal plaques in aged wild-type mice. J Alzheimers Dis 19(4):1339–1357. doi:10.3233/JAD-2010-1333
- Kocherhans S, Madhusudan A, Doehner J, Breu KS, Nitsch RM, Fritschy JM, Knuesel I (2010) Reduced reelin expression accelerates amyloid-beta plaque formation and tau pathology in transgenic Alzheimer's disease mice. J Neurosci 30(27):9228–9240. doi:10.1523/JNEUROSCI.0418-10.2010
- Botella-Lopez A, Cuchillo-Ibanez I, Cotrufo T, Mok SS, Li QX, Barquero MS, Dierssen M, Soriano E et al (2010) Beta-amyloid controls altered reelin expression and processing in Alzheimer's disease. Neurobiol Dis 37(3):682–691. doi:10.1016/j. nbd.2009.12.006
- Lane-Donovan C, Philips GT, Wasser CR, Durakoglugil MS, Masiulis I, Upadhaya A, Pohlkamp T, Coskun C et al (2015) Reclin protects against amyloid beta toxicity in vivo. Sci Signal 8(384):ra67. doi:10.1126/scisignal.aaa6674
- Herrmann US, Sonati T, Falsig J, Reimann RR, Dametto P, O'Connor T, Li B, Lau A et al (2015) Prion infections and anti-PrP antibodies trigger converging neurotoxic pathways. PLoS Pathog 11(2):e1004662. doi:10.1371/journal.ppat.1004662

- Gavin R, Urena J, Rangel A, Pastrana MA, Requena JR, Soriano E, Aguzzi A, Del Rio JA (2008) Fibrillar prion peptide PrP(106-126) treatment induces Dab1 phosphorylation and impairs APP processing and Abeta production in cortical neurons. Neurobiol Dis 30(2): 243–254. doi:10.1016/j.nbd.2008.02.001
- Gavin R, Ferrer I, del Rio JA (2010) Involvement of Dab1 in APP processing and beta-amyloid deposition in sporadic Creutzfeldt-Jakob patients. Neurobiol Dis 37(2):324–329. doi:10.1016/j. nbd.2009.10.010
- Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M et al (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. Nature 356(6370):577–582
- Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, Brandner S, Aguzzi A et al (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. EMBO J 15(6):1255–1264
- Steele AD, Emsley JG, Ozdinler PH, Lindquist S, Macklis JD (2006) Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 103(9):3416–3421. doi:10.1073/pnas.0511290103
- Ordonez-Gutierrez L, Torres JM, Gavin R, Anton M, Arroba-Espinosa AI, Espinosa JC, Vergara C, Del Rio JA et al (2013) Cellular prion protein modulates beta-amyloid deposition in aged APP/PSI transgenic mice. Neurobiol Aging 34(12):2793–2804. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.05.019
- Cassard H, Torres JM, Lacroux C, Douet JY, Benestad SL, Lantier F, Lugan S, Lantier I et al (2014) Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. Nat Commun 5:5821. doi:10.1038/ ncomms6821
- 56. Padilla D, Beringue V, Espinosa JC, Andreoletti O, Jaumain E, Reine F, Herzog L, Gutierrez-Adan A et al (2011) Sheep and goat BSE propagate more efficiently than cattle BSE in human PrP transgenic mice. PLoS Pathog 7(3):e1001319. doi:10.1371/ journal.ppat.1001319
- Vilches S, Vergara C, Nicolas O, Mata A, Del Rio JA, Gavin R (2015) Domain-specific activation of death-associated intracellular signalling cascades by the cellular prion protein in neuroblastoma cells. Mol Neurobiol. doi:10.1007/s12035-015-9360-6
- Carulla P, Bribian A, Rangel A, Gavin R, Ferrer I, Caelles C, Del Rio JA, Llorens F (2011) Neuroprotective role of PrPC against kainate-induced epileptic seizures and cell death depends on the modulation of JNK3 activation by GluR6/7-PSD-95 binding. Mol Biol Cell 22(17):3041–3054. doi:10.1091/mbc.E11-04-0321
- Mingorance A, Fontana X, Sole M, Burgaya F, Urena JM, Teng FY, Tang BL, Hunt D et al (2004) Regulation of Nogo and Nogo receptor during the development of the entorhino-hippocampal pathway and after adult hippocampal lesions. Mol Cell Neurosci 26(1):34– 49. doi:10.1016/j.mcn.2004.01.001
- Llorens F, Zafar S, Ansoleaga B, Shafiq M, Blanco R, Carmona M, Grau-Rivera O, Nos C et al (2015) Subtype and regional regulation of prion biomarkers in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Neuropathol Appl Neurobiol 41(5):631–645. doi:10.1111/ nan.12175
- Sandberg MK, Al-Doujaily H, Sharps B, De Oliveira MW, Schmidt C, Richard-Londt A, Lyall S, Linehan JM et al (2014) Prion neuropathology follows the accumulation of alternate prion protein isoforms after infective titre has peaked. Nat Commun 5:4347. doi:10.1038/ncomms5347
- Forloni G, Angeretti N, Chiesa R, Monzani E, Salmona M, Bugiani O, Tagliavini F (1993) Neurotoxicity of a prion protein fragment. Nature 362(6420):543–546
- Brown DR (2000) Prion protein peptides: optimal toxicity and peptide blockade of toxicity. Mol Cell Neurosci 15(1):66–78

D Springer

- Vilches S, Vergara C, Nicolas O, Sanclimens G, Merino S, Varon S, Acosta GA, Albericio F et al (2013) Neurotoxicity of prion peptides mimicking the central domain of the cellular prion protein. PLoS One 8(8):e70881. doi:10.1371/journal.pone.0070881
- 65. Vassallo N (2009) Properties and pathogenicity of prion-derived peptides. Protein Pept Lett 16(3):230–238
- Gavin R, Braun N, Nicolas O, Parra B, Urena JM, Mingorance A, Soriano E, Torres JM et al (2005) PrP(106-126) activates neuronal intracellular kinases and Egr1 synthesis through activation of NADPH-oxidase independently of PrPc. FEBS Lett 579(19): 4099-4106. doi:10.1016/j.febslet.2005.06.037
- Duit S, Mayer H, Blake SM, Schneider WJ, Nimpf J (2010) Differential functions of ApoER2 and very low density lipoprotein receptor in reelin signaling depend on differential sorting of the receptors. J Biol Chem 285(7):4896–4908. doi:10.1074/jbc. M109.025973
- Schneider B, Mutel V, Pietri M, Ermonval M, Mouillet-Richard S, Kellermann O (2003) NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and non neuronal cells. Proc Natl Acad Sci U S A 100(23):13326– 13331. doi:10.1073/pnas.2235648100
- Pietri M, Caprini A, Mouillet-Richard S, Pradines E, Ermonval M, Grassi J, Kellermann O, Schneider B (2006) Overstimulation of PrPC signaling pathways by prion peptide 106-126 causes oxidative injury of bioaminergic neuronal cells. J Biol Chem 281(38): 28470–28479. doi:10.1074/ibc.M602774200
- Vilches S, Vergara C, Nicolas O, Mata A, Del Rio JA, Gavin R (2016) Domain-specific activation of death-associated intracellular signalling cascades by the cellular prion protein in neuroblastoma cells. Mol Neurobiol 53(7):4438–4448. doi:10.1007/s12035-015-9360-6
- Alcantara S, Ruiz M, D'Arcangelo G, Ezan F, de Lecea L, Curran T, Sotelo C, Soriano E (1998) Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. J Neurosci 18(19):7779–7799
- Guentchev M, Groschup MH, Kordek R, Liberski PP, Budka H (1998) Severe, early and selective loss of a subpopulation of GABAergic inhibitory neurons in experimental transmissible sponeiform enceohalopathies. Brain Pathol 8(4):615–623
- Cuchillo-Ibanez I, Balmaceda V, Mata-Balaguer T, Lopez-Font I, Saez-Valero J (2016) Reelin in Alzheimer's disease, increased levels but impaired signaling: when more is less. J Alzheimers Dis. doi:10.3233/JAD-151193
- Stranahan AM, Haberman RP, Gallagher M (2011) Cognitive decline is associated with reduced reelin expression in the entorhinal cortex of aged rats. Cereb Cortex 21(2):392–400. doi:10.1093/ cercor/bhq106
- Stranahan AM, Salas-Vega S, Jiam NT, Gallagher M (2011) Interference with reelin signaling in the lateral entorhinal cortex impairs spatial memory. Neurobiol Learn Mem 96(2):150–155. doi:10.1016/j.nlm.2011.03.009
- 76. Devanathan V, Jakovcevski I, Santuccione A, Li S, Lee HJ, Peles E, Leshchyns'ka I, Sytnyk V et al (2010) Cellular form of prion protein inhibits reelin-mediated shedding of Caspr from the neuronal cell surface to potentiate Caspr-mediated inhibition of neurite

outgrowth. J Neurosci 30(27):9292–9305. doi:10.1523/ JNEUROSCI.5657-09.2010

- 77. Rangel A, Madronal N, Gruart A, Gavin R, Llorens F, Sumoy L, Torres JM, Delgado-Garcia JM et al (2009) Regulation of GABA(a) and glutamate receptor expression, synaptic facilitation and longterm potentiation in the hippocampus of prion mutant mice. PLoS One 4(10):e7592. doi:10.1371/journal.pone.0007592
- Carulla P, Llorens F, Matamoros-Angles A, Aguilar-Calvo P, Espinosa JC, Gavin R, Ferrer I, Legname G et al (2015) Involvement of PrP(C) in kainate-induced excitotoxicity in several mouse strains. Sci Rep 5:11971. doi:10.1038/srep11971
- Benvegnu S, Roncaglia P, Agostini F, Casalone C, Corona C, Gustincich S, Legname G (2011) Developmental influence of the cellular prion protein on the gene expression profile in mouse hippocampus. Physiol Genomics 43(12):711–725. doi:10.1152/ physiolgenomics.00205.2010
- Rubenstein R, Chang B, Petersen R, Chiu A, Davies P (2015) T-tau and P-tau in brain and blood from natural and experimental prion diseases. PLoS One 10(12):e0143103. doi:10.1371/journal. pone.0143103
- Simon D, Herva ME, Benitez MJ, Garrido JJ, Rojo AI, Cuadrado A, Torres JM, Wandosell F (2014) Dysfunction of the PI3K-Akt-GSK-3 pathway is a common feature in cell culture and in vivo models of prion disease. Neuropathol Appl Neurobiol 40(3):311– 326. doi:10.1111/nan.12066
- Newaz K, Sriram K, Bera D (2015) Identification of major signaling pathways in prion disease progression using network analysis. PLoS One 10(12):e0144389. doi:10.1371/journal.pone.0144389
- Rizzardini M, Chiesa R, Angeretti N, Lucca E, Salmona M, Forloni G, Cantoni L (1997) Prion protein fragment 106-126 differentially induces heme oxygenase-1 mRNA in cultured neurons and astroglial cells. J Neurochem 68(2):715–720
- Keshvara L, Magdaleno S, Benhayon D, Curran T (2002) Cyclindependent kinase 5 phosphorylates disabled 1 independently of reelin signaling. J Neurosci 22(12):4869–4877
- Llorens F, Schmitz M, Karch A, Cramm M, Lange P, Gherib K, Varges D, Schmidt C et al (2015) Comparative analysis of cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of neurodegenerative dementia. Alzheimers Dement. doi:10.1016/j. jalz.2015.10.009
- Schmitz M, Ebert E, Stoeck K, Karch A, Collins S, Calero M, Sklaviadis T, Laplanche JL et al (2015) Validation of 14-3-3 protein as a marker in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease diagnostic. Mol Neurobiol. doi:10.1007/s12035-015-9167-5
- Miyashita A, Hatsuta H, Kikuchi M, Nakaya A, Saito Y, Tsukie T, Hara N, Ogishima S et al (2014) Genes associated with the progression of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Transl Psychiatry 4:e396. doi:10.1038/tp.2014.35
- Ferrer I (2002) Synaptic pathology and cell death in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. Cerebellum 1(3):213–222. doi:10.1080/14734220260418448
- Clinton J, Forsyth C, Royston MC, Roberts GW (1993) Synaptic degeneration is the primary neuropathological feature in prion disease: a preliminary study. Neuroreport 4(1):65–68

🖄 Springer

Supplementary Fig. 1.



Determination of PrP^C expression in primary cortical neurons at different DIVs.

RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Papel de la PrP^c en la propagación de α-sinucleína

1.1 La transmisión de α-sinucleína depende de la expresión de PrP^c in vivo e in vitro

La EP presenta, como rasgo más conocido, abundantes inclusiones neuronales de α sinucleína conocidos como cuerpos de Lewy (LB, del inglés Lewy body) y neuritas de Lewy (LN, del inglés Lewy neurite), y además pérdida masiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra (SN) pars compacta (Braak and Del Tredici, 2008).

El componente principal de los LB es la α -sinucleína. De hecho, las formas desplegadas del monómero de α -sinucleína, llamadas oligómeros de α -sinucleína, son las especies involucradas en la agregación proteica y formación de LB. Para nuestros estudios se emplea fibras de α -sinucleína sonicadas, denominadas protofibrillas. Estas protofibrillas son un modelo de α -sinucleína oligomérica. Anteriormente, se ha descrito que las especies oligoméricas de α -sinucleína son las más infecciosas, más que los monómeros y las fibras (Chen et al., 2009, Auluck et al., 2010, Eisbach and Outeiro, 2013). También, varios estudios han identificado que estas protofibrillas de α -sinucleína son capaces de ser internalizadas y agregar la α -sinucleína endógena *in vitro* (Volpicelli-Daley et al., 2011, Aulic et al., 2014). Además, las protofibrillas de α -sinucleína generan agregados de α -sinucleína fosforilada (p- α -sinucleína) en distintas zonas del cerebro de animales silvestres inoculados (Masuda-Suzukake et al., 2013, Fernandez-Borges et al., 2015, Paumier et al., 2015, Rey et al., 2018).

Por otro lado, se ha descrito que los monómenos de α -sinucleína no generan agregados de p- α -sinucleína (Luk et al., 2012a, Masuda-Suzukake et al., 2013). Además, modelos de animales que sobreexpresan la α -sinucleína WT no forzosamente acumulan p- α -sinucleína. En este caso, animales inyectados con virus de α -sinucleína unidos a proteínas fluorescentes. Ocho semanas después, las inmunofluorescencias revelan que los animales inoculados con los virus de α -sinucleína presentan axones distróficos y punteados. Aun así, para determinar si la α -sinucleína observada representa agregados insolubles, se realiza una digestión por Proteinasa K. Después del tratamiento, la expresión de α -sinucleína y la fluorescencia disminuyen, lo cual sugiere que la α -sinucleína observada es soluble en este modelo y no genera agregados (Figura 18) (Dimant et al., 2013).



Figura 18. Modelo sobreexpresante de α **-sinucleína.** (a) Fotomicrografías de axones de animales inoculados con el virus de α -sinucleína fluorescente y el virus fluorescente (venus), se observa los axones distróficos y neuritas anormales en los animales que sobreexpresan α -sinucleína. (b) La fluorescencia de venus y el marcaje de α -sinucleína disminuyen después del tratamiento de proteinasa K. Escala a= 200 µm panel de arriba y b= 50 µm y el panel de abajo de a.

Nuestros resultados confirman que las protofibrillas de α -sinucleína se propagan en animales $Prnp^{+/+}$ inoculados ya que muestran agregados de p- α -sinucleína en diferentes zonas del cerebro tanto ipsilateral como contralateral a diferencia de los animales no inoculados o sham operados, quienes no generan agregados de p- α sinucleína en ningún momento post-inoculación. Por lo que, la inyección intracraneal de protofibrillas de α -sinucleína de ratón induce una agregación intracelular de p- α sinucleína. Los agregados identificados en nuestros experimentos tienen una estructura de tipo LB o LN. Además, observamos que las áreas que muestran agregados de p- α -sinucleína son la sustancia nigra (SN), estriado, amígdala y neocorteza las cuales están conectadas entre ellas (Smith and Bolam, 1990), así la propagación de α -sinucleína no se debe a un transporte difuso.

Transmisión de α-sinucleína mediante receptores de membrana

Varios mecanismos moleculares se han propuesto para la liberación y consecuente internalización de α -sinucleína (ver introducción), estos mecanismos pueden estar implicados en la propagación intercelular de α -sinucleína (Sung et al., 2001, Lee et al., 2008a, Desplats et al., 2009, Emmanouilidou et al., 2010, Aulic et al., 2014). Se han detectado varias proteínas transmembrana que se unen a las protofibrillas de α -sinucleína, entre ellas se encuentra LAG3 (del inglés lymphocyte-activation gene 3), neurexinas y proteína precursora del β -amiloide 1 (APLP1, del inglés amyloid beta precursor-like protein 1). LAG3 es la proteína que parece tener más afinidad a las

protofibrillas de α -sinucleína. Mediante coinmunoprecipitación identifican la unión de α -sinucleína a LAG3. Además, animales LAG3^{-/-} inoculados con protofibrillas de α -sinucleína reducen la presencia de agregados de p- α -sinucleína (Mao et al., 2016).

Nosotros proponemos PrP^c como posible receptor de α -sinucleína. Se ha demostrado que la PrP^c está implicada en varias enfermedades neurodegenerativas. La expresión de PrP^c es esencial para la propagación de la forma anómala de esta misma proteína, PrP^{sc}, que se encuentra en las prionopatías como la CJD (del inglés Creutzfeldt-Jakob disease) (Basler et al., 1986, Prusiner, 1991, Aguzzi et al., 2008). Además, dada su expresión extracelular anclada a membrana, también se ha descrito su participación como receptor de los oligómeros del β -amiloide (Lauren et al., 2009, Kessels et al., 2010), lo cual desencadena varias respuestas, normalmente, neurotóxicas, en la EA (Barry et al., 2011, Freir et al., 2011, Scott-McKean et al., 2016). Nuestros resultados han demostrado que en ausencia de PrP^c, las protofibrillas de α -sinucleína inyectadas en estriado pueden propagarse bilateralmente a distintas zonas cerebrales. Aun así, en presencia de PrP^c o sobreexpresión de PrP^c existe un aumento de agregación de p- α -sinucleína comparado con los animales deficientes en PrP^c *in vivo*.

Comparando los animales Tga20, $Prnp^{+/+}$ y $Prnp^{-/-}$, vemos que las mismas zonas del cerebro se ven afectadas por la presencia de agregados de p- α -sinucleína después de inocular los animales intracranealmente. Estriado, SN, amígdala y corteza presentan un marcaje en ambos hemisferios. Además, los animales $Prnp^{+/+}$ y Tga20 presentan agregados de p- α -sinucleína en la corteza motora contralateral, pero los animales $Prnp^{0/0}$ no muestran agregados en esta zona. Ya que los animales $Prnp^{0/0}$ no presentan agregados de la capa V de la corteza motora ipsilateral. Las diferencias de agregación son significativas y se detecta una disminución de agregados de p- α -sinucleína en ausencia de PrP^c.

Publicaciones posteriores a nuestro estudio confirman la relación entre PrP^c y αsinucleína (Aulic et al., 2017, Ferreira et al., 2017). En el trabajo de Aulic *et al.*, se inoculan protofibrillas de α-sinucleína en estriado y SN pars compacta de animales *Prnp^{+/+}* (FVB) y *Prnp^{0/0}*. Cinco meses post-inoculación, se identifican distintas áreas cerebrales afectadas por la generación de agregados de p-α-sinucleína. Aunque, se observa una disminución de agregación en animales *Prnp^{0/0}*. Así pues, como nuestros resultados, concluyen que en ausencia de PrP^c el transporte de los agregados de p-αsinucleína disminuye.



Figura 19. Comparación de agregación de p- α -sinucleína en modelos de animales deficientes en PrP^c. Se observa una mayor agregación de p- α -sinucleína en la neocorteza motora de los animales Tga20 comparado con los animales B6.129 (*ZH1 Prnp*^{0/0}) y *ZH3 Prnp*^{0/0}. Agregados de p- α -sinucleína en la corteza de animales B6.129 (*ZH1 Prnp*^{0/0} (a); ZH3 *Prnp*^{0/0} (b) y en Tga20 (c) inoculados con protofibrillas de α -sinucleína de ratón en el estriado post commissural. Escala: a= 100µm (Urrea et al., 2017).

Por otra parte, la agregación de p- α -sinucleína se ha estudiado en dos modelos KO de PrP^c. Como se ha mencionado anteriormente, los *ZH1* tienen un fondo genético mixto de C57BL/6J y 129/Sv mientras que *ZH3* procede de la línea C57BL/6J. Por lo tanto, el modelo *ZH3* no presenta el problema de los "flanking genes" (ver introducción). Ambos modelos se han inoculado en el estriado post commissural con protofibrillas de α -sinucleína de ratón. A los 45 días post-inoculoción, se ha observado un descenso de agregados de p- α -sinucleína en la corteza motora comparando los resultados con los datos obtenidos del Tga20 (Figura 19). Gracias al uso de los animales *ZH3*, se ha evitado el posible efecto de los 'flanking genes' en la agregación de p- α -sinucleína así se ha confirmado que en ausencia de PrP^c hay una disminución de los agregados de p- α -sinucleína en animales inoculados y que los "flanking genes" no tienen ningún efecto sobre la transmisión y agregación de la p- α -sinucleína.

Monitorización de α-sinucleína mediante el uso de dispositivos microfluídicos

En el presente estudio se han producido modelos de dispositivos microfluídicos para monitorizar el transporte de las protofibrillas de α -sinucleína *in vitro*. Para la producción de los dispositivos, se diseña el dispositivo usando el software Clewin4 y se fabrica mediante fotolitografía. Los dispositivos microfluídicos generados están hechos del polímero polidimetilsiloxano (PDMS).

En este trabajo se emplean dos tipos de dispositivos (Taylor et al., 2005a). Uno de ellos presenta dos canales, A y B, que constan de dos aperturas en forma de pozo cada uno. El segundo modelo, presenta dos reservorios grandes, A y B, lo cual facilita el mantenimiento de las células. Los microcanales que conectan A y B pueden ser de 10 μ m (altura) X 10 μ m (ancho) X 1 mm (largada), o de 3 μ m (altura) X 10 μ m (ancho) X 1 mm (largada). Las medidas de los microcanales permiten, únicamente, el paso de los

axones. Para monitorizar el transporte de α -sinucleína mediante estos dispositivos microfluídicos, es necesario evitar el paso inespecífico de la proteína por el medio. Para ello, debe existir una diferencia de volúmenes entre A y B. Siendo A, el compartimento donde se añaden las protofibrillas de α -sinucleína y el que debe disponer de menos volumen de medio. Los resultados obtenidos de ambos modelos son similares.

Siete días después del cultivo primario, se detecta que la mayoría de las células son neuronas, apenas hay presencia de astrocitos y oligodendrocitos. También, se observa que los axones cruzan por el interior de los microcanales. En este punto, tratamos los dispositivos (compartimento A) con protofibrillas de α -sinucleína. Las neuronas no tratadas presentan niveles bajos de α -sinucleína y no tienen marcaje de p- α -sinucleína. Pero cinco días después del tratamiento, mediante inmunofluorescencia se observa que en el reservorio B hay niveles altos de α -sinucleína en el pericarión, neuritas y axones. Además, ambos reservorios, A y B, presentan agregados de p- α -sinucleína en el axón y citoplasma (Tapias et al., 2017).

Para estudiar el transporte de las protofibrillas de α -sinucleína de ratón en los dispositivos se siembran tanto en el compartimento A como B neuronas de animales $Prnp^{0/0}$, $Prnp^{+/+}$ y Tga20. A los 7 días de cultivo se añaden las protofibrillas de α -sinucleína de ratón en el compartimento A. Anteriormente, mediante el empleo de estos dispositivos se ha descrito que el transporte de α -sinucleína puede ser anterógrado y retrógrado (Volpicelli-Daley et al., 2011, Freundt et al., 2012, Brahic et al., 2016). Nuestros resultados demuestran que las neuronas derivadas de Tga20 presentan un aumento de transporte de α -sinucleína hasta el compartimento B, los cultivos neuronales WT o deficientes en PrP^c muestran una disminución del transporte de α -sinucleína. Así, existe una mayor tendencia a transportar α -sinucleína en cultivos donde se sobreexpresa la PrP^c. Estos resultados corroboran lo que ya hemos visto en animales con distintas dosis genéticas de *PRNP* inoculados con protofibrillas de α -sinucleína, aunque *in vitro* nuestros resultados no muestran diferencias significativas.

1.1.1. Participación del dominio glicosilfosfatidilinositol de PrP^c en el transporte de α-sinucleína

PrP^c se encuentra en el espacio extracelular anclado a la membrana lipídica, mayoritariamente, en las balsas lipídicas. PrP^c se une a la membrana mediante su dominio glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Naslavsky et al., 1997, Linden, 2017).

El rol del dominio GPI se ha estudiado en profundidad, para esclarecer su participación en la toxicidad y replicación de los priones. Para el estudio del dominio GPI de PrP^c existe el modelo animal tg44 que expresa PrP^c sin dominio GPI (*anchorless*). Estos animales producen una PrP^c monómerica y soluble, pero sin dominio GPI. Gracias a los cultivos neuronales derivados de estos animales, se observa la presencia extracelular e intracelular de PrP^c, pero no se encuentra anclada a la membrana (Chesebro et al., 2005, Campana et al., 2007). De hecho, los niveles intracelulares de PrP^c son los mismos que en animales WT (Chesebro et al., 2005). Estos animales crecen sanos y son viables, pero más importante aún, también son resistentes a la neurotoxicidad típica de las enfermedades priónicas. Es decir, los animales tg44 no manifiestan síntomas clínicos después de ser infectados con priones murinos (RML, ME7, 22L). Aunque, sorprendentemente, los animales tg44 presentan placas de PrP^{sc} en el cerebro. Por lo tanto, la PrP^c sin dominio GPI está implicada en la replicación priónica y la deposición de PrP^{sc}, pero no en la neurotoxicidad o sintomatología (Chesebro et al., 2005, Radford and Mallucci, 2010).

Recientemente, se ha descrito la implicación de PrP^c , y la del dominio GPI, en la EA. Varios estudios han demostrado que la expresión de PrP^c inhibe la actividad de la βsecretasa. La proteína precursora amiloide (APP, del inglés amyloid precursor protein) según el cleavage que sufre puede originar los oligómeros de β-amiloide, el cleavage de β y γ-secretasas están involucrados en la vía amiloidogénica. Por lo tanto, en estas condiciones PrP^c bloquea la generación de oligómeros de β-amiloide que son los mayores componentes de las placas seniles en la enfermedad de Alzheimer (EA) (Parkin et al., 2007). Se ha detectado que la eliminación del dominio GPI de PrP^c bloquea el efecto inhibitorio de PrP^c en la actividad de la β-secretasa. Considerando estos resultados, parece que la localización en la membrana y la endocitosis de PrP^c es necesaria para el efecto inhibitorio sobre la β-secretasa (Linden et al., 2008).

Dada esta pérdida de la función de la PrP^c en la EA, nos preguntamos qué importancia tiene el dominio GPI en el transporte de α -sinucleína. Se ha observado que los animales tg44 inoculados con protofibrillas de α -sinucleína murina generan agregados de p- α -sinucleína en distintas zonas cerebrales. Las áreas afectadas son la neocorteza, la corteza entorrinal (EC, del inglés entorrhinal cortex) y la amígdala. Los agregados se localizan ipsilateralmente y contralateralmente (Figura 20). Aunque, para este caso es necesario ampliar el número de experimentos ya que no podemos concluir el papel exacto que desempeña la PrP^c extracelular o intracelular.



Figura 20. a-c) Distribución de las inclusiones de p- α -sinucleína (asterisco) en animales silvestres y *anchorless*. Las fotomicrografías muestran acúmulos en EC (d,g), neocorteza (e,h) y amígdala (f,i). Escala a= 100 μ m.

1.1.2. Transporte de α -sinucleína humana dependiente de PrP^c humana

Las fibras de α -sinucleína humana o murina son capaces de ser internalizadas y agregar la α -sinucleína endógena. Como se ha comentada anteriormente, gracias a los estudios realizados con fibras marcadas con FLAG (Aulic et al., 2014) o myc (Volpicelli-Daley et al., 2011) se puede observar la internalización de las fibras de α -sinucleína y la consecuente agregación de la α -sinucleína endógena.

Además, se ha descrito que las fibras de α -sinucleína son más eficientes y generan más agregados cuando comparten secuencia homóloga con la α -sinucleína endógena. En el trabajo de Luk *et al.*, usan quimeras de fibras de α -sinucleína de ratón y humano, y describen que a nivel molecular la eficacia de agregación viene determinada por la homología de secuencias entre las fibras de α -sinucleína y los monómeros solubles de α -sinucleína endógenos (Luk et al., 2016).

Por lo tanto, teniendo en cuenta el posible papel de PrP^c como receptor de α sinucleína, nos interesa comparar la propagación de las protofibrillas de α -sinucleína humana en distintos modelos. En este set de experimentos se usan modelos animales que expresan α -sinucleína humana pero su PrP^c es murina (la línea S240) y animales que expresan PrP^c humana y α -sinucleína murina (la línea Tg340). Los animales WT, S240 y Tg340 inoculados con protofibrillas de α -sinucleína humana muestran las mismas zonas ipsilaterales y contralaterales del cerebro afectadas, las cuales son neocorteza, EC y amígdala (Figura 21). Sorprendentemente, hemos identificado más agregados de p- α -sinucleína en los animales Tg340 inoculados. A pesar de que en Luk *et al.*, (Luk et al., 2016) describen la importancia de la homología de secuencias de α -sinucleína en la agregación, observando nuestros resultados parece que las protofibrillas de α -sinucleína humana son más eficientes y generan más agregados cuando comparten especie con PrP^c. Aunque, es necesario aumentar el número de experimentos para elucidar que rol tiene PrP^c exactamente en estas condiciones.



Figura 21. (a-c) Esquema de la distribución de los agregados de p- α -sinucleína (asteriscos) en el SNC de los animales WT, S240 y Tg340. Los agregados de p- α -sinucleína se identifican en EC (d-f), neocorteza (g-j) y amígdala (j-l). Escala d=100 µm.

1.2. Interacción de PrP^c y α-sinucleína

Se ha publicado que PrP^c es capaz de unirse a amiloides como PrP^{sc} y los β -amiloides (Kessels et al., 2010, Resenberger et al., 2011, Wulf et al., 2017). En nuestro trabajo, gracias a los cultivos primarios neuronales podemos identificar que hay un aumento de protofibrillas de α -sinucleína murina unidas a las neuronas que provienen de animales Tga20. Por lo contrario, la unión de la α -sinucleína en cultivos WT o deficientes en PrP^c disminuye. Corroboramos estos resultados mediante la línea celular HEK293 transfectada con la secuencia de PrP^c. En estas condiciones la capacidad celular de unirse a las protofibrillas de α -sinucleína es mayor comparado con células transfectadas con un vector vacío. Por lo tanto, en presencia de PrP^c, las protofibrillas de α -sinucleína se unen con mayor afinidad a las células.

En el trabajo publicado por Aulic *et al.*, se observa la colocalización de PrP^c anclada a membrana y α -sinucleína mediante microscopia confocal, lo cual ratifica nuestros resultados llevados a cabo con las células HEK293. Además, en Aulic *et al.*, realizan ensayos ELISA (del inglés enzyme-linked immunosorbent assay) y resonancia plasmónica de superficie (SPR, del inglés surface plasmon resonance) para caracterizar la interacción molecular entre las dos proteínas. Los resultados revelan que las fibras de α -sinucleína se unen a PrP^c *in vitro*. Por un lado, la señal de PrP^c en el ensayo ELISA aumenta cuando la concentración de α -sinucleína oligomérica es mayor. Por otro lado, gracias al biosensor SPR se puede calcular la constante de unión. Este valor obtenido sugiere que: (I) La interacción inicial entre la PrP^c y la α -sinucleína oligomérica es débil pero más tarde se fortalece. Y (II) las especies oligoméricas más pequeñas de α -sinucleína (Aulic et al., 2017).

En el estudio de Ferreira *et al.*, logran describir la unión de PrP^c y α -sinucleína por coinmunoprecipitación. Además, identifican la formación de un complejo que incluye PrP^c, α -sinucleína y también la quinasa Fyn y el receptor NMDA (del inglés N-methyl-Daspartic acid) en los terminales postsinápticos. Paralelamente, describen el fallo sináptico que se desencadena al unirse PrP^c y α -sinucleína. Los oligómeros de α sinucleína a través de los receptores NMDA reducen LTP (del inglés long-term potentiation), este es un mecanismo molecular involucrado en la memoria y aprendizaje. Ferreita *et al.*, describe que α -sinucleína requiere la presencia de PrP^c para reducir LTP. En condiciones fisiológicas, PrP^c inhibe la actividad de Fyn y, consecuentemente, atenúa el flujo de calcio mediante los receptores NMDA. La unión de α -sinucleína oligomérica a PrP^c induce la fosforilación de Fyn a través de los receptores metabotrópicos de glutamato 5 (mGluR5, del inglés metabotropic glutamate receptor 5). Entonces, los receptores NMDA se hiperactivan, por lo tanto la concentración de calcio aumenta en los terminales postsinápticos y afecta al LTP. Así pues, debido a estas alteraciones observadas, la unión de PrP^c y α -sinucleína induce daño cognitivo a través de los receptores NMDA y mGluR5 (Ferreira et al., 2017).

Ambos trabajos logran observar la interacción directa existente entre PrP^{c} y α sinucleína mediante distintos métodos. Por lo tanto, Aulic *et al.*, y Ferreira *et al.*, corroboran los resultados que hemos obtenido gracias a las inmunofluorescencias de cultivos neuronales y células HEK293.

1.2.1. Participación del dominio central cargado de PrP^c

PrP^c se puede dividir en dos regiones estructurales bien definidas; un amino terminal flexible y un dominio globular carboxilo terminal. En el amino terminal se encuentran varias regiones como los OR (del inglés octarepeats), el CD (del inglés central domain) que incluye el CC (cluster de carga) y la HR (del inglés hydrophobic región) (Riek et al., 1997, Nicolas et al., 2009).

Paradójicamente, se ha descrito para PrP^c tanto un papel neurotóxico como neuroprotector (Harris and True, 2006). Por un lado, PrP^c puede proteger las células de varios estímulos proapoptóticos (Kuwahara et al., 1999, Bounhar et al., 2001, McLennan et al., 2004, Li and Harris, 2005, Roucou et al., 2005, Spudich et al., 2005). Pero bajo algunas condiciones experimentales PrP^c promueve muerte cellular (Brown et al., 1994, Solforosi et al., 2004, Sunyach and Checler, 2005). Dados estos resultados contradictorios, varios grupos se han centrado en analizar las posibles funciones que desempeña cada dominio de la PrP^c. En la Figura 22, mostramos las construcciones truncadas que existen del gen de *PRNP*.



Figura 22. Estructura de PrP^{c} murina y las formas truncadas de PrP^{c} empleadas en este estudio. Se muestran las deleciones $\Delta F35$, ΔCD , ΔCC , ΔHR , ΔCR de PrP^{c} . (Vilches et al., 2016)

En estudios anteriores se ha confirmado que los OR de PrP^c están relacionados con el transporte del zinc, cobre y que tienen una función antioxidativa (Viles et al., 1999, Jackson et al., 2001). También, cada forma truncada de PrP^c tiene un proceso citotóxico distinto, Δ F35 y Δ CD muestran este aumento de citotoxicidad y a la vez un deterioro en el procesamiento de α -cleavage de PrP^c *in vitro* (Vilches et al., 2016). *In vivo*, modelos murinos que expresan formas truncadas de PrP^c presentan un fenotipo diferente según la región delecionada en el gen. Deleciones en *PRNP* pueden dar lugar a una actividad neurodegenerativa, animales con la deleción Δ CR solo sobreviven una semana después del nacimiento (Li et al., 2007a), animales que expresan la deleción Δ CD (Baumann et al., 2007) o Δ F35 en el amino terminal muestran una degeneración de la mielina de progresión rápida en el sistema nervioso central y periférico y sufren una degeneración temprana celular, asociada normalmente al cerebelo. Por lo tanto, parece que cada región de la PrP^c tiene una función distinta.

Ya en Lauren *et al.*, observan que los aminoácidos del CC (95-105) con la cooperación de los residuos del amino terminal de PrP^c se unen a los oligómeros de β -amiloide, implicados en la EA (Younan et al., 2013). Así pues, identifican que la deleción del dominio CC de la PrP^c, reduce la unión a los oligómeros de β -amiloide. Esta unión desencadena una respuesta, esta respuesta genera controversia entre varios autores. Algunos defienden que la respuesta es neurotóxica ya que puede desencadenar la hiperfosforilación de Tau (Lauren et al., 2009, Nygaard and Strittmatter, 2009, Westaway and Jhamandas, 2012). Y otros defienden que PrP^c tiene un papel neuroprotector en la EA (Parkin et al., 2007, Griffiths et al., 2011, Vergara et al., 2015).
Debido a esta importancia que presenta el dominio CC en la EA, nos preguntamos si alguno de los dominios de PrP^c también está involucrado directamente en la unión a α -sinucleína. Gracias a las construcciones truncadas de PrP^c (Figura 20) detectamos que las células que expresan la forma Δ CC de PrP^c descienden su unión a α -sinucleína. Además, posteriormente, Ferreira *et al.*, (Ferreira et al., 2017) estudia las regiones de PrP^c que median los efectos de α -sinucleína. Se usan distintos anticuerpos anti-PrP^c para bloquear una región determinada, los anticuerpos reconocen el amino terminal, la región 93-109 que corresponde a CC o el carboxilo terminal. Únicamente, se observa el bloqueo del efecto de α -sinucleína en los cortes cerebrales tratados con el anticuerpo que reconoce el dominio CC. Por lo tanto, estos resultados corroboran nuestros datos y se sugiere que el segmento 93-109 de PrP^c es crucial para inducir los efectos tóxicos de PrP^c (Ferreira et al., 2017).

Hasta ahora, parece que el dominio CC podría ser el lugar de unión de PrP^c a las proteínas amiloides (Kessels et al., 2010, Aulic et al., 2017), aunque esta región de interacción no se ha descrito para otros péptidos amiloides.

Estos resultados aportan una nueva diana terapéutica. Dado que existen anticuerpos anti PrP^c que interfieren en la interacción de PrP^c-PrP^{sc} y de este modo bloquean la replicación del prión (Peretz et al., 2001), se sugiere que anticuerpos anti PrP^c pueden prevenir la unión de los oligómeros de α -sinucleína a PrP^c. Y así, evitar la unión, entrada y propagación de α -sinucleína en las α -sinucleinopatias (Aulic et al., 2017). Incluso, como se ha descrito la implicación de PrP^c y α -sinucleína en los fallos de memoria, esta terapia puede apuntar a la neutralización de los efectos generados en la sinapsis. Así que, otra posibilidad es que esta estrategia pueda resultar más efectiva en impedir o retrasar el inicio de los déficits de memoria asociados a las α sinucleinopatías (Ferreira et al., 2017).

2. Reelina en enfermedades neurodegenerativas

Reelina es una glicoproteína esencial para la correcta organización citoarquitectónica del sistema nervioso central (SNC). También, se ha propuesto que Reelina está implicada en varias enfermedades neurodegenerativas ya que una reducción de la expresión de Reelina da lugar a modificaciones en la señalización que provoca un declive cognitivo (Miettinen et al., 2005, Stranahan et al., 2011a). Y fallos en la cascada de señalización de Reelina están asociados a problemas de memoria (Stranahan et al., 2011b).

En la EA, Reelina compite con la apolipoproteína E (ApoE) para unirse a los receptores VLDLR (del inglés very low density lipoprotein receptor) y ApoER2 (del inglés apolipoprotein receptor 2) (D'Arcangelo et al., 1999). Por lo tanto, se ve comprometida su capacidad de unión a los receptores, lo cual genera problemas para controlar la fosforilación de Tau (Botella-Lopez et al., 2010, Cuchillo-Ibanez et al., 2016). Se ha observado que el adaptador intracelular Disabled1 (Dab1) se une a APP (del inglés amyloid precursor protein) (Trommsdorff et al., 1998) y que Reelina puede interactuar con el dominio extracelular de APP (Hoe et al., 2009). Tambíen, se ha observado que la presencia de Reelina aumenta la escisión de APP (Hoe et al., 2006). Por lo tanto, Reelina y los componentes de su cascada de señalización pueden participar en la generación de los depósitos amiloides de la EA. Se ha identificado depósitos amiloides positivos para Reelina (Chin et al., 2007, Knuesel et al., 2009, Botella-Lopez et al., 2010).

La expresión de Reelina en la EA se ha analizado anteriormente en muestras humanas. Se ha identificado un aumento de los niveles proteicos y RNA (del inglés ribonucleic acid) mensajero (mRNA) de Reelina en corteza. En nuestro caso, contrariamente, se ha observado una disminución proteica y un aumento del mRNA. Otros grupos han analizado el LCR (líquido cefaloraquídeo), donde se ha detectado un aumento de Reelina que, mayoritariamente, corresponde al aumento del fragmento 180 kDa. Por lo tanto, la proteólisis de Reelina aumenta en la EA. También, se ha observado una alteración en el patrón de glicosilación de Reelina en el LCR de la EA (Botella-Lopez et al., 2006).

Teniendo todos estos datos en cuenta, nos preguntamos si los niveles de Reelina también se encuentran alterados en las α -sinucleinopatías, PD y demencia por cuerpos de lewy (DLB). Botella-Lopez *et al.*, identifican un aumento de la banda de 180 kDa de Reelina en el LCR de casos de α -sinucleinopatías (Botella-Lopez et al., 2006). Por otro lado, según los resultados obtenidos después del estudio bioquímico de Reelina, se observa un descenso de la expresión de Reelina en la corteza frontal de pacientes DLB, mientras que en EP la expresión de Reelina se mantiene. Además, el gen de *Reln* está definido como un gen susceptible en la EA, pero no en la EP (Seripa et al., 2008,

Miyashita et al., 2014). En las α -sinucleinopatías, si las alteraciones en Reelina son la causa de la enfermedad o una consecuencia de todas las modificaciones cerebrales que se generan se desconoce.

2.1. Expresión de Reelina en prionopatías

2.1.1. La fosforilación de Dab1 no correlaciona con el aumento de Reelina en prionopatías

Reelina es una proteína importante para el desarrollo del cerebro y el mantenimiento y maduración sináptica en el adulto. Desafortunadamente, la expresión de Reelina disminuye en la vejez. Aunque, la expresión de Reelina se ha caracterizado en varias enfermedades neurológicas, poco se conocía de los niveles de Reelina en prionopatías.

Se ha descrito variaciones de Dab1 en las prionopatías y su implicación en la acumulación del β-amiloide en pacientes de CJD (Gavin et al., 2010). En los pacientes de CJD que presentan una PrP^{sc} de tipo 1 que correlaciona con el polimorfismo Met/Met no se observan depósitos de β-amiloide pero existe un aumento de la fosforilación en Dab1. En cambio, en la PrP^{sc} de tipo 2 que corresponde al polimorfismo Met/Met hay acúmulos de β-amiloide pero la fosforilación de Dab1 es parecida a los casos controles (Gavin et al., 2010). Dado que la fosforilación de Dab1 viene inducida por Reelina y que se ha detectado variaciones de Reelina en otras enfermedades neurológicas. Decidimos analizar los niveles de Reelina en presencia del péptido comercial PrP (106-126) *in vitro.* Este péptido imita la secuencia central de la PrP^c humana, a temperatura ambiente es capaz de agregar y formar así su forma priónica.

Observamos que en presencia de dicho péptido, los niveles de Reelina aumentan. Paralelamente, comparamos la fosforilación de Dab1 en cultivos WT y de animales *reeler*, que no expresan Reelina, en presencia del péptido (106-126). Sorprendentemente, observamos un aumento de la fosforilación de Dab1 en los cultivos neuronales *reeler*. Por lo que, la expresión de Reelina no es necesaria para fosforilar Dab1 en presencia del péptido (106-126). Se ha detectado que la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) fosforila Dab1 en la serina 491 *in vitro* e *in vivo* (Keshvara et al., 2002). Así, existen otras vías que fosforilan Dab1 y no solamente la señalización de Reelina. Dada esta fosforilación de Dab1 independiente de Reelina, analizamos la cascada de señalización de Reelina en cultivos WT. En los cultivos infectados con el péptido (106-126) se observa un aumento de la fosforilación de Dab1 a los 30 minutos, por el contrario, los niveles Reelina aumentan a las 24 horas. Por lo tanto, el aumento de los niveles de Reelina se identifica más tarde que el aumento de

Dab1 fosforilado. Así, estos datos corroboran que la fosforilación de Dab1 no viene regulada por la presencia de Reelina en estas condiciones.

Comprobamos los niveles de los receptores de Reelina, ApoER2 y VLDLR, *in vitro*. Se ha publicado que mediante la señalización de Reelina se puede modular los niveles de ApoER2 (Duit et al., 2010). Cuatro días después de infectar el cultivo con el péptido (106-126), los niveles de ambos receptores varían, aunque no es estadísticamente significativo. Esta variación de los niveles de los receptores está ligado a la muerte celular que desencadena la presencia del péptido (106-126). Anteriormente, se ha descrito que los niveles de caspasa 3 aumentan en los cultivos deficientes de PrP^c en presencia del péptido (106-126). Por lo que, la PrP^c endógena no está implicada en la activación de la caspasa 3 (Gavin et al., 2005). A pesar de que el aumento de Reelina perdura en los cultivos infectados, no se identifica un aumento de los receptores ni de la fosforilación de Dab1. Por lo tanto, se sugiere que a pesar del aumento de Reelina, esta no es funcional.

Además, nos preguntamos si las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés reactive oxygen species) que generan el prión puede estar involucrado en el aumento de Reelina. Anteriormente, se ha descrito que la presencia del prión aumenta los niveles de ROS (Schneider et al., 2003, Gavin et al., 2005, Pietri et al., 2006, Pamplona et al., 2008, Vilches et al., 2016). Paralelamente, los priones también activan quinasas. En Gavín et al., se indica que a concentraciones elevadas (80 µM) de PrP (106-126), las quinasas c-Jun N-terminal (JNK) o P38 se mantienen, pero se activa la fosfoinositol 3quinasa/proteína quinasa B (PI3K/AKT), ERK1/2 (del inglés extracellular signalregulated kinases 1/2) y la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) (Gavin et al., 2005). Aunque, otros grupos describen una disminución de la actividad de PI3K y Akt en el cerebelo de animales inoculados y cultivos neuronales después de usar el péptido (106-126) a 40 µM (Simon et al., 2014, Newaz et al., 2015). Sorprendentemente, hay autores que consideran que el péptido (106-126) no es neurotóxico in vitro (Kunz et al., 1999). Así pues, analizamos si el aumento de Reelina viene determinado por los niveles de ROS. Mediante el uso de difenileneiodonio (DPI) y N-acetil-L-cisteína (NAC), que inhiben la generación de ROS, se observa que los niveles de Reelina no varían en presencia del prión. Por lo tanto, el aumento de Reelina depende de ROS.

El estrés oxidativo tiene un papel importante en el desarrollo de varias enfermedades no solo enfermedades neurodegenerativas sino también en la artritis, cáncer, enfermedades autoinmunes, problemas cardiovasculares y de forma natural en la vejez. En estos casos, hay un aumento de ROS. En enfermedades priónicas, se ha publicado que el estrés oxidativo puede estar implicado en la conversión de PrP^c y en las modificaciones celulares que se desencadena a posteriori (Islam, 2017).

2.1.2. Niveles de Reelina en CJD y modelos de EETs

Estudiamos los niveles de expresión de Reelina en muestras humanas de enfermos de CJD y animales con distintas dosis de *PRNP* e infectados con prión. Primero observamos que los animales con distinta dosis genética de *PRNP* tienen el mismo nivel de Reelina. Contrariamente, se ha reportado que los extractos de cerebros de animales *Prnp*^{0/0} tienen niveles de Reelina más altos, sobretodo en la banda 180 kDa. Estos resultados sugieren que la proteólisis de Reelina aumenta en los animales deficientes de PrP^c comparado con animales WT (Devanathan et al., 2010). Estas diferencias pueden ser consecuencia del uso de modelos animales KO distintos, aunque ambos sean *Prnp*^{0/0} tienen un fondo genético distinto. En el trabajo de Devanathan *et al.*, se usan animales *Zurich I Prnp*^{0/0}. En nuestro caso, se emplean los animales *Zurich I Prnp*^{0/0} retrocruzados, los cuales reducen la presencia de los "flanking genes" (ver introducción). Se ha publicado que en adulto los niveles de mRNA de *Reln* no varían entre animales con distintos niveles de expresión de PrP^c (Rangel et al., 2009, Benvegnu et al., 2011).

Los niveles proteicos y mRNA de Reelina se han analizado en corteza frontal de pacientes de CJD. A pesar de que no se observan diferencias significativas, hay un aumento de los niveles de proteína y mRNA de Reelina en CJD. Especialmente, en el tipo 2. Contrariamente, es en los acúmulos de PrP^{sc} tipo 2 Met/Met donde no hay variaciones en la fosforilación de Dab1 (Gavin et al., 2010). También, Se ha publicado una disminución de Tau y su forma fosforilada en la corteza frontal de pacientes de CJD. Dada la señalización intracelular de Reelina, es razonable considerar que el aumento de Reelina en pacientes de CJD puede contribuir al descenso de los niveles de Tau fosforilado (Llorens et al., 2015).

Paralelamente, animales Tg340, sobreexpresantes de PrP^c, se inoculan con extracto de cerebro de pacientes de CJD de tipo 1 Met/Met. En los estadios finales de la enfermedad se detecta un aumento de los niveles de mRNA de *Reln* en el córtex cerebral de estos animales. Dado que este aumento no se detecta en estadios anteriores, se sugiere que las alteraciones de Reelina están probablemente asociadas al conjunto de cambios metabólicos presentes en el proceso infectivo. Contrariamente, animales silvestres inoculados con los priones Mo-BSE y 22L muestran un descenso de Reelina en la corteza cerebral. Este descenso puede ser debido a la muerte neuronal o a las diferencias que existen entre el prión murino y humano.

Dado los resultados que obtenidos se puede considerar que los cambios observados en Reelina en los distintos modelos de prionopatías son secundarios al proceso degenerativo y seguramente están asociados a los cambios neuronales que se generan debido a la patología (Clinton et al., 1993, Ferrer, 2002). Por lo tanto, el aumento de Reelina observado en las muestras de cerebro de pacientes de CJD no está asociado al inicio de la enfermedad. Finalmente, aunque concluimos que Reelina no es un buen biomarcador para las prionopatías, existen otros biomarcadores usados para detectar prionopatías como la proteína 14-3-3 y α -sinucleína en el LCR de pacientes CJD esporádicos (Llorens et al., 2015, Schmitz et al., 2016, Llorens et al., 2017a).

CONCLUSIONES

- 1. PrP^{c} interactúa con α -sinucleína en neuronas pudiendo considerarse un receptor de la misma.
- 2. El proceso de dispersión de α -sinucleína se incrementa en los ratones de sobreexpresión de PrP^c.
- 3. A nivel molecular, el dominio central (CD) de la PrP^{c} es necesario para la unión a las protofibrillas de α -sinucleína *in vitro*.
- 4. Los niveles de Reelina descienden significativamente en la corteza frontal de EA y DLB. Por el contrario se incrementa en sCJD (tipo 1).
- 5. El incremento de Reelina presente en modelos de prionopatias y en sCJD (1) no se correlaciona con una mayor señalización intracelular.

BIBLIOGRAFÍA

- Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A (2000) Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. Neuron 25:239-252.
- Abounit S, Bousset L, Loria F, Zhu S, de Chaumont F, Pieri L, Olivo-Marin JC, Melki R, Zurzolo C (2016) Tunneling nanotubes spread fibrillar alpha-synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. The EMBO journal 35:2120-2138.
- Adler CH, Beach TG, Shill HA, Caviness JN, Driver-Dunckley E, Sabbagh MN, Patel A, Sue LI, Serrano G, Jacobson SA, Davis K, Belden CM, Dugger BN, Paciga SA, Winslow AR, Hirst WD, Hentz JG (2017) GBA mutations in Parkinson disease: earlier death but similar neuropathological features. European journal of neurology 24:1363-1368.
- Aguzzi A, Baumann F, Bremer J (2008) The prion's elusive reason for being. Annual review of neuroscience 31:439-477.
- Aguzzi A, Calella AM (2009) Prions: protein aggregation and infectious diseases. Physiological reviews 89:1105-1152.
- Aguzzi A, Nuvolone M, Zhu C (2013) The immunobiology of prion diseases. Nature reviews Immunology 13:888-902.
- Aguzzi A, Rajendran L (2009) The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. Neuron 64:783-790.
- Aguzzi A, Sigurdson CJ (2004) Antiprion immunotherapy: to suppress or to stimulate? Nature reviews Immunology 4:725-736.
- Alcantara S, Ruiz M, D'Arcangelo G, Ezan F, de Lecea L, Curran T, Sotelo C, Soriano E (1998) Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 18:7779-7799.
- Alper T (1972) The nature of the scrapie agent. Journal of clinical pathology Supplement 6:154-155.
- Annerino DM, Arshad S, Taylor GM, Adler CH, Beach TG, Greene JG (2012) Parkinson's disease is not associated with gastrointestinal myenteric ganglion neuron loss. Acta neuropathologica 124:665-680.
- Arnaud L, Ballif BA, Cooper JA (2003) Regulation of protein tyrosine kinase signaling by substrate degradation during brain development. Molecular and cellular biology 23:9293-9302.
- Athanassiadou A, Voutsinas G, Psiouri L, Leroy E, Polymeropoulos MH, Ilias A, Maniatis GM, Papapetropoulos T (1999) Genetic analysis of families with Parkinson disease that carry the Ala53Thr mutation in the gene encoding alpha-synuclein. American journal of human genetics 65:555-558.
- Aulic S, Le TT, Moda F, Abounit S, Corvaglia S, Casalis L, Gustincich S, Zurzolo C, Tagliavini F, Legname G (2014) Defined alpha-synuclein prion-like molecular assemblies spreading in cell culture. BMC neuroscience 15:69.
- Aulic S, Masperone L, Narkiewicz J, Isopi E, Bistaffa E, Ambrosetti E, Pastore B, De Cecco E, Scaini D, Zago P, Moda F, Tagliavini F, Legname G (2017) alpha-Synuclein Amyloids
 Hijack Prion Protein to Gain Cell Entry, Facilitate Cell-to-Cell Spreading and Block Prion Replication. Scientific reports 7:10050.
- Auluck PK, Caraveo G, Lindquist S (2010) alpha-Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. Annual review of cell and developmental biology 26:211-233.
- Bal M, Leitz J, Reese AL, Ramirez DM, Durakoglugil M, Herz J, Monteggia LM, Kavalali ET (2013) Reelin mobilizes a VAMP7-dependent synaptic vesicle pool and selectively augments spontaneous neurotransmission. Neuron 80:934-946.

- Baloyannis SJ (2005) Morphological and morphometric alterations of Cajal-Retzius cells in early cases of Alzheimer's disease: a Golgi and electron microscope study. The International journal of neuroscience 115:965-980.
- Bar I, Lambert de Rouvroit C, Goffinet AM (2000) The evolution of cortical development. An hypothesis based on the role of the Reelin signaling pathway. Trends in neurosciences 23:633-638.
- Barrow PA, Holmgren CD, Tapper AJ, Jefferys JG (1999) Intrinsic physiological and morphological properties of principal cells of the hippocampus and neocortex in hamsters infected with scrapie. Neurobiology of disease 6:406-423.
- Barry AE, Klyubin I, Mc Donald JM, Mably AJ, Farrell MA, Scott M, Walsh DM, Rowan MJ (2011) Alzheimer's disease brain-derived amyloid-beta-mediated inhibition of LTP in vivo is prevented by immunotargeting cellular prion protein. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 31:7259-7263.
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. Cell 46:417-428.
- Baumann F, Tolnay M, Brabeck C, Pahnke J, Kloz U, Niemann HH, Heikenwalder M, Rulicke T, Burkle A, Aguzzi A (2007) Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. The EMBO journal 26:538-547.
- Beffert U, Morfini G, Bock HH, Reyna H, Brady ST, Herz J (2002) Reelin-mediated signaling locally regulates protein kinase B/Akt and glycogen synthase kinase 3beta. The Journal of biological chemistry 277:49958-49964.
- Beffert U, Weeber EJ, Durudas A, Qiu S, Masiulis I, Sweatt JD, Li WP, Adelmann G, Frotscher M, Hammer RE, Herz J (2005) Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. Neuron 47:567-579.
- Beffert U, Weeber EJ, Morfini G, Ko J, Brady ST, Tsai LH, Sweatt JD, Herz J (2004) Reelin and cyclin-dependent kinase 5-dependent signals cooperate in regulating neuronal migration and synaptic transmission. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 24:1897-1906.
- Benvegnu S, Roncaglia P, Agostini F, Casalone C, Corona C, Gustincich S, Legname G (2011) Developmental influence of the cellular prion protein on the gene expression profile in mouse hippocampus. Physiological genomics 43:711-725.
- Beraldo FH, Arantes CP, Santos TG, Machado CF, Roffe M, Hajj GN, Lee KS, Magalhaes AC, Caetano FA, Mancini GL, Lopes MH, Americo TA, Magdesian MH, Ferguson SS, Linden R, Prado MA, Martins VR (2011) Metabotropic glutamate receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin gamma1 chain. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 25:265-279.
- Bieri G, Gitler AD, Brahic M (2018) Internalization, axonal transport and release of fibrillar forms of alpha-synuclein. Neurobiology of disease 109:219-225.
- Bock HH, Herz J (2003) Reelin activates SRC family tyrosine kinases in neurons. Current biology : CB 13:18-26.
- Bock HH, Jossin Y, Liu P, Forster E, May P, Goffinet AM, Herz J (2003) Phosphatidylinositol 3kinase interacts with the adaptor protein Dab1 in response to Reelin signaling and is required for normal cortical lamination. The Journal of biological chemistry 278:38772-38779.
- Bock HH, Jossin Y, May P, Bergner O, Herz J (2004) Apolipoprotein E receptors are required for reelin-induced proteasomal degradation of the neuronal adaptor protein Disabled-1. The Journal of biological chemistry 279:33471-33479.
- Borghi R, Marchese R, Negro A, Marinelli L, Forloni G, Zaccheo D, Abbruzzese G, Tabaton M (2000) Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. Neuroscience letters 287:65-67.

- Botella-Lopez A, Burgaya F, Gavin R, Garcia-Ayllon MS, Gomez-Tortosa E, Pena-Casanova J, Urena JM, Del Rio JA, Blesa R, Soriano E, Saez-Valero J (2006) Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103:5573-5578.
- Botella-Lopez A, Cuchillo-Ibanez I, Cotrufo T, Mok SS, Li QX, Barquero MS, Dierssen M, Soriano E, Saez-Valero J (2010) Beta-amyloid controls altered Reelin expression and processing in Alzheimer's disease. Neurobiology of disease 37:682-691.
- Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc A (2001) Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. The Journal of biological chemistry 276:39145-39149.
- Bouzamondo-Bernstein E, Hopkins SD, Spilman P, Uyehara-Lock J, Deering C, Safar J, Prusiner SB, Ralston HJ, 3rd, DeArmond SJ (2004) The neurodegeneration sequence in prion diseases: evidence from functional, morphological and ultrastructural studies of the GABAergic system. Journal of neuropathology and experimental neurology 63:882-899.
- Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA (1999) Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. Neurology 52:1214-1220.
- Braak H, Del Tredici K (2008) Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. Neurology 70:1916-1925.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiology of aging 24:197-211.
- Brahic M, Bousset L, Bieri G, Melki R, Gitler AD (2016) Axonal transport and secretion of fibrillar forms of alpha-synuclein, Abeta42 peptide and HTTExon 1. Acta neuropathologica 131:539-548.
- Breid S, Bernis ME, Babila JT, Garza MC, Wille H, Tamguney G (2016) Neuroinvasion of alpha-Synuclein Prionoids after Intraperitoneal and Intraglossal Inoculation. Journal of virology 90:9182-9193.
- Bremer J, Baumann F, Tiberi C, Wessig C, Fischer H, Schwarz P, Steele AD, Toyka KV, Nave KA, Weis J, Aguzzi A (2010) Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. Nature neuroscience 13:310-318.
- Brown DR, Herms J, Kretzschmar HA (1994) Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment. Neuroreport 5:2057-2060.
- Brown DR, Nicholas RS, Canevari L (2002) Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. Journal of neuroscience research 67:211-224.
- Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretzschmar H (1997) The cellular prion protein binds copper in vivo. Nature 390:684-687.
- Brundin P, Li JY, Holton JL, Lindvall O, Revesz T (2008) Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread. Nature reviews Neuroscience 9:741-745.
- Brundin P, Melki R (2017) Prying into the Prion Hypothesis for Parkinson's Disease. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 37:9808-9818.
- Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. Cell 73:1339-1347.
- Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. Nature 356:577-582.
- Burai R, Ait-Bouziad N, Chiki A, Lashuel HA (2015) Elucidating the Role of Site-Specific Nitration of alpha-Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Disease via Protein Semisynthesis and Mutagenesis. Journal of the American Chemical Society 137:5041-5052.
- Burre J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Sudhof TC (2010) Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. Science 329:1663-1667.

- Cali I, Castellani R, Yuan J, Al-Shekhlee A, Cohen ML, Xiao X, Moleres FJ, Parchi P, Zou WQ, Gambetti P (2006) Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease revisited. Brain : a journal of neurology 129:2266-2277.
- Campana V, Caputo A, Sarnataro D, Paladino S, Tivodar S, Zurzolo C (2007) Characterization of the properties and trafficking of an anchorless form of the prion protein. The Journal of biological chemistry 282:22747-22756.
- Carleton A, Tremblay P, Vincent JD, Lledo PM (2001) Dose-dependent, prion protein (PrP)mediated facilitation of excitatory synaptic transmission in the mouse hippocampus. Pflugers Archiv : European journal of physiology 442:223-229.
- Carmine Belin A, Westerlund M, Bergman O, Nissbrandt H, Lind C, Sydow O, Galter D (2007) S18Y in ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) associated with decreased risk of Parkinson's disease in Sweden. Parkinsonism & related disorders 13:295-298.
- Cartelli D, Amadeo A, Calogero AM, Casagrande FVM, De Gregorio C, Gioria M, Kuzumaki N, Costa I, Sassone J, Ciammola A, Hattori N, Okano H, Goldwurm S, Roybon L, Pezzoli G, Cappelletti G (2017) Parkin absence accelerates microtubule aging in dopaminergic neurons. Neurobiology of aging 61:66-74.
- Cartelli D, Cappelletti G (2016) Microtubule Destabilization Paves the Way to Parkinson's Disease. Molecular neurobiology.
- Carulla P, Bribian A, Rangel A, Gavin R, Ferrer I, Caelles C, Del Rio JA, Llorens F (2011) Neuroprotective role of PrPC against kainate-induced epileptic seizures and cell death depends on the modulation of JNK3 activation by GluR6/7-PSD-95 binding. Molecular biology of the cell 22:3041-3054.
- Carulla P, Llorens F, Matamoros-Angles A, Aguilar-Calvo P, Espinosa JC, Gavin R, Ferrer I, Legname G, Torres JM, del Rio JA (2015) Involvement of PrP(C) in kainate-induced excitotoxicity in several mouse strains. Scientific reports 5:11971.
- Caughey B, Baron GS, Chesebro B, Jeffrey M (2009) Getting a grip on prions: oligomers, amyloids, and pathological membrane interactions. Annual review of biochemistry 78:177-204.
- Caughey B, Raymond GJ, Callahan MA, Wong C, Baron GS, Xiong LW (2001) Interactions and conversions of prion protein isoforms. Advances in protein chemistry 57:139-169.
- Cavaliere F, Cerf L, Dehay B, Ramos-Gonzalez P, De Giorgi F, Bourdenx M, Bessede A, Obeso JA, Matute C, Ichas F, Bezard E (2017) In vitro alpha-synuclein neurotoxicity and spreading among neurons and astrocytes using Lewy body extracts from Parkinson disease brains. Neurobiology of disease 103:101-112.
- Chaudhuri KR, Schapira AH (2009) Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. The Lancet Neurology 8:464-474.
- Chen L, Periquet M, Wang X, Negro A, McLean PJ, Hyman BT, Feany MB (2009) Tyrosine and serine phosphorylation of alpha-synuclein have opposing effects on neurotoxicity and soluble oligomer formation. The Journal of clinical investigation 119:3257-3265.
- Chen Y, Beffert U, Ertunc M, Tang TS, Kavalali ET, Bezprozvanny I, Herz J (2005) Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 25:8209-8216.
- Chesebro B, Trifilo M, Race R, Meade-White K, Teng C, LaCasse R, Raymond L, Favara C, Baron G, Priola S, Caughey B, Masliah E, Oldstone M (2005) Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. Science 308:1435-1439.
- Chin J, Massaro CM, Palop JJ, Thwin MT, Yu GQ, Bien-Ly N, Bender A, Mucke L (2007) Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 27:2727-2733.
- Choi MS, Nakamura T, Cho SJ, Han X, Holland EA, Qu J, Petsko GA, Yates JR, 3rd, Liddington RC, Lipton SA (2014) Transnitrosylation from DJ-1 to PTEN attenuates neuronal cell death

in parkinson's disease models. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 34:15123-15131.

- Clayton DF, George JM (1998) The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. Trends in neurosciences 21:249-254.
- Clinton J, Forsyth C, Royston MC, Roberts GW (1993) Synaptic degeneration is the primary neuropathological feature in prion disease: a preliminary study. Neuroreport 4:65-68.
- Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. Nature 370:295-297.
- Cookson MR (2015) LRRK2 Pathways Leading to Neurodegeneration. Current neurology and neuroscience reports 15:42.
- Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, Haynes CM, Hill KJ, Bhullar B, Liu K, Xu K, Strathearn KE, Liu F, Cao S, Caldwell KA, Caldwell GA, Marsischky G, Kolodner RD, Labaer J, Rochet JC, Bonini NM, Lindquist S (2006) Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. Science 313:324-328.
- Corti O, Lesage S, Brice A (2011) What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. Physiological reviews 91:1161-1218.
- Costa E, Chen Y, Davis J, Dong E, Noh JS, Tremolizzo L, Veldic M, Grayson DR, Guidotti A (2002) REELIN and schizophrenia: a disease at the interface of the genome and the epigenome. Molecular interventions 2:47-57.
- Criado JR, Sanchez-Alavez M, Conti B, Giacchino JL, Wills DN, Henriksen SJ, Race R, Manson JC, Chesebro B, Oldstone MB (2005) Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. Neurobiology of disease 19:255-265.
- Cuchillo-Ibanez I, Balmaceda V, Mata-Balaguer T, Lopez-Font I, Saez-Valero J (2016) Reelin in Alzheimer's Disease, Increased Levels but Impaired Signaling: When More is Less. Journal of Alzheimer's disease : JAD 52:403-416.
- Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D (2004) Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. Science 305:1292-1295.
- D'Arcangelo G, Homayouni R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T (1999) Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. Neuron 24:471-479.
- D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. Nature 374:719-723.
- Dale GE, Probst A, Luthert P, Martin J, Anderton BH, Leigh PN (1992) Relationships between Lewy bodies and pale bodies in Parkinson's disease. Acta neuropathologica 83:525-529.
- Danzer KM, Ruf WP, Putcha P, Joyner D, Hashimoto T, Glabe C, Hyman BT, McLean PJ (2011) Heat-shock protein 70 modulates toxic extracellular alpha-synuclein oligomers and rescues trans-synaptic toxicity. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 25:326-336.
- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. Neuron 39:889-909.
- Dazzo E, Fanciulli M, Serioli E, Minervini G, Pulitano P, Binelli S, Di Bonaventura C, Luisi C, Pasini E, Striano S, Striano P, Coppola G, Chiavegato A, Radovic S, Spadotto A, Uzzau S, La Neve A, Giallonardo AT, Mecarelli O, Tosatto SC, Ottman R, Michelucci R, Nobile C (2015) Heterozygous reelin mutations cause autosomal-dominant lateral temporal epilepsy. American journal of human genetics 96:992-1000.
- de Rijk MC, Breteler MM, Graveland GA, Ott A, Grobbee DE, van der Meche FG, Hofman A (1995) Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam Study. Neurology 45:2143-2146.
- De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, Cicek AE, Kou Y, Liu L, Fromer M, Walker S, Singh T, Klei L, Kosmicki J, Shih-Chen F, Aleksic B, Biscaldi M, Bolton PF,

Brownfeld JM, Cai J, Campbell NG, Carracedo A, Chahrour MH, Chiocchetti AG, Coon H, Crawford EL, Curran SR, Dawson G, Duketis E, Fernandez BA, Gallagher L, Geller E, Guter SJ, Hill RS, Ionita-Laza J, Jimenz Gonzalez P, Kilpinen H, Klauck SM, Kolevzon A, Lee I, Lei I, Lei J, Lehtimaki T, Lin CF, Ma'ayan A, Marshall CR, McInnes AL, Neale B, Owen MJ, Ozaki N, Parellada M, Parr JR, Purcell S, Puura K, Rajagopalan D, Rehnstrom K, Reichenberg A, Sabo A, Sachse M, Sanders SJ, Schafer C, Schulte-Ruther M, Skuse D, Stevens C, Szatmari P, Tammimies K, Valladares O, Voran A, Li-San W, Weiss LA, Willsey AJ, Yu TW, Yuen RK, Study DDD, Homozygosity Mapping Collaborative for A, Consortium UK, Cook EH, Freitag CM, Gill M, Hultman CM, Lehner T, Palotie A, Schellenberg GD, Sklar P, State MW, Sutcliffe JS, Walsh CA, Scherer SW, Zwick ME, Barett JC, Cutler DJ, Roeder K, Devlin B, Daly MJ, Buxbaum JD (2014) Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. Nature 515:209-215.

- Del Rio JA, Heimrich B, Borrell V, Forster E, Drakew A, Alcantara S, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Derer P, Frotscher M, Soriano E (1997) A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. Nature 385:70-74.
- Desplats P, Lee HJ, Bae EJ, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, Spencer B, Masliah E, Lee SJ (2009) Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106:13010-13015.
- Detwiler LA (1992) Scrapie. Revue scientifique et technique 11:491-537.
- Devanathan V, Jakovcevski I, Santuccione A, Li S, Lee HJ, Peles E, Leshchyns'ka I, Sytnyk V, Schachner M (2010) Cellular form of prion protein inhibits Reelin-mediated shedding of Caspr from the neuronal cell surface to potentiate Caspr-mediated inhibition of neurite outgrowth. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 30:9292-9305.
- Diarra-Mehrpour M, Arrabal S, Jalil A, Pinson X, Gaudin C, Pietu G, Pitaval A, Ripoche H, Eloit M, Dormont D, Chouaib S (2004) Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. Cancer research 64:719-727.
- Dickson DW (2012) Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2.
- Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM, Hardy J, Leverenz JB, Del Tredici K, Wszolek ZK, Litvan I (2009) Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. The Lancet Neurology 8:1150-1157.
- Dickson DW, Fujishiro H, DelleDonne A, Menke J, Ahmed Z, Klos KJ, Josephs KA, Frigerio R, Burnett M, Parisi JE, Ahlskog JE (2008) Evidence that incidental Lewy body disease is pre-symptomatic Parkinson's disease. Acta neuropathologica 115:437-444.
- Dimant H, Kalia SK, Kalia LV, Zhu LN, Kibuuka L, Ebrahimi-Fakhari D, McFarland NR, Fan Z, Hyman BT, McLean PJ (2013) Direct detection of alpha synuclein oligomers in vivo. Acta neuropathologica communications 1:6.
- Dimitriadi M, Hart AC (2010) Neurodegenerative disorders: insights from the nematode Caenorhabditis elegans. Neurobiology of disease 40:4-11.
- Doehner J, Knuesel I (2010) Reelin-mediated Signaling during Normal and Pathological Forms of Aging. Aging and disease 1:12-29.
- Doehner J, Madhusudan A, Konietzko U, Fritschy JM, Knuesel I (2010) Co-localization of Reelin and proteolytic AbetaPP fragments in hippocampal plaques in aged wild-type mice. Journal of Alzheimer's disease : JAD 19:1339-1357.
- Duit S, Mayer H, Blake SM, Schneider WJ, Nimpf J (2010) Differential functions of ApoER2 and very low density lipoprotein receptor in Reelin signaling depend on differential sorting of the receptors. The Journal of biological chemistry 285:4896-4908.
- Eisbach SE, Outeiro TF (2013) Alpha-synuclein and intracellular trafficking: impact on the spreading of Parkinson's disease pathology. Journal of molecular medicine 91:693-703.

- El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, Curran MD, Court JA, Mann DM, Ikeda S, Cookson MR, Hardy J, Allsop D (2003) Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 17:1945-1947.
- Elbaz A, Levecque C, Clavel J, Vidal JS, Richard F, Correze JR, Delemotte B, Amouyel P, Alperovitch A, Chartier-Harlin MC, Tzourio C (2003) S18Y polymorphism in the UCH-L1 gene and Parkinson's disease: evidence for an age-dependent relationship. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 18:130-137.
- Eliezer D, Kutluay E, Bussell R, Jr., Browne G (2001) Conformational properties of alphasynuclein in its free and lipid-associated states. Journal of molecular biology 307:1061-1073.
- Emmanouilidou E, Melachroinou K, Roumeliotis T, Garbis SD, Ntzouni M, Margaritis LH, Stefanis L, Vekrellis K (2010) Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calciumdependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 30:6838-6851.
- Erana H, Venegas V, Moreno J, Castilla J (2017) Prion-like disorders and Transmissible Spongiform Encephalopathies: An overview of the mechanistic features that are shared by the various disease-related misfolded proteins. Biochemical and biophysical research communications 483:1125-1136.
- Facheris M, Strain KJ, Lesnick TG, de Andrade M, Bower JH, Ahlskog JE, Cunningham JM, Lincoln S, Farrer MJ, Rocca WA, Maraganore DM (2005) UCHL1 is associated with Parkinson's disease: a case-unaffected sibling and case-unrelated control study. Neuroscience letters 381:131-134.
- Fernandez-Borges N, Erana H, Venegas V, Elezgarai SR, Harrathi C, Castilla J (2015) Animal models for prion-like diseases. Virus research 207:5-24.
- Fernandez-Chacon R, Wolfel M, Nishimune H, Tabares L, Schmitz F, Castellano-Munoz M, Rosenmund C, Montesinos ML, Sanes JR, Schneggenburger R, Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle protein CSP alpha prevents presynaptic degeneration. Neuron 42:237-251.
- Ferreira DG, Temido-Ferreira M, Miranda HV, Batalha VL, Coelho JE, Szego EM, Marques-Morgado I, Vaz SH, Rhee JS, Schmitz M, Zerr I, Lopes LV, Outeiro TF (2017) alphasynuclein interacts with PrP(C) to induce cognitive impairment through mGluR5 and NMDAR2B. Nature neuroscience 20:1569-1579.
- Ferrer I (2002) Synaptic pathology and cell death in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. Cerebellum 1:213-222.
- Ferrer I, Rivera R, Blanco R, Marti E (1999) Expression of proteins linked to exocytosis and neurotransmission in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. Neurobiology of disease 6:92-100.
- Flechsig E, Hegyi I, Leimeroth R, Zuniga A, Rossi D, Cozzio A, Schwarz P, Rulicke T, Gotz J, Aguzzi A, Weissmann C (2003) Expression of truncated PrP targeted to Purkinje cells of PrP knockout mice causes Purkinje cell death and ataxia. The EMBO journal 22:3095-3101.
- Fleming SM, Salcedo J, Fernagut PO, Rockenstein E, Masliah E, Levine MS, Chesselet MF (2004) Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 24:9434-9440.
- Fontaine SN, Zheng D, Sabbagh JJ, Martin MD, Chaput D, Darling A, Trotter JH, Stothert AR, Nordhues BA, Lussier A, Baker J, Shelton L, Kahn M, Blair LJ, Stevens SM, Jr., Dickey CA (2016) DnaJ/Hsc70 chaperone complexes control the extracellular release of neurodegenerative-associated proteins. The EMBO journal 35:1537-1549.
- Forno LS (1996) Neuropathology of Parkinson's disease. Journal of neuropathology and experimental neurology 55:259-272.

- Fournier JG, Escaig-Haye F, Billette de Villemeur T, Robain O (1995) Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrPc) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. Comptes rendus de l'Academie des sciences Serie III, Sciences de la vie 318:339-344.
- Freeman D, Cedillos R, Choyke S, Lukic Z, McGuire K, Marvin S, Burrage AM, Sudholt S, Rana A, O'Connor C, Wiethoff CM, Campbell EM (2013) Alpha-synuclein induces lysosomal rupture and cathepsin dependent reactive oxygen species following endocytosis. PloS one 8:e62143.
- Freir DB, Nicoll AJ, Klyubin I, Panico S, Mc Donald JM, Risse E, Asante EA, Farrow MA, Sessions RB, Saibil HR, Clarke AR, Rowan MJ, Walsh DM, Collinge J (2011) Interaction between prion protein and toxic amyloid beta assemblies can be therapeutically targeted at multiple sites. Nature communications 2:336.
- Freundt EC, Maynard N, Clancy EK, Roy S, Bousset L, Sourigues Y, Covert M, Melki R, Kirkegaard K, Brahic M (2012) Neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein fibrils through axonal transport. Annals of neurology 72:517-524.
- Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T (2002) alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. Nature cell biology 4:160-164.
- Gai WP, Yuan HX, Li XQ, Power JT, Blumbergs PC, Jensen PH (2000) In situ and in vitro study of colocalization and segregation of alpha-synuclein, ubiquitin, and lipids in Lewy bodies. Experimental neurology 166:324-333.
- Gajdusek DC (1977) Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. Science 197:943-960.
- Gallegos S, Pacheco C, Peters C, Opazo CM, Aguayo LG (2015) Features of alpha-synuclein that could explain the progression and irreversibility of Parkinson's disease. Frontiers in neuroscience 9:59.
- Galvin JE, Lee VM, Schmidt ML, Tu PH, Iwatsubo T, Trojanowski JQ (1999) Pathobiology of the Lewy body. Advances in neurology 80:313-324.
- Gambetti P, Kong Q, Zou W, Parchi P, Chen SG (2003) Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. British medical bulletin 66:213-239.
- Gavin R, Braun N, Nicolas O, Parra B, Urena JM, Mingorance A, Soriano E, Torres JM, Aguzzi A, del Rio JA (2005) PrP(106-126) activates neuronal intracellular kinases and Egr1 synthesis through activation of NADPH-oxidase independently of PrPc. FEBS letters 579:4099-4106.
- Gavin R, Ferrer I, del Rio JA (2010) Involvement of Dab1 in APP processing and beta-amyloid deposition in sporadic Creutzfeldt-Jakob patients. Neurobiology of disease 37:324-329.
- Gelpi E, Navarro-Otano J, Tolosa E, Gaig C, Compta Y, Rey MJ, Marti MJ, Hernandez I, Valldeoriola F, Rene R, Ribalta T (2014) Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 29:1010-1018.
- George JM, Jin H, Woods WS, Clayton DF (1995) Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. Neuron 15:361-372.
- Gerlai R (1996) Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? Trends in neurosciences 19:177-181.
- Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM (2001) A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. The Journal of biological chemistry 276:2380-2386.
- Gibb WR, Lees AJ (1988) The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry 51:745-752.
- Goedert M, Masuda-Suzukake M, Falcon B (2017) Like prions: the propagation of aggregated tau and alpha-synuclein in neurodegeneration. Brain : a journal of neurology 140:266-278.

- Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, Braak H (2013) 100 years of Lewy pathology. Nature reviews Neurology 9:13-24.
- Goetz CG (2009) Jean-Martin Charcot and his vibratory chair for Parkinson disease. Neurology 73:475-478.
- Goffinet AM (1984) Events governing organization of postmigratory neurons: studies on brain development in normal and reeler mice. Brain research 319:261-296.
- Gousset K, Zurzolo C (2009) Tunnelling nanotubes: a highway for prion spreading? Prion 3:94-98.
- Greten-Harrison B, Polydoro M, Morimoto-Tomita M, Diao L, Williams AM, Nie EH, Makani S, Tian N, Castillo PE, Buchman VL, Chandra SS (2010) alphabetagamma-Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107:19573-19578.
- Griffiths HH, Whitehouse IJ, Baybutt H, Brown D, Kellett KA, Jackson CD, Turner AJ, Piccardo P, Manson JC, Hooper NM (2011) Prion protein interacts with BACE1 protein and differentially regulates its activity toward wild type and Swedish mutant amyloid precursor protein. The Journal of biological chemistry 286:33489-33500.
- Guedes LC, Chan RB, Gomes MA, Conceicao VA, Machado RB, Soares T, Xu Y, Gaspar P, Carrico JA, Alcalay RN, Ferreira JJ, Outeiro TF, Miltenberger-Miltenyi G (2017) Serum lipid alterations in GBA-associated Parkinson's disease. Parkinsonism & related disorders.
- Guo JL, Lee VM (2014) Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. Nature medicine 20:130-138.
- Hague K, Lento P, Morgello S, Caro S, Kaufmann H (1997) The distribution of Lewy bodies in pure autonomic failure: autopsy findings and review of the literature. Acta neuropathologica 94:192-196.
- Hansen L, Salmon D, Galasko D, Masliah E, Katzman R, DeTeresa R, Thal L, Pay MM, Hofstetter R, Klauber M, et al. (1990) The Lewy body variant of Alzheimer's disease: a clinical and pathologic entity. Neurology 40:1-8.
- Harris DA, True HL (2006) New insights into prion structure and toxicity. Neuron 50:353-357.
- Hegde RS, Mastrianni JA, Scott MR, DeFea KA, Tremblay P, Torchia M, DeArmond SJ, Prusiner SB, Lingappa VR (1998) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. Science 279:827-834.
- Hegde RS, Tremblay P, Groth D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Lingappa VR (1999) Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. Nature 402:822-826.
- Heim B, Krismer F, De Marzi R, Seppi K (2017) Magnetic resonance imaging for the diagnosis of Parkinson's disease. Journal of neural transmission 124:915-964.
- Hellwig S, Hack I, Kowalski J, Brunne B, Jarowyj J, Unger A, Bock HH, Junghans D, Frotscher M (2011) Role for Reelin in neurotransmitter release. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 31:2352-2360.
- Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, Schurmann P, Windl O, Brose N, Kretzschmar H (1999) Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 19:8866-8875.
- Herms JW, Tings T, Dunker S, Kretzschmar HA (2001) Prion protein affects Ca2+-activated K+ currents in cerebellar purkinje cells. Neurobiology of disease 8:324-330.
- Herrmann K, Antonini A, Shatz CJ (1994) Ultrastructural evidence for synaptic interactions between thalamocortical axons and subplate neurons. The European journal of neuroscience 6:1729-1742.
- Hibi T, Hattori M (2009) The N-terminal fragment of Reelin is generated after endocytosis and released through the pathway regulated by Rab11. FEBS letters 583:1299-1303.
- Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J (1999) Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine

phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. Neuron 24:481-489.

- Hoe HS, Lee KJ, Carney RS, Lee J, Markova A, Lee JY, Howell BW, Hyman BT, Pak DT, Bu G, Rebeck GW (2009) Interaction of reelin with amyloid precursor protein promotes neurite outgrowth. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 29:7459-7473.
- Hoe HS, Tran TS, Matsuoka Y, Howell BW, Rebeck GW (2006) DAB1 and Reelin effects on amyloid precursor protein and ApoE receptor 2 trafficking and processing. The Journal of biological chemistry 281:35176-35185.
- Holmes BB, DeVos SL, Kfoury N, Li M, Jacks R, Yanamandra K, Ouidja MO, Brodsky FM, Marasa J, Bagchi DP, Kotzbauer PT, Miller TM, Papy-Garcia D, Diamond MI (2013) Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110:E3138-3147.
- Hsu LJ, Sagara Y, Arroyo A, Rockenstein E, Sisk A, Mallory M, Wong J, Takenouchi T, Hashimoto M, Masliah E (2000) alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. The American journal of pathology 157:401-410.
- Hu W, Kieseier B, Frohman E, Eagar TN, Rosenberg RN, Hartung HP, Stuve O (2008) Prion proteins: physiological functions and role in neurological disorders. Journal of the neurological sciences 264:1-8.
- Huang Z, Gabriel JM, Baldwin MA, Fletterick RJ, Prusiner SB, Cohen FE (1994) Proposed threedimensional structure for the cellular prion protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91:7139-7143.
- Huang Z, Prusiner SB, Cohen FE (1995) Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. Folding & design 1:13-19.
- Invernizzi G, Papaleo E, Sabate R, Ventura S (2012) Protein aggregation: mechanisms and functional consequences. The international journal of biochemistry & cell biology 44:1541-1554.
- Isaacs JD, Jackson GS, Altmann DM (2006) The role of the cellular prion protein in the immune system. Clinical and experimental immunology 146:1-8.
- Ishizawa T, Mattila P, Davies P, Wang D, Dickson DW (2003) Colocalization of tau and alphasynuclein epitopes in Lewy bodies. Journal of neuropathology and experimental neurology 62:389-397.
- Islam MT (2017) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. Neurological research 39:73-82.
- Jackson GS, Murray I, Hosszu LL, Gibbs N, Waltho JP, Clarke AR, Collinge J (2001) Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98:8531-8535.
- Jenco JM, Rawlingson A, Daniels B, Morris AJ (1998) Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. Biochemistry 37:4901-4909.
- Jin J, Meredith GE, Chen L, Zhou Y, Xu J, Shie FS, Lockhart P, Zhang J (2005) Quantitative proteomic analysis of mitochondrial proteins: relevance to Lewy body formation and Parkinson's disease. Brain research Molecular brain research 134:119-138.
- Jossin Y, Ogawa M, Metin C, Tissir F, Goffinet AM (2003) Inhibition of SRC family kinases and non-classical protein kinases C induce a reeler-like malformation of cortical plate development. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 23:9953-9959.
- Kamp F, Exner N, Lutz AK, Wender N, Hegermann J, Brunner B, Nuscher B, Bartels T, Giese A, Beyer K, Eimer S, Winklhofer KF, Haass C (2010) Inhibition of mitochondrial fusion by alpha-synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. The EMBO journal 29:3571-3589.

- Kaneko K, Zulianello L, Scott M, Cooper CM, Wallace AC, James TL, Cohen FE, Prusiner SB (1997) Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94:10069-10074.
- Kaplan IM, Wadia JS, Dowdy SF (2005) Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society 102:247-253.
- Kasai T, Tokuda T, Yamaguchi N, Watanabe Y, Kametani F, Nakagawa M, Mizuno T (2008) Cleavage of normal and pathological forms of alpha-synuclein by neurosin in vitro. Neuroscience letters 436:52-56.
- Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP, Jr. (2006) Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 26:5256-5264.
- Keshvara L, Magdaleno S, Benhayon D, Curran T (2002) Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates disabled 1 independently of Reelin signaling. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 22:4869-4877.
- Kessels HW, Nguyen LN, Nabavi S, Malinow R (2010) The prion protein as a receptor for amyloid-beta. Nature 466:E3-4; discussion E4-5.
- Ki CS, Stavrou EF, Davanos N, Lee WY, Chung EJ, Kim JY, Athanassiadou A (2007) The Ala53Thr mutation in the alpha-synuclein gene in a Korean family with Parkinson disease. Clinical genetics 71:471-473.
- Kieburtz K, Wunderle KB (2013) Parkinson's disease: evidence for environmental risk factors. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 28:8-13.
- Kim C, Ho DH, Suk JE, You S, Michael S, Kang J, Joong Lee S, Masliah E, Hwang D, Lee HJ, Lee SJ (2013) Neuron-released oligomeric alpha-synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. Nature communications 4:1562.
- Kim HJ, Park JW, Byun JH, Vahidi B, Rhee SW, Jeon NL (2012) Integrated microfluidics platforms for investigating injury and regeneration of CNS axons. Annals of biomedical engineering 40:1268-1276.
- Klatzo I, Gajdusek DC, Zigas V (1959) Pathology of Kuru. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 8:799-847.
- Klein J, Chalifa V, Liscovitch M, Loffelholz K (1995) Role of phospholipase D activation in nervous system physiology and pathophysiology. Journal of neurochemistry 65:1445-1455.
- Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E (2008) Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. Nature reviews Neuroscience 9:505-518.
- Knuesel I (2010) Reelin-mediated signaling in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. Progress in neurobiology 91:257-274.
- Knuesel I, Nyffeler M, Mormede C, Muhia M, Meyer U, Pietropaolo S, Yee BK, Pryce CR, LaFerla FM, Marighetto A, Feldon J (2009) Age-related accumulation of Reelin in amyloid-like deposits. Neurobiology of aging 30:697-716.
- Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW (2008) Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. Nature medicine 14:504-506.
- Kovacs GG, Budka H (2008) Prion diseases: from protein to cell pathology. The American journal of pathology 172:555-565.
- Kovacs GG, Budka H (2009) Molecular pathology of human prion diseases. International journal of molecular sciences 10:976-999.
- Kovacs GG, Trabattoni G, Hainfellner JA, Ironside JW, Knight RS, Budka H (2002) Mutations of the prion protein gene phenotypic spectrum. Journal of neurology 249:1567-1582.

- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. Nature genetics 18:106-108.
- Kuffer A, Lakkaraju AK, Mogha A, Petersen SC, Airich K, Doucerain C, Marpakwar R, Bakirci P, Senatore A, Monnard A, Schiavi C, Nuvolone M, Grosshans B, Hornemann S, Bassilana F, Monk KR, Aguzzi A (2016) The prion protein is an agonistic ligand of the G proteincoupled receptor Adgrg6. Nature 536:464-468.
- Kumar R, Jangir DK, Verma G, Shekhar S, Hanpude P, Kumar S, Kumari R, Singh N, Sarovar Bhavesh N, Ranjan Jana N, Kanti Maiti T (2017) S-nitrosylation of UCHL1 induces its structural instability and promotes alpha-synuclein aggregation. Scientific reports 7:44558.
- Kunz B, Sandmeier E, Christen P (1999) Neurotoxicity of prion peptide 106-126 not confirmed. FEBS letters 458:65-68.
- Kuo G, Arnaud L, Kronstad-O'Brien P, Cooper JA (2005) Absence of Fyn and Src causes a reelerlike phenotype. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 25:8578-8586.
- Kupsky WJ, Grimes MM, Sweeting J, Bertsch R, Cote LJ (1987) Parkinson's disease and megacolon: concentric hyaline inclusions (Lewy bodies) in enteric ganglion cells. Neurology 37:1253-1255.
- Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T (1999) Prions prevent neuronal cellline death. Nature 400:225-226.
- Kwan KY, Sestan N, Anton ES (2012) Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. Development 139:1535-1546.
- Langston JW (2006) The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. Annals of neurology 59:591-596.
- Lashuel HA, Overk CR, Oueslati A, Masliah E (2013) The many faces of alpha-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. Nature reviews Neuroscience 14:38-48.
- Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. Nature 457:1128-1132.
- Le Pichon CE, Valley MT, Polymenidou M, Chesler AT, Sagdullaev BT, Aguzzi A, Firestein S (2009) Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice. Nature neuroscience 12:60-69.
- Lee GH, D'Arcangelo G (2016) New Insights into Reelin-Mediated Signaling Pathways. Frontiers in cellular neuroscience 10:122.
- Lee HJ, Patel S, Lee SJ (2005) Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 25:6016-6024.
- Lee HJ, Suk JE, Bae EJ, Lee JH, Paik SR, Lee SJ (2008a) Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. The international journal of biochemistry & cell biology 40:1835-1849.
- Lee HJ, Suk JE, Bae EJ, Lee SJ (2008b) Clearance and deposition of extracellular alpha-synuclein aggregates in microglia. Biochemical and biophysical research communications 372:423-428.
- Lee HJ, Suk JE, Patrick C, Bae EJ, Cho JH, Rho S, Hwang D, Masliah E, Lee SJ (2010) Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. The Journal of biological chemistry 285:9262-9272.
- Lee JG, Takahama S, Zhang G, Tomarev SI, Ye Y (2016) Unconventional secretion of misfolded proteins promotes adaptation to proteasome dysfunction in mammalian cells. Nature cell biology 18:765-776.

Lee MK, Stirling W, Xu Y, Xu X, Qui D, Mandir AS, Dawson TM, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL (2002) Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99:8968-8973.

Legname G (2017) Elucidating the function of the prion protein. PLoS pathogens 13:e1006458.

- Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. Nature 395:451-452.
- Li A, Christensen HM, Stewart LR, Roth KA, Chiesa R, Harris DA (2007a) Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105-125. The EMBO journal 26:548-558.
- Li A, Harris DA (2005) Mammalian prion protein suppresses Bax-induced cell death in yeast. The Journal of biological chemistry 280:17430-17434.
- Li A, Piccardo P, Barmada SJ, Ghetti B, Harris DA (2007b) Prion protein with an octapeptide insertion has impaired neuroprotective activity in transgenic mice. The EMBO journal 26:2777-2785.
- Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, Lashley T, Quinn NP, Rehncrona S, Bjorklund A, Widner H, Revesz T, Lindvall O, Brundin P (2008) Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. Nature medicine 14:501-503.
- Li W, West N, Colla E, Pletnikova O, Troncoso JC, Marsh L, Dawson TM, Jakala P, Hartmann T, Price DL, Lee MK (2005) Aggregation promoting C-terminal truncation of alphasynuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial Parkinson's disease-linked mutations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102:2162-2167.
- Liberski PP (2013) Kuru: a journey back in time from papua new Guinea to the neanderthals' extinction. Pathogens 2:472-505.
- Linden R (2017) The Biological Function of the Prion Protein: A Cell Surface Scaffold of Signaling Modules. Frontiers in molecular neuroscience 10:77.
- Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR (2008) Physiology of the prion protein. Physiological reviews 88:673-728.
- Liu CW, Giasson BI, Lewis KA, Lee VM, Demartino GN, Thomas PJ (2005) A precipitating role for truncated alpha-synuclein and the proteasome in alpha-synuclein aggregation: implications for pathogenesis of Parkinson disease. The Journal of biological chemistry 280:22670-22678.
- Liu L, Jiang D, McDonald A, Hao Y, Millhauser GL, Zhou F (2011) Copper redox cycling in the prion protein depends critically on binding mode. Journal of the American Chemical Society 133:12229-12237.
- Llorens F, Ansoleaga B, Garcia-Esparcia P, Zafar S, Grau-Rivera O, Lopez-Gonzalez I, Blanco R, Carmona M, Yague J, Nos C, Del Rio JA, Gelpi E, Zerr I, Ferrer I (2013) PrP mRNA and protein expression in brain and PrP(c) in CSF in Creutzfeldt-Jakob disease MM1 and VV2. Prion 7:383-393.
- Llorens F, Kruse N, Karch A, Schmitz M, Zafar S, Gotzmann N, Sun T, Kochy S, Knipper T, Cramm M, Golanska E, Sikorska B, Liberski PP, Sanchez-Valle R, Fischer A, Mollenhauer B, Zerr I (2017a) Validation of alpha-Synuclein as a CSF Biomarker for Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. Molecular neurobiology.
- Llorens F, Schmitz M, Varges D, Kruse N, Gotzmann N, Gmitterova K, Mollenhauer B, Zerr I (2016) Cerebrospinal alpha-synuclein in alpha-synuclein aggregation disorders: tau/alpha-synuclein ratio as potential biomarker for dementia with Lewy bodies. Journal of neurology 263:2271-2277.

- Llorens F, Zafar S, Ansoleaga B, Shafiq M, Blanco R, Carmona M, Grau-Rivera O, Nos C, Gelpi E, Del Rio JA, Zerr I, Ferrer I (2015) Subtype and regional regulation of prion biomarkers in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Neuropathology and applied neurobiology 41:631-645.
- Llorens F, Zarranz JJ, Fischer A, Zerr I, Ferrer I (2017b) Fatal Familial Insomnia: Clinical Aspects and Molecular Alterations. Current neurology and neuroscience reports 17:30.
- Lofgren K, Cheng F, Fransson LA, Bedecs K, Mani K (2008) Involvement of glypican-1 autoprocessing in scrapie infection. The European journal of neuroscience 28:964-972.
- Loubet D, Dakowski C, Pietri M, Pradines E, Bernard S, Callebert J, Ardila-Osorio H, Mouillet-Richard S, Launay JM, Kellermann O, Schneider B (2012) Neuritogenesis: the prion protein controls beta1 integrin signaling activity. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 26:678-690.
- Lowe J, Blanchard A, Morrell K, Lennox G, Reynolds L, Billett M, Landon M, Mayer RJ (1988) Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle, and mallory bodies in alcoholic liver disease. The Journal of pathology 155:9-15.
- Lu B, Vogel H (2009) Drosophila models of neurodegenerative diseases. Annual review of pathology 4:315-342.
- Luk KC, Covell DJ, Kehm VM, Zhang B, Song IY, Byrne MD, Pitkin RM, Decker SC, Trojanowski JQ, Lee VM (2016) Molecular and Biological Compatibility with Host Alpha-Synuclein Influences Fibril Pathogenicity. Cell reports 16:3373-3387.
- Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VM (2012a) Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. Science 338:949-953.
- Luk KC, Kehm VM, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VM (2012b) Intracerebral inoculation of pathological alpha-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative alpha-synucleinopathy in mice. The Journal of experimental medicine 209:975-986.
- Luk KC, Song C, O'Brien P, Stieber A, Branch JR, Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM (2009) Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106:20051-20056.
- Ma J, Wollmann R, Lindquist S (2002) Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. Science 298:1781-1785.
- Makrinou E, Collinge J, Antoniou M (2002) Genomic characterization of the human prion protein (PrP) gene locus. Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society 13:696-703.
- Mallucci GR, Ratte S, Asante EA, Linehan J, Gowland I, Jefferys JG, Collinge J (2002) Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. The EMBO journal 21:202-210.
- Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J (1994) 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. Molecular neurobiology 8:121-127.
- Mao X, Ou MT, Karuppagounder SS, Kam TI, Yin X, Xiong Y, Ge P, Umanah GE, Brahmachari S, Shin JH, Kang HC, Zhang J, Xu J, Chen R, Park H, Andrabi SA, Kang SU, Goncalves RA, Liang Y, Zhang S, Qi C, Lam S, Keiler JA, Tyson J, Kim D, Panicker N, Yun SP, Workman CJ, Vignali DA, Dawson VL, Ko HS, Dawson TM (2016) Pathological alpha-synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. Science 353.
- Mariani J, Crepel F, Mikoshiba K, Changeux JP, Sotelo C (1977) Anatomical, physiological and biochemical studies of the cerebellum from Reeler mutant mouse. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences 281:1-28.

- Markesbery WR, Jicha GA, Liu H, Schmitt FA (2009) Lewy body pathology in normal elderly subjects. Journal of neuropathology and experimental neurology 68:816-822.
- Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH (1988) Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 8:2804-2815.
- Marti-Masso JF, Ruiz-Martinez J, Bolano MJ, Ruiz I, Gorostidi A, Moreno F, Ferrer I, Lopez de Munain A (2009) Neuropathology of Parkinson's disease with the R1441G mutation in LRRK2. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 24:1998-2001.
- Martin I, Kim JW, Dawson VL, Dawson TM (2014) LRRK2 pathobiology in Parkinson's disease. Journal of neurochemistry 131:554-565.
- Martinez-Vicente M, Vila M (2013) Alpha-synuclein and protein degradation pathways in Parkinson's disease: a pathological feed-back loop. Experimental neurology 247:308-313.
- Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, Sagara Y, Sisk A, Mucke L (2000) Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. Science 287:1265-1269.
- Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Kubo M, Shimozawa A, Akiyama H, Hasegawa M (2014) Pathological alpha-synuclein propagates through neural networks. Acta neuropathologica communications 2:88.
- Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann DM, Hasegawa M (2013) Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. Brain : a journal of neurology 136:1128-1138.
- Matamoros-Angles A, Gayosso LM, Richaud-Patin Y, di Domenico A, Vergara C, Hervera A, Sousa A, Fernandez-Borges N, Consiglio A, Gavin R, Lopez de Maturana R, Ferrer I, Lopez de Munain A, Raya A, Castilla J, Sanchez-Pernaute R, Del Rio JA (2017) iPS Cell Cultures from a Gerstmann-Straussler-Scheinker Patient with the Y218N PRNP Mutation Recapitulate tau Pathology. Molecular neurobiology.
- Mattson MP (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. Nature 430:631-639.
- McLennan NF, Brennan PM, McNeill A, Davies I, Fotheringham A, Rennison KA, Ritchie D, Brannan F, Head MW, Ironside JW, Williams A, Bell JE (2004) Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. The American journal of pathology 165:227-235.
- Mehrpour M, Codogno P (2010) Prion protein: From physiology to cancer biology. Cancer letters 290:1-23.
- Miettinen R, Riedel A, Kalesnykas G, Kettunen HP, Puolivali J, Soininen H, Arendt T (2005) Reelin-immunoreactivity in the hippocampal formation of 9-month-old wildtype mouse: effects of APP/PS1 genotype and ovariectomy. Journal of chemical neuroanatomy 30:105-118.
- Mironov A, Jr., Latawiec D, Wille H, Bouzamondo-Bernstein E, Legname G, Williamson RA, Burton D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Peters PJ (2003) Cytosolic prion protein in neurons. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 23:7183-7193.
- Mishizen-Eberz AJ, Guttmann RP, Giasson BI, Day GA, 3rd, Hodara R, Ischiropoulos H, Lee VM, Trojanowski JQ, Lynch DR (2003) Distinct cleavage patterns of normal and pathologic forms of alpha-synuclein by calpain I in vitro. Journal of neurochemistry 86:836-847.
- Miyashita A, Hatsuta H, Kikuchi M, Nakaya A, Saito Y, Tsukie T, Hara N, Ogishima S, Kitamura N, Akazawa K, Kakita A, Takahashi H, Murayama S, Ihara Y, Ikeuchi T, Kuwano R, Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging I (2014) Genes associated with the progression of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Translational psychiatry 4:e396.

- Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuki K, Sato T, Oya H, Ozawa T, Kagawa Y (1989) Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. Biochemical and biophysical research communications 163:1450-1455.
- Molliver ME, Kostovic I, van der Loos H (1973) The development of synapses in cerebral cortex of the human fetus. Brain research 50:403-407.
- Montagna P, Gambetti P, Cortelli P, Lugaresi E (2003) Familial and sporadic fatal insomnia. The Lancet Neurology 2:167-176.
- Morimura T, Hattori M, Ogawa M, Mikoshiba K (2005) Disabled1 regulates the intracellular trafficking of reelin receptors. The Journal of biological chemistry 280:16901-16908.
- Mouse Genome Sequencing C, Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyras E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigo R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature 420:520-562.
- Moya KL, Sales N, Hassig R, Creminon C, Grassi J, Di Giamberardino L (2000) Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain. Microscopy research and technique 50:58-65.
- Muftuoglu M, Elibol B, Dalmizrak O, Ercan A, Kulaksiz G, Ogus H, Dalkara T, Ozer N (2004) Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 19:544-548.
- Muntane G, Ferrer I, Martinez-Vicente M (2012) alpha-synuclein phosphorylation and truncation are normal events in the adult human brain. Neuroscience 200:106-119.
- Nakamura K, Nemani VM, Azarbal F, Skibinski G, Levy JM, Egami K, Munishkina L, Zhang J, Gardner B, Wakabayashi J, Sesaki H, Cheng Y, Finkbeiner S, Nussbaum RL, Masliah E, Edwards RH (2011) Direct membrane association drives mitochondrial fission by the

Parkinson disease-associated protein alpha-synuclein. The Journal of biological chemistry 286:20710-20726.

- Nakase I, Niwa M, Takeuchi T, Sonomura K, Kawabata N, Koike Y, Takehashi M, Tanaka S, Ueda K, Simpson JC, Jones AT, Sugiura Y, Futaki S (2004) Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 10:1011-1022.
- Nakase I, Tadokoro A, Kawabata N, Takeuchi T, Katoh H, Hiramoto K, Negishi M, Nomizu M, Sugiura Y, Futaki S (2007) Interaction of arginine-rich peptides with membraneassociated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. Biochemistry 46:492-501.
- Nakashima S, Ikuta F (1984) Tyrosine hydroxylase protein in Lewy bodies of parkinsonian and senile brains. Journal of the neurological sciences 66:91-96.
- Naslavsky N, Stein R, Yanai A, Friedlander G, Taraboulos A (1997) Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. The Journal of biological chemistry 272:6324-6331.
- Nemani VM, Lu W, Berge V, Nakamura K, Onoa B, Lee MK, Chaudhry FA, Nicoll RA, Edwards RH (2010) Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. Neuron 65:66-79.
- Newaz K, Sriram K, Bera D (2015) Identification of Major Signaling Pathways in Prion Disease Progression Using Network Analysis. PloS one 10:e0144389.
- Nicolas O, Gavin R, del Rio JA (2009) New insights into cellular prion protein (PrPc) functions: the "ying and yang" of a relevant protein. Brain research reviews 61:170-184.
- Nishikawa K, Li H, Kawamura R, Osaka H, Wang YL, Hara Y, Hirokawa T, Manago Y, Amano T, Noda M, Aoki S, Wada K (2003) Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants. Biochemical and biophysical research communications 304:176-183.
- Niu S, Renfro A, Quattrocchi CC, Sheldon M, D'Arcangelo G (2004) Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway. Neuron 41:71-84.
- Nosjean O, Briolay A, Roux B (1997) Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. Biochimica et biophysica acta 1331:153-186.
- Nussbaum RL, Ellis CE (2003) Alzheimer's disease and Parkinson's disease. The New England journal of medicine 348:1356-1364.
- Nuvolone M, Hermann M, Sorce S, Russo G, Tiberi C, Schwarz P, Minikel E, Sanoudou D, Pelczar P, Aguzzi A (2016) Strictly co-isogenic C57BL/6J-Prnp-/- mice: A rigorous resource for prion science. The Journal of experimental medicine 213:313-327.
- Nuvolone M, Kana V, Hutter G, Sakata D, Mortin-Toth SM, Russo G, Danska JS, Aguzzi A (2013) SIRPalpha polymorphisms, but not the prion protein, control phagocytosis of apoptotic cells. The Journal of experimental medicine 210:2539-2552.
- Nygaard HB, Strittmatter SM (2009) Cellular prion protein mediates the toxicity of betaamyloid oligomers: implications for Alzheimer disease. Archives of neurology 66:1325-1328.
- Ohshima T (2014) Neuronal migration and protein kinases. Frontiers in neuroscience 8:458.
- Padilla D, Beringue V, Espinosa JC, Andreoletti O, Jaumain E, Reine F, Herzog L, Gutierrez-Adan A, Pintado B, Laude H, Torres JM (2011) Sheep and goat BSE propagate more efficiently than cattle BSE in human PrP transgenic mice. PLoS pathogens 7:e1001319.
- Paleologou KE, Oueslati A, Shakked G, Rospigliosi CC, Kim HY, Lamberto GR, Fernandez CO, Schmid A, Chegini F, Gai WP, Chiappe D, Moniatte M, Schneider BL, Aebischer P, Eliezer D, Zweckstetter M, Masliah E, Lashuel HA (2010) Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 30:3184-3198.

- Pamplona R, Naudi A, Gavin R, Pastrana MA, Sajnani G, Ilieva EV, Del Rio JA, Portero-Otin M, Ferrer I, Requena JR (2008) Increased oxidation, glycoxidation, and lipoxidation of brain proteins in prion disease. Free radical biology & medicine 45:1159-1166.
- Pan WX, Mao T, Dudman JT (2010) Inputs to the dorsal striatum of the mouse reflect the parallel circuit architecture of the forebrain. Frontiers in neuroanatomy 4:147.
- Pappolla MA (1986) Lewy bodies of Parkinson's disease. Immune electron microscopic demonstration of neurofilament antigens in constituent filaments. Archives of pathology & laboratory medicine 110:1160-1163.
- Pappolla MA, Shank DL, Alzofon J, Dudley AW (1988) Colloid (hyaline) inclusion bodies in the central nervous system: their presence in the substantia nigra is diagnostic of Parkinson's disease. Human pathology 19:27-31.
- Parisiadou L, Efthimiopoulos S (2007) Expression of mDab1 promotes the stability and processing of amyloid precursor protein and this effect is counteracted by X11alpha. Neurobiology of aging 28:377-388.
- Parker WD, Jr., Boyson SJ, Parks JK (1989) Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. Annals of neurology 26:719-723.
- Parkin ET, Watt NT, Hussain I, Eckman EA, Eckman CB, Manson JC, Baybutt HN, Turner AJ, Hooper NM (2007) Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104:11062-11067.
- Parkinson J (2002) An essay on the shaking palsy. 1817. The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences 14:223-236; discussion 222.
- Paumier KL, Luk KC, Manfredsson FP, Kanaan NM, Lipton JW, Collier TJ, Steece-Collier K, Kemp CJ, Celano S, Schulz E, Sandoval IM, Fleming S, Dirr E, Polinski NK, Trojanowski JQ, Lee VM, Sortwell CE (2015) Intrastriatal injection of pre-formed mouse alpha-synuclein fibrils into rats triggers alpha-synuclein pathology and bilateral nigrostriatal degeneration. Neurobiology of disease 82:185-199.
- Peelaerts W, Bousset L, Van der Perren A, Moskalyuk A, Pulizzi R, Giugliano M, Van den Haute C, Melki R, Baekelandt V (2015) alpha-Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. Nature 522:340-344.
- Peng X, Tehranian R, Dietrich P, Stefanis L, Perez RG (2005) Alpha-synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. Journal of cell science 118:3523-3530.
- Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, Mehlhorn IR, Legname G, Wormald MR, Rudd PM, Dwek RA, Burton DR, Prusiner SB (2001) Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. Nature 412:739-743.
- Periquet M, Fulga T, Myllykangas L, Schlossmacher MG, Feany MB (2007) Aggregated alphasynuclein mediates dopaminergic neurotoxicity in vivo. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 27:3338-3346.
- Pietri M, Caprini A, Mouillet-Richard S, Pradines E, Ermonval M, Grassi J, Kellermann O, Schneider B (2006) Overstimulation of PrPC signaling pathways by prion peptide 106-126 causes oxidative injury of bioaminergic neuronal cells. The Journal of biological chemistry 281:28470-28479.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science 276:2045-2047.
- Porto-Carreiro I, Fevrier B, Paquet S, Vilette D, Raposo G (2005) Prions and exosomes: from PrPc trafficking to PrPsc propagation. Blood cells, molecules & diseases 35:143-148.

Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science 216:136-144.

Prusiner SB (1991) Molecular biology of prion diseases. Science 252:1515-1522.

- Puschmann A, Ross OA, Vilarino-Guell C, Lincoln SJ, Kachergus JM, Cobb SA, Lindquist SG, Nielsen JE, Wszolek ZK, Farrer M, Widner H, van Westen D, Hagerstrom D, Markopoulou K, Chase BA, Nilsson K, Reimer J, Nilsson C (2009) A Swedish family with de novo alpha-synuclein A53T mutation: evidence for early cortical dysfunction. Parkinsonism & related disorders 15:627-632.
- Qiu S, Zhao LF, Korwek KM, Weeber EJ (2006) Differential reelin-induced enhancement of NMDA and AMPA receptor activity in the adult hippocampus. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 26:12943-12955.
- Radford HE, Mallucci GR (2010) The role of GPI-anchored PrP C in mediating the neurotoxic effect of scrapie prions in neurons. Current issues in molecular biology 12:119-127.
- Rakic P (1976) Prenatal genesis of connections subserving ocular dominance in the rhesus monkey. Nature 261:467-471.
- Rakic P, Caviness VS, Jr. (1995) Cortical development: view from neurological mutants two decades later. Neuron 14:1101-1104.
- Rangel A, Burgaya F, Gavin R, Soriano E, Aguzzi A, Del Rio JA (2007) Enhanced susceptibility of Prnp-deficient mice to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death: Role of AMPA/kainate receptors. Journal of neuroscience research 85:2741-2755.
- Rangel A, Madronal N, Gruart A, Gavin R, Llorens F, Sumoy L, Torres JM, Delgado-Garcia JM, Del Rio JA (2009) Regulation of GABA(A) and glutamate receptor expression, synaptic facilitation and long-term potentiation in the hippocampus of prion mutant mice. PloS one 4:e7592.
- Recasens A, Dehay B, Bove J, Carballo-Carbajal I, Dovero S, Perez-Villalba A, Fernagut PO, Blesa J, Parent A, Perier C, Farinas I, Obeso JA, Bezard E, Vila M (2014) Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. Annals of neurology 75:351-362.
- Reimao S, Pita Lobo P, Neutel D, Guedes LC, Coelho M, Rosa MM, Ferreira J, Abreu D, Goncalves N, Morgado C, Nunes RG, Campos J, Ferreira JJ (2015) Quantitative Analysis Versus Visual Assessment of Neuromelanin MR Imaging for the Diagnosis of Parkinson's disease. Journal of Parkinson's disease 5:561-567.
- Resenberger UK, Harmeier A, Woerner AC, Goodman JL, Muller V, Krishnan R, Vabulas RM, Kretzschmar HA, Lindquist S, Hartl FU, Multhaup G, Winklhofer KF, Tatzelt J (2011) The cellular prion protein mediates neurotoxic signalling of beta-sheet-rich conformers independent of prion replication. The EMBO journal 30:2057-2070.
- Rey NL, George S, Steiner JA, Madaj Z, Luk KC, Trojanowski JQ, Lee VM, Brundin P (2018) Spread of aggregates after olfactory bulb injection of alpha-synuclein fibrils is associated with early neuronal loss and is reduced long term. Acta neuropathologica 135:65-83.
- Rey NL, Petit GH, Bousset L, Melki R, Brundin P (2013) Transfer of human alpha-synuclein from the olfactory bulb to interconnected brain regions in mice. Acta neuropathologica 126:555-573.
- Reyes JF, Olsson TT, Lamberts JT, Devine MJ, Kunath T, Brundin P (2015) A cell culture model for monitoring alpha-synuclein cell-to-cell transfer. Neurobiology of disease 77:266-275.
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wuthrich K (1997) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). FEBS letters 413:282-288.
- Rospigliosi CC, McClendon S, Schmid AW, Ramlall TF, Barre P, Lashuel HA, Eliezer D (2009) E46K Parkinson's-linked mutation enhances C-terminal-to-N-terminal contacts in alpha-synuclein. Journal of molecular biology 388:1022-1032.

- Roucou X, Giannopoulos PN, Zhang Y, Jodoin J, Goodyer CG, LeBlanc A (2005) Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells. Cell death and differentiation 12:783-795.
- Ruiz-Martinez J, Gorostidi A, Ibanez B, Alzualde A, Otaegui D, Moreno F, Lopez de Munain A, Bergareche A, Gomez-Esteban JC, Marti Masso JF (2010) Penetrance in Parkinson's disease related to the LRRK2 R1441G mutation in the Basque country (Spain). Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 25:2340-2345.
- Sabate R, Espargaro A, Grana-Montes R, Reverter D, Ventura S (2012) Native structure protects SUMO proteins from aggregation into amyloid fibrils. Biomacromolecules 13:1916-1926.
- Saeed U, Compagnone J, Aviv RI, Strafella AP, Black SE, Lang AE, Masellis M (2017) Imaging biomarkers in Parkinson's disease and Parkinsonian syndromes: current and emerging concepts. Translational neurodegeneration 6:8.
- Saez-Valero J, Costell M, Sjogren M, Andreasen N, Blennow K, Luque JM (2003) Altered levels of cerebrospinal fluid reelin in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. Journal of neuroscience research 72:132-136.
- Saint-Cricq M, Carrete J, Gaboriaud C, Gravel E, Doris E, Thielens N, Mingo N, Ling WL (2017) Human Immune Protein C1q Selectively Disaggregates Carbon Nanotubes. Nano letters 17:3409-3415.
- Sakaguchi S (2007) [Physiological functions of prion protein and its roles in the pathogenesis of prion diseases]. Seikagaku The Journal of Japanese Biochemical Society 79:843-852.
- Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, Nakatani A, Kataoka Y, Houtani T, Shirabe S, Okada H, Hasegawa S, Miyamoto T, Noda T (1996) Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. Nature 380:528-531.
- Sakudo A, Lee DC, Saeki K, Nakamura Y, Inoue K, Matsumoto Y, Itohara S, Onodera T (2003) Impairment of superoxide dismutase activation by N-terminally truncated prion protein (PrP) in PrP-deficient neuronal cell line. Biochemical and biophysical research communications 308:660-667.
- Sarnataro D, Pepe A, Zurzolo C (2017) Cell Biology of Prion Protein. Progress in molecular biology and translational science 150:57-82.
- Satheeshkumar KS, Murali J, Jayakumar R (2004) Assemblages of prion fragments: novel model systems for understanding amyloid toxicity. Journal of structural biology 148:176-193.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD (1989) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. Lancet 1:1269.
- Schmitz M, Ebert E, Stoeck K, Karch A, Collins S, Calero M, Sklaviadis T, Laplanche JL, Golanska E, Baldeiras I, Satoh K, Sanchez-Valle R, Ladogana A, Skinningsrud A, Hammarin AL, Mitrova E, Llorens F, Kim YS, Green A, Zerr I (2016) Validation of 14-3-3 Protein as a Marker in Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Diagnostic. Molecular neurobiology 53:2189-2199.
- Schneider B, Mutel V, Pietri M, Ermonval M, Mouillet-Richard S, Kellermann O (2003) NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and nonneuronal cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100:13326-13331.
- Scott-McKean JJ, Surewicz K, Choi JK, Ruffin VA, Salameh AI, Nieznanski K, Costa ACS, Surewicz WK (2016) Soluble prion protein and its N-terminal fragment prevent impairment of synaptic plasticity by Abeta oligomers: Implications for novel therapeutic strategy in Alzheimer's disease. Neurobiology of disease 91:124-131.
- Seripa D, Matera MG, Franceschi M, Daniele A, Bizzarro A, Rinaldi M, Panza F, Fazio VM, Gravina C, D'Onofrio G, Solfrizzi V, Masullo C, Pilotto A (2008) The RELN locus in Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's disease : JAD 14:335-344.

- Sevlever D, Jiang P, Yen SH (2008) Cathepsin D is the main lysosomal enzyme involved in the degradation of alpha-synuclein and generation of its carboxy-terminally truncated species. Biochemistry 47:9678-9687.
- Shi M, Bradner J, Hancock AM, Chung KA, Quinn JF, Peskind ER, Galasko D, Jankovic J, Zabetian CP, Kim HM, Leverenz JB, Montine TJ, Ginghina C, Kang UJ, Cain KC, Wang Y, Aasly J, Goldstein D, Zhang J (2011) Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson disease diagnosis and progression. Annals of neurology 69:570-580.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. Nature genetics 25:302-305.
- Shmerling D, Hegyi I, Fischer M, Blattler T, Brandner S, Gotz J, Rulicke T, Flechsig E, Cozzio A, von Mering C, Hangartner C, Aguzzi A, Weissmann C (1998) Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. Cell 93:203-214.
- Shrivastava AN, Redeker V, Fritz N, Pieri L, Almeida LG, Spolidoro M, Liebmann T, Bousset L, Renner M, Lena C, Aperia A, Melki R, Triller A (2015) alpha-synuclein assemblies sequester neuronal alpha3-Na+/K+-ATPase and impair Na+ gradient. The EMBO journal 34:2408-2423.
- Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, Ding DC, Li KW, Chen SF, Yang HI, Li H (2005) Overexpression of PrPC by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 25:8967-8977.
- Sikorska B, Knight R, Ironside JW, Liberski PP (2012) Creutzfeldt-Jakob disease. Advances in experimental medicine and biology 724:76-90.
- Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, Caughey B (2005) The most infectious prion protein particles. Nature 437:257-261.
- Simon D, Herva ME, Benitez MJ, Garrido JJ, Rojo AI, Cuadrado A, Torres JM, Wandosell F (2014) Dysfunction of the PI3K-Akt-GSK-3 pathway is a common feature in cell culture and in vivo models of prion disease. Neuropathology and applied neurobiology 40:311-326.
- Sinagra M, Verrier D, Frankova D, Korwek KM, Blahos J, Weeber EJ, Manzoni OJ, Chavis P (2005) Reelin, very-low-density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor 2 control somatic NMDA receptor composition during hippocampal maturation in vitro. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 25:6127-6136.
- Smith AD, Bolam JP (1990) The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. Trends in neurosciences 13:259-265.
- Solforosi L, Criado JR, McGavern DB, Wirz S, Sanchez-Alavez M, Sugama S, DeGiorgio LA, Volpe BT, Wiseman E, Abalos G, Masliah E, Gilden D, Oldstone MB, Conti B, Williamson RA (2004) Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. Science 303:1514-1516.
- Son JH, Shim JH, Kim KH, Ha JY, Han JY (2012) Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. Experimental & molecular medicine 44:89-98.
- Soto C, Satani N (2011) The intricate mechanisms of neurodegeneration in prion diseases. Trends in molecular medicine 17:14-24.
- Spencer MD, Knight RS, Will RG (2002) First hundred cases of variant Creutzfeldt-Jakob disease: retrospective case note review of early psychiatric and neurological features. Bmj 324:1479-1482.
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Cairns NJ, Lantos PL, Goedert M (1998a) Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. Neuroscience letters 251:205-208.
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998b) alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with

lewy bodies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95:6469-6473.

- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alphasynuclein in Lewy bodies. Nature 388:839-840.
- Spudich A, Frigg R, Kilic E, Kilic U, Oesch B, Raeber A, Bassetti CL, Hermann DM (2005) Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1. Neurobiology of disease 20:442-449.
- Steele AD, Emsley JG, Ozdinler PH, Lindquist S, Macklis JD (2006) Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103:3416-3421.
- Steele AD, Lindquist S, Aguzzi A (2007) The prion protein knockout mouse: a phenotype under challenge. Prion 1:83-93.
- Stranahan AM, Haberman RP, Gallagher M (2011a) Cognitive decline is associated with reduced reelin expression in the entorhinal cortex of aged rats. Cerebral cortex 21:392-400.
- Stranahan AM, Salas-Vega S, Jiam NT, Gallagher M (2011b) Interference with reelin signaling in the lateral entorhinal cortex impairs spatial memory. Neurobiology of learning and memory 96:150-155.
- Sulzer D, Surmeier DJ (2013) Neuronal vulnerability, pathogenesis, and Parkinson's disease. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 28:41-50.
- Sung JY, Kim J, Paik SR, Park JH, Ahn YS, Chung KC (2001) Induction of neuronal cell death by Rab5A-dependent endocytosis of alpha-synuclein. The Journal of biological chemistry 276:27441-27448.
- Sung JY, Park SM, Lee CH, Um JW, Lee HJ, Kim J, Oh YJ, Lee ST, Paik SR, Chung KC (2005) Proteolytic cleavage of extracellular secreted {alpha}-synuclein via matrix metalloproteinases. The Journal of biological chemistry 280:25216-25224.
- Sunyach C, Checler F (2005) Combined pharmacological, mutational and cell biology approaches indicate that p53-dependent caspase 3 activation triggered by cellular prion is dependent on its endocytosis. Journal of neurochemistry 92:1399-1407.
- Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. The EMBO journal 22:3591-3601.
- Taipa R, Pinho J, Melo-Pires M (2012) Clinico-pathological correlations of the most common neurodegenerative dementias. Frontiers in neurology 3:68.
- Tapias V, Hu X, Luk KC, Sanders LH, Lee VM, Greenamyre JT (2017) Synthetic alpha-synuclein fibrils cause mitochondrial impairment and selective dopamine neurodegeneration in part via iNOS-mediated nitric oxide production. Cellular and molecular life sciences : CMLS 74:2851-2874.
- Taylor AM, Blurton-Jones M, Rhee SW, Cribbs DH, Cotman CW, Jeon NL (2005a) A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. Nature methods 2:599-605.
- Taylor DR, Hooper NM (2007) The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates the endocytosis of the cellular prion protein. The Biochemical journal 402:17-23.
- Taylor DR, Watt NT, Perera WS, Hooper NM (2005b) Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrindependent endocytosis. Journal of cell science 118:5141-5153.
- Telese F, Ma Q, Perez PM, Notani D, Oh S, Li W, Comoletti D, Ohgi KA, Taylor H, Rosenfeld MG (2015) LRP8-Reelin-Regulated Neuronal Enhancer Signature Underlying Learning and Memory Formation. Neuron 86:696-710.

- Thayanidhi N, Helm JR, Nycz DC, Bentley M, Liang Y, Hay JC (2010) Alpha-synuclein delays endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport in mammalian cells by antagonizing ER/Golgi SNAREs. Molecular biology of the cell 21:1850-1863.
- Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. Nature 380:639-642.
- Tofaris GK, Kim HT, Hourez R, Jung JW, Kim KP, Goldberg AL (2011) Ubiquitin ligase Nedd4 promotes alpha-synuclein degradation by the endosomal-lysosomal pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108:17004-17009.
- Tolosa E, Gaig C, Santamaria J, Compta Y (2009) Diagnosis and the premotor phase of Parkinson disease. Neurology 72:S12-20.
- Tolosa E, Poewe W (2009) Premotor Parkinson disease. Neurology 72:S1.
- Tomlinson CL, Stowe R, Patel S, Rick C, Gray R, Clarke CE (2010) Systematic review of levodopa dose equivalency reporting in Parkinson's disease. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 25:2649-2653.
- Tran HT, Chung CH, Iba M, Zhang B, Trojanowski JQ, Luk KC, Lee VM (2014) Alpha-synuclein immunotherapy blocks uptake and templated propagation of misfolded alpha-synuclein and neurodegeneration. Cell reports 7:2054-2065.
- Trommsdorff M, Borg JP, Margolis B, Herz J (1998) Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. The Journal of biological chemistry 273:33556-33560.
- Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J (1999) Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. Cell 97:689-701.
- Trotter J, Lee GH, Kazdoba TM, Crowell B, Domogauer J, Mahoney HM, Franco SJ, Muller U, Weeber EJ, D'Arcangelo G (2013) Dab1 is required for synaptic plasticity and associative learning. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 33:15652-15668.
- Turnbaugh JA, Westergard L, Unterberger U, Biasini E, Harris DA (2011) The N-terminal, polybasic region is critical for prion protein neuroprotective activity. PloS one 6:e25675.
- Udenfriend S, Kodukula K (1995) How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. Annual review of biochemistry 64:563-591.
- Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T (1993) Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90:11282-11286.
- Ulmer TS, Bax A, Cole NB, Nussbaum RL (2005) Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein. The Journal of biological chemistry 280:9595-9603.
- Urrea L, Ferrer I, Gavin R, Del Rio JA (2017) The cellular prion protein (PrPC) as neuronal receptor for alpha-synuclein. Prion 11:226-233.
- Valldeoriola F, Pilleri M, Tolosa E, Molinuevo JL, Rumia J, Ferrer E (2002) Bilateral subthalamic stimulation monotherapy in advanced Parkinson's disease: long-term follow-up of patients. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 17:125-132.
- Vassallo N, Herms J (2003) Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. Journal of neurochemistry 86:538-544.
- Velayos JL, Irujo A, Cuadrado-Tejedor M, Paternain B, Moleres FJ, Ferrer V (2009) The cellular prion protein and its role in Alzheimer disease. Prion 3:110-117.
- Vergara C, Ordonez-Gutierrez L, Wandosell F, Ferrer I, del Rio JA, Gavin R (2015) Role of PrP(C) Expression in Tau Protein Levels and Phosphorylation in Alzheimer's Disease Evolution. Molecular neurobiology 51:1206-1220.
- Vila M, Przedborski S (2003) Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. Nature reviews Neuroscience 4:365-375.
- Vilches S, Vergara C, Nicolas O, Mata A, Del Rio JA, Gavin R (2016) Domain-Specific Activation of Death-Associated Intracellular Signalling Cascades by the Cellular Prion Protein in Neuroblastoma Cells. Molecular neurobiology 53:4438-4448.
- Viles JH, Cohen FE, Prusiner SB, Goodin DB, Wright PE, Dyson HJ (1999) Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96:2042-2047.
- Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L (2008) Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. The Journal of biological chemistry 283:23542-23556.
- Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Lee VM (2014) Addition of exogenous alpha-synuclein preformed fibrils to primary neuronal cultures to seed recruitment of endogenous alpha-synuclein to Lewy body and Lewy neurite-like aggregates. Nature protocols 9:2135-2146.
- Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Patel TP, Tanik SA, Riddle DM, Stieber A, Meaney DF, Trojanowski JQ, Lee VM (2011) Exogenous alpha-synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. Neuron 72:57-71.
- Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF (2004) Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. Nature medicine 10:310-315.
- Watt NT, Hooper NM (2005) Reactive oxygen species (ROS)-mediated beta-cleavage of the prion protein in the mechanism of the cellular response to oxidative stress. Biochemical Society transactions 33:1123-1125.
- Watts JC, Drisaldi B, Ng V, Yang J, Strome B, Horne P, Sy MS, Yoong L, Young R, Mastrangelo P, Bergeron C, Fraser PE, Carlson GA, Mount HT, Schmitt-Ulms G, Westaway D (2007) The CNS glycoprotein Shadoo has PrP(C)-like protective properties and displays reduced levels in prion infections. The EMBO journal 26:4038-4050.
- Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC (2003) Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. The Journal of biological chemistry 278:25009-25013.
- Weeber EJ, Beffert U, Jones C, Christian JM, Forster E, Sweatt JD, Herz J (2002) Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. The Journal of biological chemistry 277:39944-39952.
- Weise J, Sandau R, Schwarting S, Crome O, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Bahr M (2006) Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. Stroke 37:1296-1300.
- Weissmann C, Aguzzi A (1999) Perspectives: neurobiology. PrP's double causes trouble. Science 286:914-915.
- Weissmann C, Bueler H, Fischer M, Sailer A, Aguzzi A, Aguet M (1994) PrP-deficient mice are resistant to scrapie. Annals of the New York Academy of Sciences 724:235-240.
- Weissmann C, Flechsig E (2003) PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. British medical bulletin 66:43-60.
- Wentzell J, Kretzschmar D (2010) Alzheimer's disease and tauopathy studies in flies and worms. Neurobiology of disease 40:21-28.
- West AB (2017) Achieving neuroprotection with LRRK2 kinase inhibitors in Parkinson disease. Experimental neurology.
- Westaway D, DeArmond SJ, Cayetano-Canlas J, Groth D, Foster D, Yang SL, Torchia M, Carlson GA, Prusiner SB (1994) Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the

central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. Cell 76:117-129.

- Westaway D, Jhamandas JH (2012) The P's and Q's of cellular PrP-Abeta interactions. Prion 6:359-363.
- Whitehouse IJ, Miners JS, Glennon EB, Kehoe PG, Love S, Kellett KA, Hooper NM (2013) Prion protein is decreased in Alzheimer's brain and inversely correlates with BACE1 activity, amyloid-beta levels and Braak stage. PloS one 8:e59554.
- Wilson DA, Nixon RA (2009) Sniffing out a function for prion proteins. Nature neuroscience 12:7-8.
- Wulf MA, Senatore A, Aguzzi A (2017) The biological function of the cellular prion protein: an update. BMC biology 15:34.
- Xilouri M, Brekk OR, Stefanis L (2013) alpha-Synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. Molecular neurobiology 47:537-551.
- Xu CY, Kang WY, Chen YM, Jiang TF, Zhang J, Zhang LN, Ding JQ, Liu J, Chen SD (2017) DJ-1 Inhibits alpha-Synuclein Aggregation by Regulating Chaperone-Mediated Autophagy. Frontiers in aging neuroscience 9:308.
- Yahr MD, Duvoisin RC, Schear MJ, Barrett RE, Hoehn MM (1969) Treatment of parkinsonism with levodopa. Archives of neurology 21:343-354.
- Yin S, Yu S, Li C, Wong P, Chang B, Xiao F, Kang SC, Yan H, Xiao G, Grassi J, Tien P, Sy MS (2006) Prion proteins with insertion mutations have altered N-terminal conformation and increased ligand binding activity and are more susceptible to oxidative attack. The Journal of biological chemistry 281:10698-10705.
- Yonetani M, Nonaka T, Masuda M, Inukai Y, Oikawa T, Hisanaga S, Hasegawa M (2009) Conversion of wild-type alpha-synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant. The Journal of biological chemistry 284:7940-7950.
- Younan ND, Sarell CJ, Davies P, Brown DR, Viles JH (2013) The cellular prion protein traps Alzheimer's Abeta in an oligomeric form and disassembles amyloid fibers. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 27:1847-1858.
- Yu NN, Tan MS, Yu JT, Xie AM, Tan L (2016) The Role of Reelin Signaling in Alzheimer's Disease. Molecular neurobiology 53:5692-5700.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Munoz DG, de Yebenes JG (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. Annals of neurology 55:164-173.
- Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, Wilson B, Zhang W, Zhou Y, Hong JS, Zhang J (2005) Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 19:533-542.
- Zhang WJ, Shang XL, Peng J, Zhou MH, Sun WJ (2017) Expression of prion protein in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease complicated with rapid eye movement sleep behavior disorder. Genetics and molecular research : GMR 16.
- Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keeffe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA, Wu JQ (2014) An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 34:11929-11947.
- Zhu C, Schwarz P, Abakumova I, Aguzzi A (2015a) Unaltered Prion Pathogenesis in a Mouse Model of High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance. PloS one 10:e0144983.
- Zhu S, Victoria GS, Marzo L, Ghosh R, Zurzolo C (2015b) Prion aggregates transfer through tunneling nanotubes in endocytic vesicles. Prion 9:125-135.

ANEXO I

INFORME DEL FACTOR DE IMPACTO

Por la presente, hago constar el *Factor de Impacto* correspondiente a la revista donde se han publicado los artículos científicos que conforman la Tesis Doctoral presentada por Laura Urrea Zazurca.

• Molecular Neurobiology: 6.190

Dr. José Antonio del Río Fernández

Director y tutor de Tesis

Catedrático en Biología Celular de la Universidad de Barcelona

ANEXO II

INFORME DE PARTICIPACIÓN

El Dr. José Antonio del Río Fernández, director y tutor de la Tesis doctoral "Funciones de la proteína priónica celular, α -sinucleína y reelina en enfermedades neurodegenerativas", realizada por la doctoranda Laura Urrea Zazurca, informa que la participación de la doctoranda en los artículos científicos que conforman la presente tesis ha sido la siguiente:

En el artículo "Involvement of Cellular Prion Protein in α -Synuclein Transport in Neurons", publicado en la revista *Molecular Neurobiology*, la doctoranda ha participado en el diseño de los experimentos y es la principal responsable del desarrollo de los mismos.

En el artículo "Reelin Expression in Creutzfeldt-Jakob Disease and Experimental Models of Transmissible Spongiform Encephalopathies", publicado en la revista *Molecular Neurobiology*, la doctoranda ha participado como co-autora principal en el diseño experimental y el desarrollo de los mismos.

Por último hago constar que ninguno de estos artículos ha sido utilizado en la elaboración de otras tesis doctorales.

Dr. José Antonio del Río Fernández

Director y tutor de Tesis

Catedrático en Biología Celular de la Universidad de Barcelona

ANEXO III

Extra View – The cellular prion protein (PrP^c) as neuronal receptor for α-synuclein

| prion | Image: state sta | Taylor & Francis Taylor & Taxor Grag |
|-------|--|---|
| | The cellular prion protein (PrP ^C) as neuronal | |
| | receptor for α-synuclein | |
| | Laura Urrea, Isidro Ferrer, Rosalina Gavín & José Antonio del Río | |
| | To cite this article: Laura Urrea, Isidro Ferrer, Rosalina Gavín & José Antonio del Río (2017): The cellular prion protein (PrP ^C) as neuronal receptor for α-synuclein, Prion, DOI: <u>10.1080/19336896.2017.1334748</u> | |
| | 10 mix to this article. http://dx.doi.org/10.1060/19550690.2017.1554746 | |
| | Accepted author version posted online: 31 Jul 2017. Published online: 31 Jul 2017. | |
| | Submit your article to this journal 🖉 | |
| | View related articles | |
| | Constant View Crossmark data 🗗 | |
| | | |

Full Terms & Conditions of access and use can be found at http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kprn20

Download by: [University of Saskatchewan Library]

Date: 01 August 2017, At: 19:59

Prion, 0:1–8, 2017 © 2017 Taylor & Francis ISSN: 1933-68961933-690X online DOI: 10.1080/19336896.2017.1334748

Check for updates

EXTRA VIEW

The cellular prion protein (PrP^C) as neuronal receptor for α -synuclein

Laura Urrea^{a,b,c,d}, Isidro Ferrer^{d,e,f,g}, Rosalina Gavín^{a,b,c,d}, and José Antonio del Río^{a,b,c,d}

^aMolecular and Cellular Neurobiotechnology, Institute of Bioengineering of Catalonia (IBEC), Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain;

^bDepartment of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Barcelona, Barcelona, Spain;

^cCenter for Networked Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Barcelona, Spain;

^dInstitute of Neuroscience, University of Barcelona, Barcelona, Spain;

^eDepartment of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona, Barcelona, Spain;

^fSenior Consultant Neuropathology, Service of Pathology, Bellvitge University Hospital, Hospitalet de Llobregat, Spain;

^gCenter for Networked Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Hospitalet de Llobregat, Spain

ABSTRACT. The term 'prion-like' is used to define some misfolded protein species that propagate intercellularly, triggering protein aggregation in recipient cells. For cell binding, both direct plasma membrane interaction and membrane receptors have been described for particular amyloids. In this respect, emerging evidence demonstrates that several β -sheet enriched proteins can bind to the cellular prion protein (PrP^C). Among other interactions, the physiological relevance of the binding between β -amyloid and PrP^C has been a relevant focus of numerous studies. At the molecular level, published data point to the second charged cluster domain of the PrP^C molecule as the relevant

1

Correspondence to: Laura Urrea; Molecular and Cellular Neurobiotechnology, Institute of Bioengineer-ing of Catalonia (IBEC), Parc Científic de Barcelona, Baldiri Reixac 15–21, E-08028 Barcelona, Spain; Email: lurrea@ibecbarcelona.eu; José Antonio del Río, Molecular and Cellular Neurobiotechnology, Insti-tute of Bioengineering of Catalonia (IBEC), Parc Científic de Barcelona, Baldiri Reixac 15–21, E-08028 Barcelona, Spain; Email: jadelrio@ibecbarcelona.eu Received May 1, 2017; Revised May 19, 2017; Accepted May 19, 2017.

L. Urrea et al.

2

binding domain of the β -amyloid/PrP^C interaction. In addition to β -amyloid, participation of PrP^C in binding α -synuclein, responsible for neurodegenerative synucleopathies, has been reported. Although results indicate relevant participation of PrP^C in the spreading of α -synuclein in living mice, the physiological relevance of the interaction remains elusive. In this comment, we focus our attention on summarizing current knowledge of PrP^C as a receptor for amyloid proteins and its physiological significance, with particular focus on α -synuclein.

KEYWORDS. α -synuclein, charged cluster domain, interneuronal transport, LAG3, neurodegeneration, PrP^C, Parkinson disease

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease worldwide. Motor disabilities, globally called parkinsonism, are characteristic of the disorder; these may be preceeded by neurovegetative symptoms, sleep disorders, and loss of olfaction; neurocognitive deficits may also appear with disease progression leading to dementia (i.e., Parkinson disease dementia, PDD). Histologically, PD is characterized by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta, which is causative of parkinsonism, and the presence of intraneuronal insoluble inclusions called Lewy Bodies (LB) and Lewy Neurites (LN) in several brain regions.¹ LB/LN aggregates contain various misfolded proteins such us ubiquitin,² tau,³ and lipids⁴ but their major component is hyperphosphorylated α -synu-Abnormal *a*-synuclein aggregates clein.5 appear, in addition to PD, in various α -synucleinopathies such as Dementia with Lewy Bodies (DLB) and multiple system atrophy (MSA).⁶ In these disorders, aggregates are deposited in the brain in a filamentous form displaying a β -sheet structure⁷ which is abnormally phosphorylated at Serine129 and is also ubiquitinated.⁸ In addition, PDD, and particularly, DLB post-mortem brains often display accumulations of β -amyloid forming diffuse and neuritic plaques, and neurofibrillary tangles composed of abnormally hyperphosphorylated tau. In addition, the potential contribution of a-synuclein to Alzheimer disease (AD) pathology is considered important today, with $\approx 40\%$ of AD cases presenting LB/LN, often as amygdala-predominant Lewy body disease (LBD).

'PRION-LIKE' PROTEINS AND NEURONAL SPREADING

Most of the above-mentioned misfolded proteins (i.e., β -amyloid, hyperphosphorylated tau, and abnormal α -synuclein) are able to 'propagate' or 'spread' between cells in the same manner as infectious prions, a mechanism termed 'prion-like', 'prionoid', or simply 'prions' in several studies.^{10,11} However, not all the molecular properties of infective prions observed in transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) have been demonstrated in these proteinaceous species.¹¹ The infectious spreading of pathogenic prions occurs between cells, tissues and, more relevantly, organisms. This is not described for all 'prion-like' molecules. As recently indicated by Harbi and Harrison in Prion,¹² 'prion-like activity' or 'prion-like propagation' may also refer to selfpropagating protein aggregates that may not yet meet a stricter 'prion' definition. The term prion-like' for the 'propagative' activities of the misfolded proteins will be used in the present article. Moreover, in our review misfolded a-synuclein protein becomes a 'prion-like' protein.

Although there is some disagreement, it is well established that the disease progression of some neurodegenerative disorders, such as AD and PD, seems to correlate with brain propagation of the misfolded protein between predictable anatomical pathways.¹³⁻¹⁷ In PD and DLB, the sequential accumulation of α -synuclein starts in the olfactory bulb, medulla oblongata, midbrain and forebrain, and neocorrex.¹⁸ Indeed, the spreading of pathological α -synuclein is closely correlated with disease

PRP^C AND *a*-SYNUCLEIN SPREADING

progression and is considered to be the underlying mechanism of progression of the disease.¹⁹

Extensive research has demonstrated that spreading of a-synuclein can also be reproduced in vivo and in vitro. In vivo, peripheral (i.e,²⁰) or intracerebral injections of recombinant a-synuclein protofibrils or insoluble fractions of α -synuclein derived from affected brains trigger conversion of natural endogenous α -synuclein into the abnormal misfolded form, and this misfolded α -synuclein propagates in the brains of wild-type mice,^{6,21} α -synuclein transgenic mice,^{22,23} monkeys,²⁴ and marmo-In vitro experiments, and more sets. relevantly, the emerging development of 'labon-a-chip' device cultures based on microfluidics, have been of great value in helping to determine the cell-to-cell transport of several ²⁶⁻²⁹). amyloids including α -synuclein (i.e.,²⁶⁻²⁹). Thus, recombinant α -synuclein fibrils^{27,28} as well as LB extracts²⁶ can spread between neurons and astroglial cells growing in these devices.²⁶ Several mechanisms have been reported for α -synuclein spreading using these or other *in vitro* methods, such as extracellular vesicles and tunneling nanotubes (TNTs).^{13,30-35} In addition to these descriptions, several groups have started to measure the presence of membrane receptors for α -synuclein and/or other amyloids.

A CHARGED DOMAIN OF PRP^C IS A COMMON 'DOCKING-DOMAIN' FOR SEVERAL 'PRION-LIKE' PROTEINACEOUS SPECIES

Several studies have reported that β -sheet rich amyloid proteins (including α -synuclein) can interact with plasma membrane (e.g.,³⁶). Although this interaction might be involved in amyloid internalization leading to cytotoxicity, 'docking' and receptor-mediated interaction activities at plasma membrane might support most of the physiological activities of oligomeric proteinaceous species.³⁷ PrP^C can bind with numerous membrane-associated molecules including adhesion molecules, growthfactor receptors, and neurotransmitter receptors, among others. More relevantly, PrP^C has been described as a high-affinity binding partner of oligomeric β -amyloid (A β o)—a relevant finding in determining the early trigger in AD.³⁸⁻⁴³ However, this interaction (A β o-PrP^C) is not exclusive since other studies have determined that the N-terminal domain of PrP^C can bind to several β -rich peptides, including $A\beta$.^{44,45} Indeed, mapping studies point to the \approx 90-110 amino acids located in the second charged cluster of PrP^{C} as the main residues responsible for $A\beta$ binding^{40,46} (see⁴⁷ for a recent description of PrP^{C} domains). Although interaction between PrP^{C} and $A\beta o$ has been demonstrated in several studies,³⁸⁻⁴³ some observations indicate that PrPC is not a mediator of the neurotoxic effects of A β o (i.e.,⁴⁸⁻⁵¹). Starting from these pioneering PrPC-ABo binding descriptions, several laboratories have started to analyze whether PrP^C may also be a 'cellular partner' for other proteinaceous species displaying 'propagative' properties, and to determine whether PrP^C participates in or regulates the spreading of these 'prion-like' proteins and their associated neuropathology. Results published recently by our group point out that, in addition to $A\beta$ o, membrane-anchored PrP^C can also bind to α -synuclein fibers.²

Several receptors have been described as binding α -synuclein. It has been shown that α -synuclein binds to Na⁺/K⁺-ATPase subunit α 3,⁵² lymphocyte-activation game 3 (LACO) ⁵³ ² lymphocyte-activation gene 3 (LAG3),⁴ neurexin,^{52,53} amyloid β precursor-like protein 1 (APLP1),⁵³ and PrP^{C,27} Although α -synuclein is implicated in the binding, uptake, and/ or trafficking of α -synuclein protofibrils, some details of the process are missing, and for most of them except LAG3 and PrP^C, their putative participation in the spreading of α -synuclein and interneuronal transport has not been fully investigated. For LAG3 and PrP^{C} , their binding and participation in α -synuclein expansion has been analyzed *in vitro* and *in vivo*.^{27,53} In both cases, the absence of the protein receptor (LAG3 or PrPC) largely decreases but does not fully impair α -synuclein spreading *in vivo*.^{27,53} Recent unpublished from our group noted that this decrease in α -synuclein spreading in the absence of PrP^C may occur in different strains

3

4

L. Urrea et al.

of mice lacking functional PrP^C, by avoiding an indirect effect of the '*Prnp*-flanking genes' observed in the Zurich I (ZH1)-derived mice^{47,54,55} (Fig. 1). Conversely, the overexpression of *Prnp* enhances α -synuclein spreading and the generation of the phosphorylated form of α -synuclein (p- α -synuclein) in anatomically connected regions (i.e., striatum \rightarrow motor cortex²⁷) (Fig. 1c). These results were obtained using different *Prnp* genotypes, *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} (B6.129 (ZH1) *Prnp*^{0/0 27} and Zurich 3 (ZH3) *Prnp*^{0/0} mice⁵⁴), and *Tga20* (*Prnp*-overexpressing) mice under a B6.129 background²⁷ (Fig. 1).

TOWARD UNCOVERING OF THE PHYSIOLOGICAL RELEVANCE OF α-SYNUCLEIN-PRP^C INTERACTION: LAST-MINUTE QUESTIONS

Although the interaction between α -synuclein and PrP^C has been described, as has a correlation between *Prnp* expression and p- α -synuclein spreading *in vitro* and *in vivo*, new, challenging questions have emerged. Several open questions at both the cellular level and that of neurodegeneration warrant further study:

i) α -Synuclein can be transported intercellularly through several mechanisms. However, the participation of PrP^{C} in α -synuclein seeding properties and particular transport mechanisms needs further research.

- ii) Astroglial cells participate in α -synuclein spreading,²⁶ Since PrP^C is expressed in neurons and glial cells,⁵⁶ PrP^C might also play a role in α -synuclein glia-to-neuron transmission.
- iii) The putative participation of PrP^{C} in the neurotoxic effects of α -synuclein calls for further attention. Conversely, the actions of this binding in PrP^{C} biology and physiology, both healthy and unhealthy, are still unkown.
- iv) The vast majority of PD patients are sporadic, but mutations in the *SNCA* gene encoding α -synuclein A53T, A30P, E46K, A53E, H50Q, and G51D cause autosomal-dominant forms of PD.⁵⁷ As the α -synuclein/PrP^C interaction takes place in the second charged cluster of the PrP^C, the question of whether these point mutations may alter α -synuclein/PrP^C interaction needs to be addressed.
- v) α -synuclein protofibrils bind to PrP^{C} in their second charged cluster domain, sharing this binding motif with $A\beta o$. This suggests that the effort to block $PrP^{C}/A\beta o$ interaction with molecules (i.e., antibodies⁵⁸) or chemical compounds could also be a potential therapeutic intervention for

FIGURE 1. Increased p- α -synuclein aggregate labeling in the motor neocortex in *Tga20* mice compared with B6.129 (ZH1 *Pmp^{0/0}*) and ZH3 *Prnp^{0/0}* mice. Examples of p- α -synuclein aggregates in the cortex of B6.129 (ZH1) *Pmp^{0/0}* (a); ZH3 *Prnp^{0/0}* (b) and *Tga20* mice (c) injected with recombinant mouse α -synuclein fibrils in the post-commissural striatum. Note the relevant accumulation of p- α -synuclein in intracellular deposits of retrograde labeled neurons in cortical layer V of *Tga20* mice. Scale bar: $a = 100 \mu m$ pertains to b and c. (Color figure available online.)



PRP^C AND *a*-SYNUCLEIN SPREADING

 α -synuclein spreading and, likely, for synucleopathies.

As Santiago Ramón y Cajal said "*Ideas do not last long. We must do something with them.*" We hope that the ideas discussed above will evolve very quickly through the use of newly emerging techniques (i.e, lab-on-a-chip, organoids, etc.) under the umbrella of new mutant mice to more fully reveal the role of PrP^{C} in neurodegeneration.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflicts of interest were disclosed.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Tom Yohannan for editorial advice. We would also like to thank Prof. Adriano Aguzzi for the gift of the Zurich 3 (ZH3) $Prnp^{0/0}$ mice and Dr. Mario Nuvolone for his comments.

FUNDING

This research was supported by grants from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MEICO) (BFU2015–67777-R), the Spanish Prion Network (Prionet Spain, AGL2015–71764-REDT), the Generalitat de Catalunya (SGR2014–1218), CIBERNED (PRY-2016–2, MFDEND), La Caixa Obra Social Foundation, and La Marató de TV3 to JADR. IF was funded by the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MEICO), Instituto de Salud Carlos III - Fondos FEDER, a Way to Build Europe, FIS grant PI14/00757 and CIBERNED.

REFERENCES

- Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: Mechanisms and models. Neuron 2003; 39:889-909; PMID:12971891
- [2] Lowe J, Blanchard A, Morrell K, Lennox G, Reynolds L, Billett M, Landon M, Mayer RJ. Ubiquitin

is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle, and mallory bodies in alcoholic liver disease. J Pathol 1988; 155:9-15; PMID:2837558; https://doi. org/10.1002/path.1711550105

- [3] Ishizawa T, Mattila P, Davies P, Wang D, Dickson DW. Colocalization of tau and alpha-synuclein epitopes in Lewy bodies. J Neuropathol Exp Neurol 2003; 62:389-97; PMID:12722831
- [4] Noda K, Kitami T, Gai WP, Chegini F, Jensen PH, Fujimura T, Murayama K, Tanaka K, Mizuno Y, Hattori N. Phosphorylated IkappaBalpha is a component of Lewy body of Parkinson's disease. Biochem Biophys Res Commun 2005; 331:309-17; PMID:15845394; https://doi.org/ 10.1016/j.bbrc.2005.03.167
- [5] Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature 1997; 388:839-40; PMID:9278044; https://doi.org/10.1038/42166
- [6] Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Kubo M, Shimozawa A, Akiyama H, Hasegawa M. Pathological alpha-synuclein propagates through neural networks. Acta Neuropathol Commun 2014; 2:88; PMID:25095794; https://doi.org/10.1186/PRE ACCEPT-1296467154135944
- [7] Serpell LC, Berriman J, Jakes R, Goedert M, Crowther RA. Fiber diffraction of synthetic alphasynuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. Proc Nati Acad Sci U S A 2000; 97:4897-902; PMID:10781096
- [8] Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. Nat Cell Biol 2002; 4:160-4; PMID:11813001; https://doi.org/10.1038/ncb748
- [9] Larson ME, Sherman MA, Greimel S, Kuskowski M, Schneider JA, Bennett DA, Lesné SE. Soluble alpha-synuclein is a novel modulator of Alzheimer's disease pathophysiology. J Neurosci 2012; 32:10253-66; PMID:22836259; https://doi.org/ 10.1523/JNEUROSCI.0581-12.2012
- [10] Ashe KH, Aguzzi A. Prions, prionoids and pathogenic proteins in Alzheimer disease. Prion 2013; 7:55-9; PMID:23208281; https://doi.org/10.4161/ pri.23061
- [11] Erana H, Venegas V, Moreno J, Castilla J. Prion-like disorders and transmissible spongiform encephalopathies: An overview of the mechanistic features that are shared by the various disease-related misfolded proteins. Biochem Biophys Res Commun 2017; 483:1125-36; PMID:27590581; https://doi.org/ 10.1016/j.bbrc.2016.08.166

L. Urrea et al.

[12] Harbi D, Harrison PM. Classifying prion and prion-like phenomena. Prion 2014; 8:161-5; PMID:24549098; https://doi.org/10.4161/pri.27960

6

- [13] Costanzo M, Zurzolo C. The cell biology of prionlike spread of protein aggregates: Mechanisms and implication in neurodegeneration. Biochem J 2013; 452:1-17. PMID:23614720; https://doi.org/10.1042/ BJ20121898
- [14] Saper CB, Wainer BH, German DC. Axonal and transneuronal transport in the transmission of neurological disease: Potential role in system degenerations, including Alzheimer's disease. Neuroscience 1987; 23:389-98; PMID:2449630; https://doi.org/ 10.1016/0306-4522(87)90063-7
- [15] Bertrand E, Lechowicz W, Szpak GM, Lewandowska E, Dymecki J, Wierzba-Bobrowicz T. Limbic neuropathology in idiopathic Parkinson's disease with concomitant dementia. Folia Neuropathol 2004; 42:141-50; PMID:15535032
- [16] Braak H, Del Tredici K. Neuroanatomy and pathology of sporadic Parkinson's disease. Adv Anat Embryol Cell Biol 2009; 201:1-119; PMID:1923 0552
- [17] Goedert M, Masuda-Suzukake M, Falcon B. Like prions: The propagation of aggregated tau and alpha-synuclein in neurodegeneration. Brain 2017; 140:266-78; PMID:27658420; https://doi.org/ 10.1093/brain/aww230
- [18] GoedertM. Neurodegeneration. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled Abeta, tau, and alpha-synuclein. Science 2015; 349:1255555; PMID:26250687; https:// doi.org/10.1126/science.1255555
- [19] Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiol Aging 2003; 24:197-211; PMID:12498954; https:// doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9
- [20] Breid S, Bernis ME, Babila JT, Garza MC, Wille H, Tamguney G. Neuroinvasion of alpha-synuclein prionoids after intraperitoneal and intraglossal inoculation. J Virol 2016; 90:9182-93; PMID:27489279; https://doi.org/10.1128/JVI.01 399-16
- [21] Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VM. Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. Science 2012; 338:949-53; PMID:23161999; https://doi.org/ 10.1126/science.1227157
- [22] Bernis ME, Babila JT, Breid S, Wusten KA, Wullner U, Tamguney G. Prion-like propagation of human brain-derived alpha-synuclein in transgenic mice expressing human wild-type alpha-synuclein. Acta Neuropathol Commun 2015; 3:75; PMID:26612754; https://doi.org/10.1186/s40478-015-0254-7

- [23] Mougenot AL, Bencsik A, Nicot S, Vulin J, Morignat E, Verchere J, Bétemps D, Lakhdar L, Legastelois S, Baron TG. Transmission of prion strains in a transgenic mouse model overexpressing human A53T mutated alpha-synuclein. J Neuropathol Exp Neurol 2011; 70:377-85; PMID:21487306; https://doi.org/10.1097/NEN.0 b013e318217d95f
- [24] Recasens A, Dehay B, Bove J, Carballo-Carbajal I, Dovero S, Perez-Villalba A, Fernagut PO, Blesa J, Parent A, Perier C, et al. Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. Ann Neurol 2014; 75:351-62; PMID:24243558; https://doi.org/10.1002/ana.24066
- [25] Hasegawa M, Nonaka T, Masuda-Suzukake M. Prion-like mechanisms and potential therapeutic targets in neurodegenerative disorders. Pharmacol Ther 2017; 172:22-33; PMID:27916654; https://doi. org/10.1016/j.pharmthera.2016.11.010
- [26] Cavaliere F, Cerf L, Dehay B, Ramos-Gonzalez P, De Giorgi F, Bourdenx M, Bessede A, Obeso JA, Matute C, Ichas F, et al. In vitro alpha-synuclein neurotoxicity and spreading among neurons and astrocytes using Lewy body extracts from Parkinson disease brains. Neurobiol Dis 2017; 103:101-12; PMID:28411117; https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.04.011
- [27] Urrea L, Segura-Feliu M, Masuda-Suzukake M, Hervera A, Pedraz L, Aznar JM, et al. Involvement of cellular prion protein in alpha-synuclein transport in neurons. Mol Neurobiol 2017; Epub ahead of print; https://doi.org/10.1007/s12035-017-0451-4
- [28] Freundt EC, Maynard N, Clancy EK, Roy S, Bousset L, Sourigues Y, Covert M, Melki R, Kirkegaard K, Brahic M. Neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein fibrils through axonal transport. Ann Neurol 2012; 72:517-24; PMID:23109146; https://doi.org/10.1002/ana.23747
- [29] Song HL, Shim S, Kim DH, Won SH, Joo S, Kim S, Jeon NL, Yoon SY. beta-amyloid is transmitted via neuronal connections along axonal membranes. Ann Neurol 2014; 75:88-97; PMID:24114864; https:// doi.org/10.1002/ana.24029
- [30] Abounit S, Wu JW, Duff K, Victoria GS, Zurzolo C. Tunneling nanotubes: A possible highway in the spreading of tau and other prion-like proteins in neurodegenerative diseases. Prion 2016; 10:344-51; PMID:27715442; https://doi.org/10.1080/19336896. 2016.1223003
- [31] Campana V, Sarnataro D, Zurzolo C. The highways and byways of prion protein trafficking. Trends Cell Biol 2005; 15:102-11; PMID:15695097; https://doi. org/10.1016/j.tcb.2004.12.002
- [32] Tardivel M, Begard S, Bousset L, Dujardin S, Coens A, Melki R, Buée L, Colin M. Tunneling nanotube (TNT)-mediated neuron-to neuron transfer of

PRP^C AND α-SYNUCLEIN SPREADING

pathological Tau protein assemblies. Acta Neuropathol Commun 2016; 4:117; PMID:27809932; https://doi.org/10.1186/s40478-016-0386-4

- [33] Zeinabad HA, Zarrabian A, Saboury AA, Alizadeh AM, Falahati M. Interaction of single and multi wall carbon nanotubes with the biological systems: Tau protein and PC12 cells as targets. Sci Rep 2016; 6:26508; PMID:27216374; https://doi.org/10.1038/ srep26508
- [34] Dieriks BV, Park TI, Fourie C, Faull RL, Dragunow M, Curtis MA. alpha-synuclein transfer through tunneling nanotubes occurs in SH-SY5Y cells and primary brain pericytes from Parkinson's disease patients. Sci Rep 2017; 7:42984; PMID:28230073; https://doi.org/10.1038/srep42984
- [35] Okuda S, Uemura N, Takahashi R. Alpha-synuclein fibrils propagate through tunneling nanotubes. Mov Disord 2017; 32:394; PMID:28218419; https://doi. org/10.1002/mds.26909
- [36] Monsellier E, Bousset L, Melki R. alpha-synuclein and huntingtin exon 1 amyloid fibrils bind laterally to the cellular membrane. Sci Rep 2016; 6:19180; PMID:26757959; https://doi.org/10.1038/srep19180
- [37] Linden R. The biological function of the prion protein: A cell surface scaffold of signaling modules. Front Mol Neurosci 2017; 10:77; PMID:28373833; https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00077
- [38] Dohler F, Sepulveda-Falla D, Krasemann S, Altmeppen H, Schluter H, Hildebrand D, Zerr I, Matschke J, Glatzel M. High molecular mass assemblies of amyloid-beta oligomers bind prion protein in patients with Alzheimer's disease. Brain 2014; 137:873-86; PMID:24519981; https://doi.org/ 10.1093/brain/awt375
- [39] Freir DB, Nicoll AJ, Klyubin I, Panico S, McDonald JM, Risse E, Asante EA, Farrow MA, Sessions RB, Saibil HR, et al. Interaction between prion protein and toxic amyloid beta assemblies can be therapeutically targeted at multiple sites. Nat Commun 2011; 2:336; PMID:21654636; https://doi.org/10.1038/ncomms1341
- [40] Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. Nature 2009; 457:1128-32; PMID:19242475; https:// doi.org/10.1038/nature07761
- [41] Zou WQ, Xiao X, Yuan J, Puoti G, Fujioka H, Wang X, Richardson S, Zhou X, Zou R, Li S, et al. Amyloid-beta42 interacts mainly with insoluble prion protein in the Alzheimer brain. J Biol Chem 2011; 286:15095-105; PMID:21393248; https://doi.org/10.1074/jbc.M110.199356
- [42] Ganzinger KA, Narayan P, Qamar SS, Weimann L, Ranasinghe RT, Aguzzi A, Dobson CM, McColl J, St George-Hyslop P, Klenerman D. Single-molecule imaging reveals that small

amyloid-beta1-42 oligomers interact with the cellular prion protein (PrP(C)). Chembiochem 2014; 15:2515-21; PMID:25294384; https://doi.org/ 10.1002/cbic.201402377

- [43] Fluharty BR, Biasini E, Stravalaci M, Sclip A, Diomede L, Balducci C, La Vitola P, Messa M, Colombo L, Forloni G, et al. An N-terminal fragment of the prion protein binds to amyloid-beta oligomers and inhibits their neurotoxicity in vivo. J Biol Chem 2013; 288:7857-66; PMID:23362282; https://doi.org/10.1074/jbc.M112.423954
- [44] Resenberger UK, Harmeier A, Woerner AC, Goodman JL, Muller V, Krishnan R, Vabulas RM, Kretzschmar HA, Lindquist S, Hartl FU, et al. The cellular prion protein mediates neurotoxic signalling of beta-sheet-rich conformers independent of prion replication. EMBO J 2011; 30:2057-70; PMID:21441896; https://doi.org/10.1038/emboj.2011.86
- [45] Resenberger UK, Winklhofer KF, Tatzelt J. Cellular prion protein mediates toxic signaling of amyloid beta. Neurodegener Dis 2012; 10:298-300; PMID:22156 337; https://doi.org/10.1159/000332596
- [46] Chen S, Yadav SP, Surewicz WK. Interaction between human prion protein and amyloid-beta (Abeta) oligomers: Role of N-terminal residues. J Biol Chem 2010; 285:26377-83; PMID:20576610; https://doi.org/10.1074/jbc.M10.145516
- [47] del Rio JA, Gavin R. Functions of the cellular prion protein, the end of Moore's law, and Ockham's razor theory. Prion 2016; 10:25-40; PMID:26890218; https://doi.org/10.1080/19336896.2015.1126038
- [48] Calella AM, Farinelli M, Nuvolone M, Mirante O, Moos R, Falsig J, Mansuy IM, Aguzzi A. Prion protein and abeta-related synaptic toxicity impairment. EMBO Mol Med 2010; 2:306-14; PMID:20665634; https://doi.org/10.1002/emmm.201000082
- [49] Kessels HW, Nguyen LN, Nabavi S, Malinow R. The prion protein as a receptor for amyloid-beta. Nature 2010; 466:E3-4; discussion E-5; PMID:20703260; https://doi.org/10.1038/nature09217
- [50] Haas LT, Salazar SV, Kostylev MA, Um JW, Kaufman AC, Strittmatter SM. Metabotropic glutamate receptor 5 couples cellular prion protein to intracellular signalling in Alzheimer's disease. Brain 2016; 139:526-46; PMID:26667279; https://doi.org/ 10.1093/brain/awv356
- [51] Kostylev MA, Kaufman AC, Nygaard HB, Patel P, Haas LT, Gunther EC, Vortmeyer A, Strittmatter SM. Prion-protein-interacting amyloid-beta oligomers of high molecular weight are tightly correlated with memory impairment in multiple Alzheimer mouse models. J Biol Chem 2015; 290:17415-38; PMID:26018073; https://doi.org/10.1074/jbc.M115.643577
- [52] Shrivastava AN, Redeker V, Fritz N, Pieri L, Almeida LG, Spolidoro M, Liebmann T, Bousset L, Renner M, Léna C, et al. alpha-synuclein

L. Urrea et al.

assemblies sequester neuronal alpha3-Na+/K+-ATPase and impair Na+ gradient. EMBO J 2015; 34:2408-23; PMID:26323479; https://doi. org/10.15252/embj.201591397

8

- [53] Mao X, Ou MT, Karuppagounder SS, Kam TI, Yin X, Xiong Y, Ge P, Umanah GE, Brahmachari S, Shin JH, et al. Pathological alpha-synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. Science 2016; 353:aah3374, 1-12; https://doi.org/10.1126/science.aah3374
- [54] Nuvolone M, Hermann M, Sorce S, Russo G, Tiberi C, Schwarz P, Minikel E, Sanoudou D, Pelczar P, Aguzzi A, et al. Strictly co-isogenic C57BL/61-Prnp-/- mice: A rigorous resource for prion science. J Exp Med 2016; 213:313-27; PMID:26926995; https://doi.org/10.1084/jem.20151610
 [55] Nuvolone M, Sorce S, Paolucci M, Aguzzi A.
- [55] Nuvolone M, Sorce S, Paolucci M, Aguzzi A. Extended characterization of the novel co-isogenic C57BL/6J Prnp-/- mouse line. Amyloid 2017;

24:36-7; PMID:28434290; https://doi.org/10.1080/ 13506129.2017.1289913

- [56] Vilches S, Vergara C, Nicolas O, Sanclimens G, Merino S, Varon S, Acosta GA, Albericio F, Royo M, Del Río JA, et al. Neurotoxicity of prion peptides mimicking the central domain of the cellular prion protein. PloS One 2013; 8:e70881; PMID:23940658; https:// doi.org/10.1371/journal.pone.0070881
- [57] Burre J, Sharma M, Sudhof TC. Cell biology and Pathophysiology of alpha-Synuclein. Cold Spring Harb Perspect Med 2017; Epub ahead of print; PMID:28108534; https://doi.org/10.1101/cshperspect. a024091
- [58] Chung E, Ji Y, Sun Y, Kascsak RJ, Kascsak RB, Mehta PD, Strittmatter SM, Wisniewski T. Anti-PrPC monoclonal antibody infusion as a novel treatment for cognitive deficits in an Alzheimer's disease model mouse. BMC Neurosci 2010; 11:130; PMID:20946660; https:// doi.org/10.1186/1471-2202-11-130