



FACULTADE DE MEDICINA
Departamento de Medicina

Tesis Doctoral

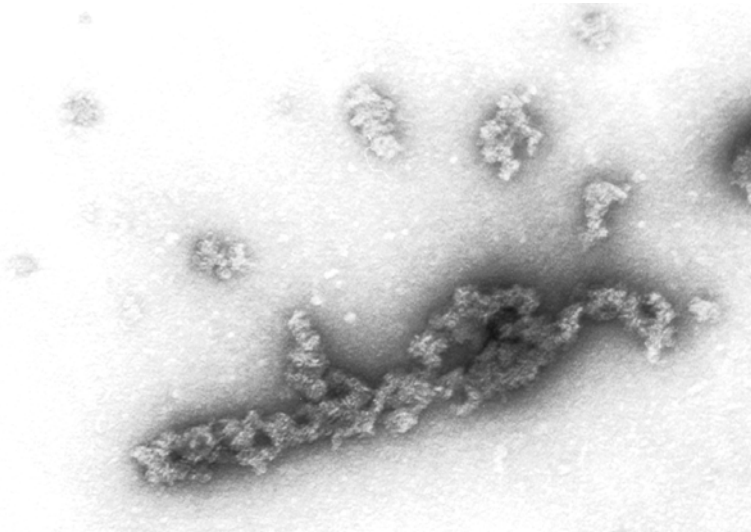
“Aislamiento y caracterización de una fracción de PrP^{Sc} sensible a
proteínasa K (sPrP^{Sc}); estudios estructurales sobre la PrP^{Sc}”

Miguel Ángel Pastrana González

Santiago de Compostela, 2008



**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**“Aislamiento y caracterización de una fracción de PrP^{Sc} sensible a
proteínasa K (sPrP^{Sc}); estudios estructurales sobre la PrP^{Sc}”**

MIGUEL ÁNGEL PASTRANA GONZÁLEZ

Santiago de Compostela, 2008

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**“Aislamiento y caracterización de una fracción de PrP^{Sc} sensible a
proteínasa K (sPrP^{Sc}); estudios estructurales sobre la PrP^{Sc}”**

MIGUEL ÁNGEL PASTRANA GONZÁLEZ

Santiago de Compostela, 2008

Este trabajo ha sido financiado a través de los proyectos de investigación: EET2001-4861 y BFU2006-04588/BMC del Ministerio Español de Educación y Ciencia (MEC); NS049173 del National Institutes of Health (NIH) y n° 58-5325-4-0178F del United States Department of Agriculture (USDA) de los Estados Unidos; y FP6 2004 FOOD 3B 023183 de la Unión Europea.

Autor: Miguel Ángel Pastrana González

Año 2008

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

DIRECTOR
Dr. JESÚS RODRÍGUEZ REQUENA

TESIS DOCTORAL

**“Aislamiento y caracterización de una fracción de PrP^{Sc} sensible a
proteínasa K (sPrP^{Sc}); estudios estructurales sobre la PrP^{Sc}”**

Santiago de Compostela, 2008



Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

El Dr. JESÚS RODRÍGUEZ REQUENA, profesor del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMA

Que la presente memoria titulada “*Aislamiento y caracterización de una fracción de PrP^{Sc} sensible a proteinasa K (sPrP^{Sc}); estudios estructurales sobre la PrP^{Sc}”*”, presentada por D. MIGUEL ÁNGEL PASTRANA GONZÁLEZ para optar al grado de doctor por la Universidad de Santiago de Compostela, ha sido realizada bajo su supervisión en el Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de esta Universidad y reúne los requisitos exigidos por la normativa vigente para ser valorada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos se firma el presente informe.

En Santiago de Compostela, a 23 de Junio de 2008

Fdo.: Dr. Jesús Rodríguez Requena

“a Carmen y Manuel”

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de la etapa que culmina con la presentación de esta tesis doctoral han sido muchas las personas que de un modo u otro han contribuido con su inestimable apoyo en la consecución de este anhelo personal. Fácilmente se comprende que llegado este momento hayan sido muchas las neuronas sacrificadas en el camino, y que cada vez resulte más probable que esta erosionada memoria me juegue una mala pasada; por si acaso, pido disculpas de antemano si a pesar de mis esfuerzos termino olvidándome de alguien por el que realmente no siento sino un profundo agradecimiento. Sin más preámbulos, deseo dar sinceramente las gracias...

A Susana Nocelo del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y a José Luis López del Departamento de Genética de la Facultad de Biología, cuyos destinos convergieron fugaces a nuestro paso por la USC, pero en cuya providencial compañía me asomé, casi por casualidad, a la que más tarde sería una puerta de entrada hacia el mundo de la investigación.

A Emilio Nogueira del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, por su amabilidad, por estar siempre dispuesto a echar una mano y por sus valiosos consejos técnicos.

A Alejandro Brun y a José A. Rodríguez del CISA-INIA (Madrid) por instruirme pacientemente en las más sofisticadas técnicas de inoculación intracraneal en roedores... ¡ahí es nada!

A Rosalina Gavín y José A. del Río de la Universidad de Barcelona por contar conmigo a la hora de establecer interesantes y fructuosas colaboraciones.

A Joaquín Castilla, Rodrigo Morales, Lisbell Estrada y al resto de componentes del grupo de Claudio Soto por acogerme en mi aventura norteamericana. Especialmente a Paula Saá y Jorge de Castro por su apreciable ayuda y, cómo no, por auxiliarme a la llegada del histórico y peligroso huracán "Rita".

A Isabel Magán, Noemí Ladra, Mónica Paz y Esteban Guitián en particular, y a la Unidad de Espectrometría de Masas de la RIAIDT (USC) en general, por el soporte técnico en el análisis espectrométrico de las muestras.

A Matthijn R. Vos por las espectaculares imágenes de microscopía electrónica que ilustran esta tesis.

A Bruce Onisko del USDA (California, EEUU) que, además de su participación activa en este trabajo de investigación, me ha obsequiado siempre con su serena cordialidad y su indisoluble simpatía.

A mis compañeros de laboratorio en la “Prion Research Unit” Gustavo Sajnani, Laura Yeves y Ester Vázquez por la generosa ayuda prestada, por sus consejos científicos y personales, por amenizar tantos madrugones y tantas tardes de incesante lluvia en Compostela... en fin, por hacer más fácil y llevadero el día a día.

Al “monstruo” de mi primo, el “Knopfler” de la informática... ¡Paco, que bueno tener un “trapañero” como tú en la familia!

A David por tu siempre desinteresada generosidad, por tu amplio y exquisito sentido del humor, por estar omnipresente en los mejores momentos de mi vida y por poder contar siempre contigo en los peores. En este punto, quisiera hacer extensible mi gratitud a todos aquell@s que deben ahora sentirse aludidos porque se saben mis verdaderos amig@s, y por tanto, conocen el lugar de privilegio que ocupan en mi mente.

A Isabel, David, Patricia, Juan y Carmen con los que hace tiempo contraje una enorme deuda, sobre todo por hacerme sentir como si nunca hubiese salido de mi propia casa, y por haber sabido darme durante años el soporte y el afecto de una verdadera familia. Y a Encarna, porque cada día que pase puedas recoger al menos una pequeñísima parte de aquello que incansablemente sembraste a lo largo de tantos años.

Es muy probable que nada de esto hubiera sido lo mismo de no haber tenido la inmensa fortuna de cruzarme en el camino con un tal Jesús R. Requena. Indudablemente, considero que este hecho ha sido clave, además de tremendamente positivo, en mi hasta ahora efímera carrera investigadora. Jesús me dio la oportunidad de trabajar a su lado, pero también su apoyo y confianza. Además, con su elegante paciencia puso a disposición los medios y conocimientos necesarios para llevar a buen término esta empresa, creando un ambiente de disfrute y contagioso optimismo. Gracias también por saber delegar, motivar y valorar el trabajo de los demás, por tu carácter conciliador e inmejorables modos, y por hacer las cosas tan fáciles. En definitiva, por ese saber ser y estar en cada momento, profeso un gran respeto y admiración por este buen científico y mejor persona, al que siempre podré recordar como mi “mentor”.

A mis padres Manuel y Carmen, y a mis herman@s Isabel, Manuel y Patricia: los pilares sobre los que se sustenta todo aquello cuanto soy. Los referentes que me han marcado personalmente, guiado a cada paso del camino e infundido toda una serie de valores vitales. Los mismos que contra viento y marea han permitido que pudiese desarrollar y ejercer mi aptitud vocacional. Los que siempre estuvieron, están y estarán ahí, haciéndome sentir tremendamente arropado ante cualquier eventual adversidad. No quiero olvidarme de mi cuñado Enrique, y de mis sobrinos Fran y María. Y por un instante voy a acordarme de mi tío Moncho, quien como buen padrino no me cabe duda alguna de que se hubiera sentido muy feliz y orgulloso.

Y al fin a alguien muy especial, a M^a Luisa; por tu incansable e incondicional apoyo, por sufrir en tus carnes mis cosas como propias, por soportarme, por dar sentido al presente y colmar de ilusión el futuro, y porque a tu lado nunca me he sentido solo.

ÍNDICE

 ÍNDICE

Índice de Figuras y Tablas.....	XXIII
RESUMEN	3
Resumo.....	7
Summary	11
GLOSARIO	17
INTRODUCCIÓN.....	27
Revisión histórica y aspectos generales.....	27
Naturaleza del agente infeccioso	33
La proteína celular: PrP ^C	37
El gen de la PrP: Prnp	37
Estructura primaria.....	38
Estructura secundaria y terciaria	40
Expresión y localización	41
Función biológica.....	42
La isoforma infecciosa: PrP ^{Sc}	44
Características bioquímicas.....	44
Estructura secundaria, terciaria y cuaternaria	44
Mecanismo de conversión	49
Modelo de conversión asistida por molde.....	50
Modelo de Nucleación-Polimerización.....	50
Concepto de “cepa”	52
El fenómeno de “barrera de transmisión”.....	54
Amplificación cíclica de proteínas anormalmente plegadas (PMCA).....	57
La PrP ^{Sc} sensible a proteinasa K.....	58
Contexto estratégico	63
OBJETIVOS	69
MATERIALES Y MÉTODOS	73
Tampones y Soluciones.....	73
Modelo animal.....	77

Anticuerpos	78
Detección de PrP	79
Tinciones.....	79
Inmunoblots	80
Deglicosilación de PrP ^{Sc}	81
Purificación de PrP ^{Sc}	82
Caracterización y cuantificación de PrP ^{Sc}	84
Aislamiento de sPrP ^{Sc}	85
Proteólisis parcial de sPrP ^{Sc} con PK.....	85
Inmunorreactividad dependiente de conformación	86
Sedimentación en gradiente de sacarosa	86
Efecto del detergente	88
PMCA	89
Estudios de Infectividad.....	90
Proteólisis parcial	91
C-18: <i>Zip-Tips</i> y <i>Clin-Prot</i>	92
Nanospray LC-ESI/MS/MS	93
Digestión química con NTCB	94
Análisis mediante MALDI-TOF	94
Obtención de fibras amiloides.....	95
Inmunorreactividad frente a anticuerpos conformacionales específicos de amiloide.....	96
Microscopía electrónica	97
TEM.....	97
Crio-TEM.....	98
RESULTADOS	101
Purificación de PrP ^{Sc}	101
Cuantificación de PrP ^{Sc}	103
Aislamiento de la fracción sPrP ^{Sc}	105
Caracterización bioquímica de la sPrP ^{Sc}	106
Resistencia parcial a PK.....	106
Resistencia a tripsina.....	107

Immunorreactividad dependiente de conformación	109
Sedimentación en gradiente de sacarosa	110
Efecto del detergente.....	115
Actividad conversora in vitro (PMCA).....	116
Infectividad <i>in vivo</i>	118
Estudios estructurales	120
Proteólisis parcial de sPrP ^{Sc} con tripsina.....	120
Proteólisis parcial de PrP ^{Sc} con PK	129
Proteólisis parcial de sPrP ^{Sc} con PK	135
Immunorreactividad frente a anticuerpos conformacionales específicos de amiloide	137
Microscopía electrónica	138
TEM.....	138
Crio-TEM	140
DISCUSIÓN	147
CONCLUSIONES.....	169
PERSPECTIVAS FUTURAS	173
BIBLIOGRAFÍA	177
ANEXO I: Publicaciones derivadas	203
i. Pastrana M.A. , Sajnani G., Onisko B., Castilla J., Morales R., Soto C., Requena J.R. (2006) Isolation and characterization of a proteinase K-sensitive PrP ^{Sc} fraction, <i>Biochemistry</i> 45: 15710-15717.....	203
Material suplementario.....	211
ii. Sajnani G., Pastrana M.A. , Dynin I., Onisko B., Requena J.R. (2007) Scrapie prion protein (PrP ^{Sc}) structural constraints obtained by limited proteolysis and mass spectrometry, <i>JMB</i> (en imprenta).....	217

ANEXO II: Comunicaciones en congresos	249
i. Pastrana M.A. & Requena J.R. <i>Isolation of proteinase K-sensitive PrP^{Sc}</i> . 2 nd International Symposium on The New Prion Biology: Basic Science, Diagnosis and Therapy (Venezia). April, 2005	249
ii. Sajnani G., Pastrana M.A. , Dynin I., Requena J.R., Onisko B. <i>Insights of PrP^{Sc} structure obtained by limited proteolysis and mass spectrometry</i> . Prion 2006: Strategies, advances and trends towards protection of society (Torino). October, 2006.....	251
iii. Sajnani G., Pastrana M.A. , Yeves L., Dynin I., Onisko B., Requena J.R. <i>Limited proteolysis of PrP^{Sc}: alternating PK resistant and sensitive segments suggest a beta strand-turn-beta strand structural core</i> . Prion 2007 (Edinburgh). September, 2007.	253
iv. Sajnani G., Pastrana M.A. , Ramos A., Vazquez E., Dynin I., Onisko B., Requena J.R. <i>Limited proteolysis of PK-sensitive PrP^{Sc} further supports a structure featuring beta sheet stretches interspersed with loops/turns for PrP^{Sc}</i> . Prion 2008 (Madrid). October, 2008.....	255

Índice de Figuras y Tablas
Figuras

Figura 1A: Esquema del proceso de aislamiento de sPrP ^{Sc}	5
Figura 1B: Esquema do proceso de illamento da sPrP ^{Sc}	9
Figure 1C: Diagram of sPrP ^{Sc} isolation procedure.....	13
Figura 2: Neuropatología en las EETs.....	30
Figura 3: <i>Prion Rods</i>	36
Figura 4: Esquema del gen de la PrP (<i>Prnp</i>).....	38
Figura 5: Estructura primaria de la PrP ^C	39
Figura 6: Conformación propuesta para PrP ^C	40
Figura 7: Anclaje a la membrana de la PrP ^C	41
Figura 8: Modelos estructurales propuestos para PrP ^{Sc}	47
Figura 9: Modelos de conversión conformacional de PrP ^C en PrP ^{Sc}	51
Figura 10: Diagrama esquemático del proceso de purificación para PrP ^{Sc}	83
Figura 11: Western blot (mAb 3F4) mostrando algunas de las fases más representativas del proceso de purificación para PrP ^{Sc}	101
Figura 12: Distribución de PrP en las sucesivas fases del proceso de purificación estandarizado para PrP ^{Sc} a partir de cerebros sanos de hámster sirio	102
Figura 13: Estima de la pureza y concentración de una suspensión de PrP ^{Sc}	104
Figura 14: Análisis proteómico de la banda λ	105
Figura 15: Aislamiento de la fracción de PrP ^{Sc} sensible a PK.....	106
Figura 16: Resistencia parcial de sPrP ^{Sc} a PK	107
Figura 17: Susceptibilidad de sPrP ^{Sc} a la digestión con tripsina.....	108
Figura 18: Inmunorreactividad dependiente de conformación para sPrP ^{Sc} , rPrP ^{Sc} y recSHaPrP(90-231).....	110
Figura 19: Sedimentación en gradiente de sacarosa	111
Figura 20: Distribución por tamaño de sPrP ^{Sc} y rPrP ^{Sc} en gradiente de sacarosa.....	112
Figura 21: Calibración del sistema de gradientes de sacarosa	113
Figura 22: Estabilidad de las fracciones obtenidas mediante centrifugación en gradiente de sacarosa.....	114

Figura 23: Efecto del detergente sobre la solubilidad de PrP ^{Sc}	116
Figura 24: Capacidad conversora de sPrP ^{Sc} <i>in vitro</i> mediante PMCA.....	117
Figura 25: Estudios de infectividad	119
Figura 26: Digestión parcial con tripsina de sPrP ^{Sc} , rPrP ^{Sc}	121
Figura 27: Fragmentos trípticos obtenidos por proteólisis parcial de sPrP ^{Sc}	122
Figura 28: Fragmentos trípticos de rPrP ^{Sc} y SHaPrP(90-231) recombinante.....	124
Figura 29: <i>eXtracted Ion Chromatogram</i> (XIC).....	125
Figura 30: Espectro de fragmentación	126
Figura 31: Error medio cuadrático (RMS error).	128
Figura 32: Digestión tríptica de la tPrP ^{Sc} de DY	129
Figura 33: Reacción de corte con NTCB.....	130
Figura 34: Análisis por MALDI-TOF de PrP ^{Sc} de 263K digerida con PK.....	133
Figura 35: Análisis por MALDI-TOF de PrP ^{Sc} de DY digerida con PK.....	134
Figura 36: Cinética de la reacción de digestión de sPrP ^{Sc} con PK.....	136
Figura 37: Mapa de susceptibilidad a la proteólisis de la molécula de PrP ^{Sc} bajo condiciones limitantes	137
Figura 38: Dot blot mostrando la inmunoreactividad de la PrP ^{Sc} frente a los anticuerpos Anti-Oligómeros (A11) y Anti-Fibras (W01).....	138
Figura 39: Imagen de PrP27-30 mediante TEM.....	139
Figura 40: Tinción negativa de PrP ^{Sc}	140
Figura 41: Equipo de crio-microscopía electrónica.....	141
Figura 42: Imágenes de Crio-TEM para PrP ^{Sc}	142
Figura 43: Efecto de la sonicación sobre los agregados de PrP ^{Sc}	143

Tablas

Tabla 1: Asignación de Mascot para el espectro de MS-MS mostrado	127
--	-----

RESUMEN

RESUMEN

Estudios recientes han revelado la presencia de una fracción no despreciable de PrP^{Sc} en tejidos infectados con priones que, en contra del concepto preponderante, se muestra sensible a la digestión con proteinasa K (PK). Este hallazgo tiene importantes implicaciones en el contexto del diagnóstico de las enfermedades priónicas, toda vez que el uso de la PK se halla plenamente extendido por la recurrente necesidad de discernir entre PrP^{Sc} y PrP^C. Sin embargo, la elucidación de la estructura de la PrP^{Sc} resulta esencial para poder comprender aspectos fundamentales de la biología molecular de la PrP^{Sc} como el mecanismo molecular que dota al prión de la capacidad de transmisión, aspecto que continúa siendo uno de los principales desafíos en la investigación sobre priones, pero que se ha visto obstaculizado por la insolubilidad y el carácter polimérico de la PrP^{Sc}. Por ello, este trabajo se ha centrado en la búsqueda de información estructural a través del estudio de la PrP^{Sc} sensible a PK (sPrP^{Sc}) con la intención de obtener alguna clave que contribuya al entendimiento de la esencia de los procesos de conversión y agregación de la PrP^C que conducen a la infectividad. Inicialmente, se ha logrado aislar una fracción de sPrP^{Sc} (Figura 1A). Este material se obtuvo por centrifugación diferencial, a velocidad intermedia, a partir de PrP^{Sc} purificada de hámster sirio mediante un procedimiento convencional basado en ultracentrifugación en presencia de detergentes. La PrP^{Sc} sensible a PK es completamente degradada bajo condiciones estándar (50 µg/ml de proteinasa K a 37 °C durante 1 hora), siendo además susceptible a la digestión con tripsina. Mediante fraccionamiento por centrifugación en gradiente de sacarosa se observa que la sPrP^{Sc} se corresponde con las fracciones de menor tamaño molecular dentro del rango continuo de polímeros que constituyen la PrP^{Sc}. La PrP^{Sc} sensible a PK manifiesta actividad conversora *in vitro*, siendo capaz de desencadenar el proceso de amplificación de la PrP^{Sc} resistente a proteasa a través del ensayo de PMCA (*Protein Misfolding Cyclic Amplification*). Más aun, la identidad de esta fracción queda plenamente confirmada al demostrar su elevada capacidad infecciosa *in vivo*.

La proteólisis parcial es una herramienta útil para obtener datos estructurales de proteínas, ya que los enzimas proteolíticos cortan preferentemente en las áreas más expuestas y flexibles de las proteínas, sobre todo cuando se trata de lazos, y apenas cortan

en zonas que contienen lámina- β . Así, la proteólisis parcial de la sPrP^{Sc} con tripsina ha permitido identificar regiones parcialmente expuestas y flexibles de la molécula en función de su particular susceptibilidad a la digestión, como las que se sitúan en torno a los residuos R136, R151, K220 y R229.

La PrP^{Sc} sensible a PK aislada de este modo se ha mostrado como un material competente para resolver aspectos estructurales de la PrP^{Sc}, y quizás debería ser una fracción a tener en cuenta en la búsqueda de un test preclínico diseñado para detectar enfermedades priónicas.

Paralelamente, este estudio se ha combinado con distintas estrategias que convergen en el análisis estructural de la PrP^{Sc}. A tal efecto, la propia PrP^{Sc} purificada de cerebros de hámster infectados con las cepas 263K y Drowsy fue igualmente sometida a proteólisis limitada con proteinasa K. Tras detener esta reacción, la PrP^{Sc} fue desnaturalizada, reducida y finalmente cortada en la Cys-179 con ácido 2-nitro-5-tiocianatonitrobenzoico (NTCB). Los fragmentos fueron analizados por nanoHPLC-MS y MALDI-TOF. Además de los conocidos puntos de corte en las posiciones 90, 86, 92 para 263K y 86, 90, 92, 98 y 101 para DY, estos datos demuestran claramente la existencia de puntos de corte adicionales en zonas más internas de la molécula, que afectan a las posiciones 117, 119, 135, 139 142 y 154 en ambas cepas. Un análisis similar reveló los mismos puntos de corte para sPrP^{Sc}, aunque en proporciones diferentes.

Estos resultados, coherentes con los obtenidos con tripsina y sPrP^{Sc}, sugieren que además de los “clásicos” puntos de corte para la PK del extremo amino-terminal, la PrP^{Sc} contiene, en su núcleo central, regiones que muestran cierto grado de susceptibilidad a proteasas y que, por lo tanto, pueden corresponderse con subdominios que gozan de cierta flexibilidad estructural, intercalados con tramos de amino ácidos con elevada resistencia a la proteólisis. Estos resultados son compatibles con una estructura constituida por tramos cortos de láminas- β conectados por lazos y giros.

De acuerdo con esta visión de la isoforma infecciosa, los inmunoensayos realizados con anticuerpos que reconocen específicamente estructuras de tipo amiloide han resultado positivos para la PrP^{Sc} de las cepas 263K y DY en su estado nativo.

Por otra parte, los estudios de microscopía electrónica (TEM y crió-TEM) apoyan firmemente la idea de que la PrP^{Sc} exhibe una estructura fibrilar. La solubilidad manifestada por la fracción de sPrP^{Sc}, la hace particularmente atractiva para su aplicación en crió-TEM, dado que permite la obtención de muestras vitrificadas de menor grosor indispensables para estudios de tomografía.

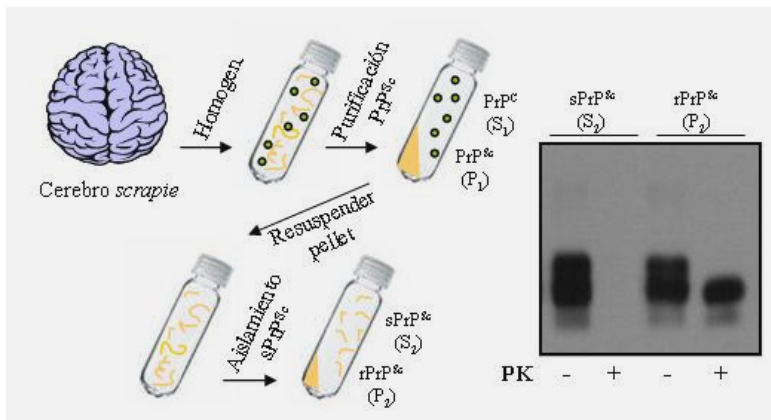


Figura 1A: Esquema del proceso de aislamiento de sPrP^{Sc}.

S: sobrenadante; P: *pellet*

Resumo

Estudos recentes revelaron a presenza dunha fracción non desprezable de PrP^{Sc} en tecidos infectados con prions que, fronte ao concepto preponderante, amósase sensible á dixestión con proteinasa K (PK). Este achado ten importantes implicacións no contexto do diagnóstico das enfermidades priónicas dado que o uso da PK atópase plenamente estendido por mor da recorrente necesidade de discernir entre PrP^{Sc} e PrP^C. Porén, a elucidación da estrutura da PrP^{Sc} resulta esencial para achegar ao entendemento daqueles aspectos fundamentais da bioloxía molecular da PrP^{Sc} como o mecanismo molecular que dota ao prion da capacidade de transmisión, aspecto que segue sendo un dos principais desafíos na investigación sobre prions, pero que se veu obstaculizado pola insolubilidade e o carácter polimérico da PrP^{Sc}. Por isto, este traballo centrouse na busca de información estrutural mediante o estudo da PrP^{Sc} sensible á PK (sPrP^{Sc}) coa intención de obter algunha clave que contribúa ao entendemento da esencia dos procesos de conversión e agregación da PrP^C que conducen á infectividade. En primeiro lugar, logrouse illar unha fracción de sPrP^{Sc} (Figura 1B). Este material obtívose por centrifugación diferencial, cunha velocidade intermedia, partindo de PrP^{Sc} purificada de hámster sirio mediante un procedemento convencional baseado na ultracentrifugación na presenza de deterxentes. A PrP^{Sc} sensible á PK é completamente degradada baixo condicións estándar (50 µg/ml de proteínas K a 37 °C durante 1 hora), sendo ademais susceptible á dixestión con tripsina. Mediante fraccionamento por centrifugación en gradiente de sacarosa obsérvase que a sPrP^{Sc} correspóndese coas fraccións de menor tamaño molecular dentro do rango continuo de polímeros que constitúen a PrP^{Sc}. A PrP^{Sc} sensible a PK manifesta actividade conversora *in vitro*, sendo capaz de desencadear o proceso de amplificación da PrP^{Sc} resistente a proteasa logo do ensaio de PMCA (*Protein Misfolding Cyclic Amplification*). Máis aínda, a identidade desta fracción queda plenamente confirmada ao demostrar a súa elevada capacidade infecciosa *in vivo*.

A proteólise parcial é unha ferramenta útil para obter datos estruturais de proteínas, xa que as encimas proteolíticas cortan preferentemente nas áreas máis expostas e flexibles das proteínas, sobre todo cando se trata de lazos, e apenas cortan en zonas que conteñen lámina-β. Así, a proteólise parcial da sPrP^{Sc} con tripsina permitiu identificar

rexións parcialmente expostas e flexibles da molécula segundo a súa particular susceptibilidade á dixestión, como as que se sitúan no contorno dos residuos R136, R151, K220 e R229.

A PrP^{Sc} sensible a PK illada deste xeito amosouse como un material competente para resolver aspectos estruturais da PrP^{Sc}, e quizais debería ser unha fracción que ter en conta na busca dun test preclínico deseñado para detectar enfermidades priónicas.

Paralelamente, este estudo combinouse con distintas estratexias que converxen na análise estrutural da PrP^{Sc}. Deste xeito, a mesma PrP^{Sc} purificada de cerebros de hámster infectados coas cepas 263K e Drowsy foi igualmente sometida a proteólise limitada con proteinasa K. Despois de deter esta reacción, a PrP^{Sc} foi desnaturalizada, reducida e cortada na Cys-179 con 2-nitro-5-tiocianatonitrobenzoico ácido (NTCB). Os fragmentos foron analizados por nanoHPLC-MS y MALDI-TOF. Ademais dos coñecidos puntos de corte nas posicións 90, 86, 92 para 263K e 86, 90, 92, 98 e 101 para DY, estes datos demostran claramente a existencia de puntos de corte adicionais nas zonas máis internas da molécula, que afectan ás posicións 117, 119, 135, 139 142 e 154 en ambas cepas. Unha análise semellante revelou os mesmos puntos de corte para sPrP^{Sc}, aínda que en proporcións diferentes.

Estes resultados, coherentes cos obtidos con tripsina e sPrP^{Sc}, suxiren que ademais dos “clásicos” puntos de corte para a PK do extremo amino-terminal, a PrP^{Sc} contén, no seu núcleo central, rexións que mostran certo grao de susceptibilidade ás proteasas e que, polo tanto, poden corresponderse con subdominios que gozan de certa flexibilidade estrutural, intercalados con tramos de aminoácidos con elevada resistencia á proteólise. Estes resultados son compatibles cunha estrutura constituída por tramos curtos de láminas- β conectados por lazos e xiros.

De acordo con esta visión da isoforma infecciosa, os inmunoensaios realizados con anticorpos que recoñecen especificamente estruturas de tipo amiloide resultaron positivos para a PrP^{Sc} das cepas 263K e DY no seu estado nativo.

Por outra banda, os estudos de microscopía electrónica (TEM y crio-EM) apoian firmemente a idea de que a PrP^{Sc} amosa unha estrutura fibrilar. A solubilidade manifestada pola fracción de sPrP^{Sc} faina particularmente atractiva para a súa aplicación en crio-TEM, posto que permite a obtención de mostras vitrificadas de menor grosor indispensables para estudos de tomografía.

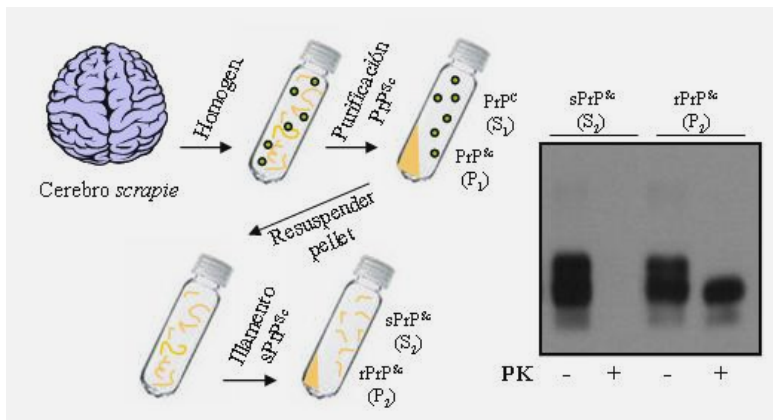


Figura 1B: Esquema do proceso de illamento da sPrP^{Sc}.

S: sobrenadante; P: *pellet*.

Summary

Contrary to previous conceptions, recent studies have shown that a sizeable fraction of PrP^{Sc} present in prion-infected tissues is sensitive to digestion by proteinase K (PK). This finding has important implications in the context of diagnosis of prion disease, as PK has been extensively used in attempts to distinguish between PrP^{Sc} and PrP^C. Elucidation of the structure of PrP^{Sc}, essential to understand the molecular mechanism of prion transmission, continues to be one of the major challenges in prion research, and is hampered by the insolubility and polymeric character of PrP^{Sc}. Even more importantly, PK-sensitive PrP^{Sc} (sPrP^{Sc}) might be essential to understand the process of conversion and aggregation of PrP^C leading to infectivity. Therefore, I have isolated a fraction of sPrP^{Sc}. This material was obtained by differential centrifugation, at an intermediate speed, of Syrian hamster PrP^{Sc} obtained through a conventional procedure based on ultracentrifugation in the presence of detergents. PK-sensitive PrP^{Sc} is completely degraded under standard conditions (50 µg/ml of proteinase K at 37 °C for 1 h) and can also be digested with trypsin. Centrifugation in a sucrose gradient showed sPrP^{Sc} to correspond to the lower molecular weight fractions of the continuous range of oligomers that constitute PrP^{Sc}. PK-sensitive PrP^{Sc} has the ability to convert PrP^C into protease-resistant PrP^{Sc}, as assessed by the protein misfolding cyclic amplification assay (PMCA). Moreover, the prionic nature of this fraction was completely confirmed by showing its high infectious capacity *in vivo*.

Limited proteolysis is a useful tool to obtain insight on structural features of proteins: proteolytic enzymes cleave proteins more readily at exposed sites, preferentially if within loops, and rarely in β - strands. Limited proteolysis of sPrP^{Sc} using trypsin allows identification of regions that are particularly susceptible to digestion, i.e., partially exposed and flexible; we have identified as such the regions around residues R136, R151, K220 and R229.

PK-sensitive PrP^{Sc} isolates should prove useful for structural studies, to help understand fundamental issues of the molecular biology of PrP^{Sc}, and in the quest to design test to detect pre-clinical prion disease.

PK-sensitive PrP^{Sc} isolated using this method has proved to be a competent material to solve PrP^{Sc} structural features, and perhaps it should be a fraction to be taken into account with regard to the search for a pre-clinical test designed to detect prionic diseases.

At the same time, this study has been combined with various different converging strategies; all of which have one common aim: the structural analysis of PrP^{Sc}. To this effect, the purified PrP^{Sc} isolated from brains of hamsters infected with 263K and Drowsy prions was similarly submitted to partial proteolysis with varying concentrations of proteinase K (PK). After PK deactivation, PrP^{Sc} was denatured, reduced, and cleaved at Cys-179 with 2-nitro-5-thiocyanatonitrobenzoic acid (NTCB). Fragments were analyzed by nanoHPLC-MS and MALDI. Besides the known cleavages at positions 90, 86, 92 for 263K and 86, 90, 92, 98 and 101 for DY, these data clearly demonstrate the existence of additional cleavage sites at more internal positions, including 117, 119, 135, 139, 142 and 154 in both strains. Similar analysis revealed the same cleavage sites for sPrP^{Sc}, though in different proportions.

PK-concentration dependence analysis and limited proteolysis after partial unfolding of PrP^{Sc} confirmed that only the mentioned cleavage sites at the N-terminal side of the PrP^{Sc} are susceptible to PK. Our results indicate that besides the “classic” amino terminal PK cleavage points, PrP^{Sc} contains, in its middle core, regions that show some degree of susceptibility to proteases and must therefore correspond to sub-domains with some degree of structural flexibility, interspersed with stretches of amino acids of high resistance to proteases. These results are compatible with a structure consisting of short β -sheet stretches connected by loops and turns.

In accordance with this vision of infectious isoform, the immunoassays carried out using antibodies that specifically recognise amyloid type structures have been positive for PrP^{Sc} from 263K and DY strains in its native state.

On the other hand, electron microscopy studies (TEM & cryo-TEM) strongly support the idea that PrP^{Sc} exhibits a fibrillar structure. The solubility showed by sPrP^{Sc}

fraction makes it particularly attractive for its application in cryo-TEM, given that it enables us to obtain of thinner vitrified samples which are essential for tomography studies.

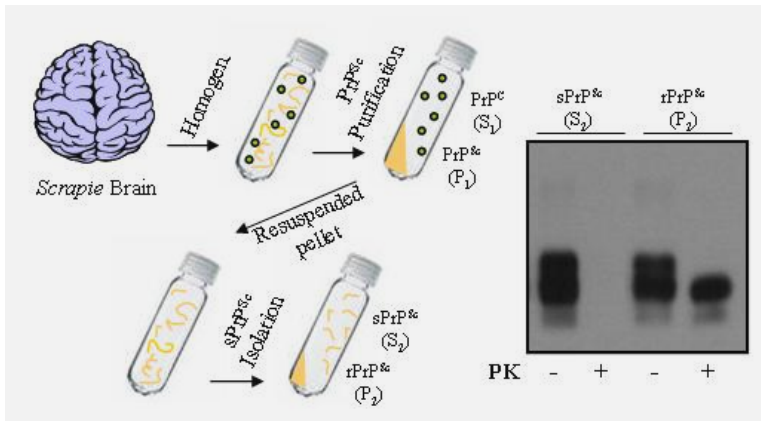


Figure 1C: Diagram of sPrP^{Sc} isolation procedure.

S: supernatant; P: pellet.

GLOSARIO

263K:	cepa de <i>scrapie</i> adaptada a hámster
2D:	bidimensional
3F4:	anticuerpo monoclonal primario de ratón que reconoce específicamente la PrP de humano y hámster
6H4:	anticuerpo monoclonal primario de ratón que reconoce específicamente la PrP
Å:	Angstrom
A:	adenina (base nitrogenada) o amperio
A11:	anticuerpo anti-oligómeros pre-amiloides
aa:	aminoácido
AB:	<i>assay buffer</i>
AC:	solución Azul Coomassie
ACN:	acetonitrilo
ACTH:	hormona adrenocorticotropa o corticotropina
ADN:	ácido desoxirribonucleico
AFM:	Microscopía de Fuerza Atómica (<i>atomic force microscopy</i>)
AP-1:	factor de transcripción (<i>activator protein-1</i>)
AP-2:	factor de transcripción (<i>activator protein-2</i>)
ARN:	ácido ribonucleico
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero
Bar:	unidad de presión equivalente a un millón de barias, aproximadamente igual a una atmósfera (1 Atm = 1,01325 bares)
BS ³ :	<i>bis(sulfosuccinimidyl) suberate</i>
BSA:	albúmina sérica bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
C:	citosina (base nitrogenada)
C-18:	matriz de fase reversa para desalar y concentrar péptidos y proteínas
CB:	tampón de conversión
CCD:	dispositivo de cargas [eléctricas] interconectadas (<i>charge-coupled device</i>)
CD:	dicroísmo circular (<i>circular dichroism</i>)
CDI:	inmunoensayo dependiente de conformación

Clin-Prot:	bolas magnéticas compuestas por micropartículas con superficie funcional (C-18) que unen péptidos y proteínas
Col.:	colaboradores
Crio-TEM:	crio-microscopía electrónica de transmisión
CSS:	<i>chemiluminiscent substrate solution</i>
DEPC:	dietilpirocarbonato
DL ₅₀ :	dosis letal 50 (dosis mínima capaz de inducir la muerte del 50% de los animales inoculados)
DO:	densidad óptica
dpi:	días post-infección
DTT:	ditiotreititol
DY:	drowsy (cepa de <i>scrapie</i> adaptada a hámster)
E:S:	enzima:sustrato
EA:	enfermedad de Alzheimer
ECJ:	enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (<i>CJD</i>)
ECL:	reactivos para detección quimioluminiscente por Western blot (sustrato)
EDC (<i>CWD</i>):	enfermedad debilitante crónica (<i>chronic wasting disease</i>)
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
EEAB (<i>BASE</i>):	encefalopatía espongiiforme amiloidea bovina (<i>bovine amyloidotic spongiform encephalopathy</i>)
EEB (<i>BSE</i>):	encefalopatía espongiiforme bovina (<i>bovine spongiform encephalopathy</i>)
EEF (<i>FSE</i>):	encefalopatía espongiiforme felina (<i>feline spongiform encephalopathy</i>)
EEG:	electroencefalograma
EET (<i>TSE</i>):	encefalopatía espongiiforme transmisible (<i>transmissible spongiform encephalopathy</i>)
EH:	enfermedad de Huntington
ELA:	esclerosis lateral amiotrófica
ELISA-DAS:	<i>enzyme-linked immunosorbent assay - double antibody sandwich</i>
EP:	enfermedad de Parkinson
EPR:	espectrometría de resonancia paramagnética electrónica [<i>electron paramagnetic resonance</i> o <i>electron spin resonance (ESR)</i>]

ESI-TOF:	ionización por electroespray - tiempo de vuelo (<i>electrospray ionization - time of flight</i>)
ETV (TME):	encefalopatía transmisible de visión (<i>transmissible mink encephalopathy</i>)
Fab:	region de unión al antígeno (<i>fragment binding antigen</i>)
FACS:	separación celular activada por fluorescencia (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
fg:	femto gramo
FIFFF:	<i>field flow field flow-fractionation</i>
FTIR:	espectroscopía infrarroja con transformación de Fourier (<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
g:	fuerza centrífuga relativa
G:	<i>gauge</i>
g:	gramo
G:	guanidina (base nitrogenada)
<i>g_{av}</i> :	fuerza centrífuga relativa promedio
GFAP:	proteína ácida fibrilar glial (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GPI:	glicofosfatidilinositol (<i>glycosylphosphatidylinositol</i>)
<i>Gpmaw</i> :	programa informático para análisis de proteínas
Grb2:	proteína adaptadora implicada en transducción de señal y comunicación celular (<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>)
GSS:	síndrome de Gerstmann-Sträussler-Sheinker
GTI:	células hipotalámicas de ratón
h:	hora
H8.5:	agua milli-Q, pH 8,5
HaPrP:	PrP de hámster
HCl-Gnd:	hidrocloruro de Guanidinio
HET-s:	prion de levadura (extraído del hongo filamentoso <i>Podospora anserina</i>)
HFIP:	hexafluoroisopropanol
HPLC:	cromatografía líquida de alta eficiencia (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HRP:	peroxidasa de rábano (<i>horseradish peroxidase</i>)
HY:	hyper (cepa de <i>scrapie</i> adaptada a hámster)

Hz:	hercio
ic:	intracerebral
ic-d.:	intracerebral dorsal
ic-l.:	intracerebral lateral
IFF (<i>FFI</i>):	Insomnio Familiar Fatal (<i>Fatal Familial Insomnia</i>)
IgG.	inmunoglobulina G
ip:	intraperitoneal
kb:	kilobases
kDa:	kilodalton
KO:	<i>Knock out</i>
Kuru:	“escalofrío” (EET humana)
kV:	kilovoltios
L:	litro
LC:	cromatografía líquida
<i>m/z</i> :	aplicación informática para el análisis espectrométrico
<i>m/z</i> :	masa/carga
M:	molar
mA:	miliamperio
mAb:	anticuerpo monoclonal (<i>monoclonal antibody</i>)
MALDI-TOF:	desorción/ionización láser asistida por matriz - tiempo de vuelo (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight</i>)
Mascot:	base de datos de proteínas
milli-Q:	agua desionizada
min:	minuto
ml:	mililitro
mm:	milímetro
mM:	milimolar
ms:	milisegundo
MS-MS	masas-masas
MTP:	<i>microtitre plate</i>
mV:	milivoltio
MW:	peso molecular (<i>molecular weight</i>)

N2A:	células de neuroblastoma murino
NA:	solución Negro Amido
NBH:	homogeneizado de cerebro sano (<i>nomal brain homogenate</i>)
NEB:	<i>New England Biolabs</i>
ng:	nanogramo
nl:	nanolitro
nm:	nanómetro
NMR:	resonancia magnética nuclear (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
nº:	número
Nor98:	<i>scrapie</i> atípico descrito por primera vez en Noruega en el año 1998
NP-40:	nonidet P-40 (detergente)
ns:	nanosegundo
nt:	nucleótido
NTCB	ácido 2-nitro-5-tiocianatonitrobenzoico
° C:	grado centígrado
ORF:	pauta de lectura abierta (<i>open reading frame</i>)
p/v:	peso/volumen
p:	probabilidad
pb:	pares de bases
PBS:	tampón salino fosfato (<i>phosphate buffer saline</i>)
PC12:	células de feocromocitoma de rata
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PG14 ^{RML} :	forma de PrP ^{Sc} infecciosa y resistente a proteasa expresada por los ratones Tg(PG14) inoculados con priones RML exógenos
PG14 ^{spn} :	forma de PrP mutante poco resistente a proteasa expresada espontáneamente por los ratones Tg(PG14)
PI:	periodo de incubación
PK:	proteínasa K
PKA:	proteín kinasa A
PMCA:	amplificación cíclica de proteínas anormalmente plegadas (<i>protein misfolding cyclic amplification</i>)
PMSF:	fenilmetanosulfonilfluoruro o fenilmetilsulfonil fluoruro

PNGasa F:	enzima deglicosidasa / N-Glicosidasa-F (NGF)
ppm:	partes por millón
Prion:	acrónimo de <i>proteinaceous infectious particle only</i> . Agente infeccioso no convencional que causa EET.
<i>Prnp</i> :	gen que codifica la proteína PRNP (PrP ^C)
PRNP:	proteína del prión codificada por el gen <i>Prnp</i>
PrP*:	intermediario del proceso de conversión de PrP ^C en PrP ^{Sc} , según el modelo de conversión inducida por molde
PrP:	proteína priónica
PrP106-126:	fragmento de PrP que abarca la secuencia 106-126 (péptido neurotóxico)
PrP27-30:	núcleo de PrP resistente a la digestión enzimática con proteinasa K
PrP ^C :	PrP celular (<i>cellular prion protein isoform</i>)
PrPres:	núcleo de PrP resistente a la digestión enzimática con proteinasa K
PrP ^{Sc} :	PrP patógena (<i>scrapie prion protein isoform</i>)
PVDF:	polímero de fluoruro vinilideno (<i>polyvinylidene difluoride</i>)
® o TM :	marca registrada (<i>trade mark</i>)
R1:	anticuerpo anti-PrP (extremo C-terminal)
R2:	anticuerpo anti-PrP (extremo C-terminal)
rec:	recombinante
recSHaPrP90-231:	PrP recombinante de hámster sirio (90-231)
RML:	cepa de <i>scrapie</i> adaptada a ratón
RMS:	error medio cuadrático (<i>root mean squared</i>)
RNasa:	ribonucleasa
<i>Rods</i> :	fibras con aspecto de “bastoncillo”, obtenidas tras tratamiento con PK en presencia de detergente, cuyo principal constituyente es la PrP27-30
RP:	solución Rojo Ponceau
rpm:	revoluciones por minuto
rPrP ^{Sc} :	fracción de PrP ^{Sc} resistente a PK (<i>PK-resistant PrP^{Sc}</i>)
s:	segundo
sa:	ácido sinapínico o ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico
SAF:	fibras asociadas a <i>scrapie</i> (<i>scrapie associated fibrils</i>)
Sark ó sk:	sarkosyl “ <i>N-Lauryl sarcosine sodium salt</i> ” (detergente aniónico)

SB:	<i>stripping buffer</i>
Sc237:	cepa de <i>scrapie</i> adaptada a hámster
<i>scrapie</i> :	“prurito lumbar” o “tembladera del cordero” (EET de ovejas y cabras)
SD:	solución de desteñido (<i>destaining solution</i>)
SDS:	dodecilsulfato sódico (<i>sodium dodecil sulphate</i>)
SDSL:	<i>site-directed spin labeling</i>
SDS-PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida – SDS (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SHaPrP ^{Sc} :	PrP ^{Sc} de hámster sirio
SN:	sistema nervioso
SNC:	sistema nervioso central
SP:	solución de preservado (para geles de poliacrilamida)
Sp1:	factor de transcripción
sPrP ^{Sc} :	fracción de PrP ^{Sc} sensible a PK (<i>PK-sensitive PrP^{Sc}</i>)
STI1:	<i>stress inducible fosfoprotein 1</i>
T:	timina (base nitrogenada)
T8.5:	tampón 20mM Tris/HCl; pH 8.5
T ^a :	temperatura
TB:	tampón de bloqueo
Tc:	tampón de carga
TE:	tampón de electroforesis (<i>running buffer</i>)
TEM:	microscopía electrónica de transmisión (<i>transmission electron microscopy</i>)
TFA:	ácido trifluoracético
Tg(PG14):	ratón transgénico que expresa PrP con una inserción de 9 octapeptidos repetidos asociados a una prionopatía familiar humana
TH:	tampón de homogenización
TIC:	<i>total ion current</i>
TL:	tampón de lavado
TNS:	tampón 10 mM Tris; 150 mM NaCl; 1% sarkosyl; pH 7.5
Torr:	presión ejercida por una columna de un milímetro de mercurio
tPrP ^{Sc} :	sPrP ^{Sc} + rPrP ^{Sc}

TS:	tiempo de supervivencia
TT:	tampón de transferencia (<i>transfer buffer</i>)
UA:	unidades arbitrarias
UV:	ultravioleta
v/v:	volumen/volumen
V:	voltio
vECJ (vCJD):	nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (nvCJD)
W226:	anticuerpo anti-PrP
WB:	western blot
WO1:	anticuerpo anti-fibras amiloides
XIC:	<i>extracted ion chromatogram</i>
Z-3,14:	N-tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato (detergente)
Zip-Tip:	punta de pipeta (polipropileno) de 10 μ l con una capa de matriz cromatográfica C-18 (<i>spherical silica, 15 μm, 200Å pore size</i>) fijada en su extremo
α -chc (hcca):	ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
β -OG:	n-Octil- β -D-glucopiranosido (detergente no aniónico)
μ :	micra
μ g:	microgramo
μ l:	microlitro
μ m:	micrometro

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Revisión histórica y aspectos generales

Los priones son los agentes infecciosos responsables de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) o prionopatías, un grupo de enfermedades de carácter neurodegenerativo y de fatal desenlace que afectan al ser humano y otros mamíferos. Al respecto, el planteamiento más aceptado propone que estos agentes transmiten información biológica en ausencia de un genoma provisto de ácidos nucleicos y consisten ante todo en PrP^{Sc}, una isoforma incorrectamente plegada y agregada de una proteína celular codificada en el hospedador, la proteína del prion (PrP^C), que se propaga mediante conversión autocatalítica y se acumula principalmente en el cerebro (1).

Históricamente, las primeras referencias a este tipo de neuropatías datan de hace más de 200 años en relación con la enfermedad de *scrapie* (“tembladera de cordero” o prurito lumbar) en ovejas y cabras. Posteriormente se identificaron este tipo de patologías en diferentes animales, entre las que destacan la enfermedad debilitante crónica o EDC en cérvidos (2), la encefalopatía espongiforme bovina o EEB (3), la encefalopatía transmisible de visón o ETV (4) y la encefalopatía espongiforme felina o EEF (5).

A diferencia con otras enfermedades neurodegenerativas, sólo las EETs son transmisibles. Esto hace que sean las únicas patologías cuya ruta de transmisión puede tener un origen triple:

✓ Hereditario o familiar: son inherentes en condiciones de dominancia autosómica y están causadas por una o varias mutaciones que afectan al gen *Prpn*, y por lo tanto afectan a la transmisión vertical (6).

✓ Esporádico o disperso: hipotéticamente causadas por un evento molecular raro, estocástico o aislado de conversión espontánea de PrP^C en PrP^{Sc}; aunque también se han relacionado con mutaciones somáticas.

✓ Infeccioso o adquirido: incluiría la transmisión horizontal (materno-filial), e incluso vertical (placenta), de la proteína infecciosa entre los individuos de una población; así como los casos iatrogénicos (praxis médica).

Experimentalmente se ha constatado que la transmisión del agente infeccioso a través de una inoculación directa sobre el SNC es más eficaz que cuando esta se efectúa por vía periférica u oral, lo que se traduce en periodos de incubación considerablemente más cortos. A pesar del tiempo transcurrido desde que se conocen ciertas EETs, poco se sabe sobre su origen y las rutas naturales de transmisión. El hecho de que sólo hayan aparecido visones afectados de ETV en cautiverio resulta un claro indicio a favor de que el contagio se estableciera por exposición a alimentos contaminados con el agente infeccioso, como posible vía de transmisión de esta patología.

La transmisibilidad de las encefalopatías espongiformes fue demostrada en 1936, cuando se logró infectar experimentalmente a ovejas con el agente del *scrapie*. El largo periodo de incubación, observado desde la inoculación hasta la manifestación de los primeros signos clínicos, llevó a Sigurdsson a referirse a este tipo de afección como “infección causada por un virus lento”. En la década de los 50 se detectó una enfermedad en la comunidad indígena de Papúa Nueva Guinea a la que se denominó *Kuru*, “escalofrío” en el idioma de los Fore (7). Esta enfermedad presentaba muchas similitudes con el *scrapie* en cuanto a sus manifestaciones clínicas, epidemiología y neuropatología, caracterizándose por la ataxia cerebelar, pérdida de coordinación en los movimientos, temblores, congestión de los vasos sanguíneos, parálisis, atrofia cortical y demencia, sucedidos por una muerte rápida. Este hecho sugirió que en realidad el *kuru* podría ser una enfermedad transmisible, hipótesis que sería corroborada posteriormente al inocular por vía intracerebral homogenados de cerebro infectados de *kuru* en chimpancés (8). Leyenda o realidad, se ha especulado con que el *kuru* se propagó a través de la ingesta caníbal de material contaminado durante la celebración de determinados ritos funerarios; aunque realmente no se puede descartar una mera transmisión cutánea a través de heridas, mucosas, etc. Igualmente, resulta probable que a lo largo de la evolución humana se hayan producido otras epidemias previas de similares características (9). En investigaciones posteriores se

logró transmitir experimentalmente otras muchas EETs a ratones, hámsteres, lemures (10) y otros primates (11).

A la vez que se identificaban nuevas EETs en animales, se fueron descubriendo otras patologías análogas en humanos, como el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Sheinker (GSS), el insomnio familiar fatal (IFF) y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ). Esta última acuñada por Spielmeyer basándose en descripciones previas de Creutzfeldt (1920) y Jakob (1921) en pacientes con este desorden. El 85% de los casos de ECJ son esporádicos y de etiología desconocida, siendo su incidencia de 1-2 individuos por millón de habitantes y año.

También se han descrito en humanos ciertas formas iatrogénicas de la enfermedad, cuyo origen se atribuye a la utilización de material quirúrgico u orgánico contaminado con priones durante la propia praxis médica. Esta circunstancia puede producirse durante el implante de tejidos (córnea, duramadre) o el uso terapéutico de derivados hipofisarios de origen humano, como en el caso de la hormona de crecimiento (12).

A menudo, las EETs cursan con una serie de alteraciones neurológicas entre las que destacan la ataxia cerebelar (descoordinación motora, inestabilidad o pérdida de tono muscular), hiperexcitabilidad, hiperestesia y demencia progresiva. A simple vista no se aprecia el verdadero daño cerebral en estos pacientes, sin embargo, un examen histopatológico *post-mortem* bajo el microscopio óptico revela una neuropatología caracterizada por cuatro rasgos principales (Figura 2):

- Degeneración esponjiforme (Espongiosis): anomalía histológica que consiste en la aparición de pequeñas vacuolas (20-200 micras de diámetro) en el citoplasma de las células neuronales.
 - Muerte neuronal.
 - Gliosis astrocítica (Astrogliosis reactiva): hipertrofia y proliferación de la astrogliá.
 - Placas amiloides de PrP^{Sc}.

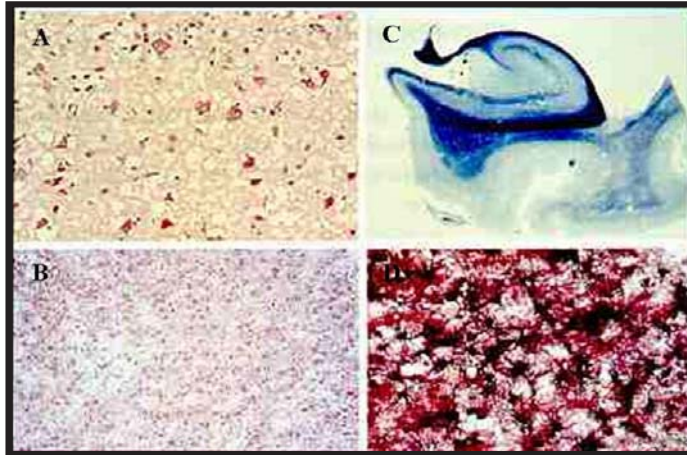


Figura 2: Neuropatología en las EETs.

A: Espongiosis. B: Gliosis. C: Placas amiloides. D: Pérdida neuronal.

Estas características constituyen la base del diagnóstico histológico y aunque puede encontrarse gran variabilidad entre individuos, e incluso entre diferentes regiones del sistema nervioso central (SNC), son compartidas en general por las prionopatías animales. De cualquier modo, tras una progresiva degeneración del sistema nervioso sobreviene inevitablemente la muerte. Durante la evolución de la enfermedad es frecuente la pérdida gradual de control muscular, atrofia, demencia y parálisis.

Desde un punto de vista fisiopatológico, la característica principal de estas afecciones es la acumulación de agregados de la isoforma PrP^{Sc} en el SNC. Parece muy probable que el periodo de tiempo necesario entre la infección y la manifestación de la enfermedad se deba precisamente a un proceso de neuroinvasión. Al tratarse de una proteína celular de expresión ubicua, los individuos afectados por priones no manifiestan una respuesta inflamatoria o fiebre. Esto es indicativo de que las infecciones causadas por priones no generan la activación del sistema inmunológico, lo que dificulta el diagnóstico de este tipo de afecciones.

Desde el punto de vista epidemiológico y económico, la prionopatía animal con mayor impacto social ha sido indudablemente la encefalopatía espongiforme bovina

(EEB), comúnmente conocida como “mal de las vacas locas”. En 1985 se detectó por primera vez esta enfermedad de carácter epizootico en el ganado bovino británico, manifestándose clínicamente como una afección nerviosa acompañada de comportamiento agresivo y ansioso. El análisis anatomopatológico del cerebro de estos animales mostró un patrón de lesiones muy semejantes a las descritas en el scrapie de ovejas y cabras. Desde el origen de la epidemia se estima que se han infectado más de 2 millones de vacas en el Reino Unido (http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm). La EEB se extendió rápidamente a otros países incluyendo varios estados de la Unión Europea, Estados Unidos, Canadá, y Japón (13). La ausencia de un método de diagnóstico eficaz que permitiera la identificación de animales en fases preclínicas obligó al sacrificio masivo e indiscriminado de los animales como medida preventiva, evidenciando la necesidad urgente de profundizar en la etiología, patogenia y obtención de métodos de diagnóstico para esta enfermedad. En España, tras la aplicación generalizada de los test rápidos *post-mortem*, la enfermedad se diagnosticó por primera vez en Galicia, habiéndose contabilizado hasta la fecha (Junio de 2008) 282 casos de un total de 728 casos oficiales de EEB en todo el estado (<http://www.eeb.es/pags/espana.htm>).

Los signos clínicos de la EEB aparecen típicamente entre los cuatro y cinco años de edad como una aprensión progresiva, hiperestesia y descoordinación del paso, sobreviniendo la muerte después de 1-6 meses. Al igual que sucede en el *scrapie* de la oveja, los cambios más notorios en el perfil histopatológico de la EEB consisten en astrogliosis, vacualización intracelular, pérdida de neuronas y formación de placas amiloides ocasionales.

Aunque el origen de esta epidemia de la EEB permanece desconocido hasta el momento, se barajan principalmente dos hipótesis. Una de ellas atribuye la diseminación de la enfermedad a la transmisión interespecie del *scrapie* (endémico en el Reino Unido) desde ovejas y cabras a través de piensos y harinas cárnicas (hueso y carne) preparadas con restos de animales contaminados y destinadas al suplemento alimenticio del ganado bovino, ovino y caprino. No obstante, una hipótesis alternativa sugiere la existencia de una EEB esporádica o hereditaria desconocida por su baja prevalencia, cuya introducción en la cadena alimenticia del ganado vacuno pudo provocar su dispersión. En ambos casos, la

reintroducción de nuevas vacas afectadas en la cadena alimenticia favorecería su diseminación en la cabaña bovina y la consiguiente epidemia. La ausencia de variación en el patrón de vacuolización del tejido encefálico en el ganado afectado, tanto en casos naturales como en infecciones experimentales, sugiere la posibilidad de que el origen de la epidemia de EEB resida en una única cepa de prión.

La aparición en humanos a mediados de los años 90 de una nueva variante de ECJ (nvECJ) con características de cepa diferenciables de otros tipos de ECJ se ha atribuido al consumo de carne contaminada con EEB (6;14-16); siendo este el origen más probable, el riesgo para la salud pública resulta evidente (17). Se han contabilizado más de 200 casos mortales (<http://www.cjd.ed.ac.uk/vcjdworld.htm>; <https://www.who.org>), al menos cuatro de ellos por transmisión iatrogénica, y se desconoce a ciencia cierta si la epidemia se encuentra en una fase ascendente o descendente; por lo tanto, no se ha descartado una posibilidad de fatales consecuencias, como lo es el hecho de que pudieran existir numerosos individuos portadores de priones que con el tiempo acaben desarrollando la dolencia. El análisis molecular (perfil de bandas y de glicosilación); los prolongados y clínicamente silentes periodos de incubación observados en epidemias previas de enfermedades priónicas, que en humanos puede superar los 50 años (18); el propio efecto genético sobre la barrera de transmisión; y la transmisibilidad potencial de la EEB a otras especies son algunos de los argumentos esgrimidos a favor de esta hipótesis y que inducen a la cautela (17). A partir de aquí resulta incuantificable el riesgo de transmisión iatrogénica secundaria por transfusión sanguínea (19), trasplantes o contaminación con material quirúrgico, dado que los priones resisten los métodos rutinarios de esterilización (14;17;20). Al contrario que en la ECJ “clásica”, la mayor parte de los casos de vECJ ocurren en individuos jóvenes menores de 29 años.

Colchester *y col.* sitúan el origen de la EEB en una EET humana transmitida oralmente al ganado bovino a través de la dieta. El estudio sugiere que el ganado vacuno habría estado expuesto a piensos contaminados con restos humanos mezclados entre las grandes cantidades de carne de otros mamíferos, importada desde la India durante largo tiempo para su elaboración (21). Sus autores argumentan que de este modo se habría facilitado el posterior salto de especie a humanos.

Naturaleza del agente infeccioso

En un gran número de patologías humanas o animales causadas por agentes convencionales como virus y bacterias, el patógeno se reproduce en el organismo del huésped de un modo relativamente rápido, y no resulta infrecuente disponer de un método de identificación del agente causal que permite realizar a tiempo un diagnóstico específico e incluso procurar un tratamiento adecuado para prevenir el desarrollo de la enfermedad. Los primeros intentos para aislar el agente infeccioso causante de las EETs, los largos periodos de incubación observados y la ausencia de respuesta inmunitaria enseguida constataron que no se trataba de un agente convencional. Además, su extraña naturaleza le confería resistencia frente a los tratamientos con agentes físico-químicos que normalmente inactivarían tales agentes. Mediante técnicas radiológicas se demostró que la infectividad asociada al *scrapie* era extremadamente resistente a la radiación ultravioleta (UV) e ionizante (22;23). Consecuentemente, en 1967, Griffith sugirió que el agente causante podría ser una proteína, hipótesis que sería acogida con un enorme escepticismo (24).

En el año 1982, Stanley B. Prusiner retomó la idea original de Griffith y enunció la hipótesis de “solo proteína”, acuñando el término de **prion** (“*proteinaceous infectious particle*”) para referirse precisamente a esas partículas infecciosas de naturaleza proteica resistentes a tratamientos capaces de alterar los ácidos nucleicos. Esta hipótesis propone que el componente patógeno es esencialmente una glicoproteína con capacidad de autorreplicación conformacional en ausencia de ácido nucleico (1;25).

El aislamiento de la proteína del prión, PrP^{Sc} de *scrapie*, a partir de material infeccioso (26) supuso un gran avance, ensanchando el campo de experimentación dirigido a elucidar la naturaleza del agente etiológico. Mediante técnicas bioquímicas e inmunológicas se demostró que la PrP^{Sc} y la infectividad copurifican, y que la concentración de proteína era directamente proporcional al título de infectividad (27). Los intentos por encontrar alguna proteína distinta de la PrP^{Sc} en fracciones enriquecidas en infectividad atribuible a priones han sido en vano, lo que redundó en el origen único de estas enfermedades. Asimismo, preparados altamente purificados de PrP^{Sc}, donde no son detectables otros componentes, retienen infectividad; por el contrario, esta se ve reducida

con el uso de anticuerpos anti-PrP o con los tratamientos que degradan o alteran la conformación de las proteínas, tales como: urea 8M; fenol; SDS; DEPC; tripsina; isotiocianato o hidrocloreuro de guanidinio en altas concentraciones; proteinasa K.

Para sorpresa de la comunidad científica, los estudios genéticos verificaron que la PrP estaba codificada en un gen del huésped, el gen *Prnp*, detectándose la presencia del correspondiente ARNm tanto en cerebros de animales sanos como en aquellos afectados de *scrapie*; así como en otros muchos tejidos. A su vez, la ausencia de ácidos nucleicos en preparados enriquecidos con priones sugería que la PrP no estaba codificada por un supuesto material genético aportado por la partícula infecciosa (28;29). La confirmación de que todas las formas familiares de EETs están ligadas a mutaciones en el gen de la PrP supuso un nuevo apoyo a la hipótesis de “solo proteína”. Dado que la PrP^C aparece en todos los mamíferos estudiados, potencialmente son susceptibles de padecer algún tipo de afección de origen priónico. Por otro lado, el hecho de que los ratones *knock out* para el gen de la PrP^C presenten resistencia total a la infección tras ser inoculados intracerebralmente con priones, constituye la mejor prueba a favor de la hipótesis de Prusiner y de la necesidad de PrP^C como sustrato para la producción de PrP^{Sc}; máxime habiéndose demostrado que esta situación es reversible, es decir, que la susceptibilidad de estos ratones a priones murinos puede restablecerse reinsertando en su genoma el gen de la proteína del prión.

El análisis de las observaciones obtenidas de los diversos estudios de biología molecular, celular y genética de las EETs sugirió una hipótesis acerca del origen de estas patologías y de su supuesto mecanismo de propagación. De este modo, la PrP presenta dos variantes con idéntica secuencia primaria, una isoforma celular (PrP^C) de expresión ubicua y una isoforma patógena (PrP^{Sc}). Dado que ni el análisis de la secuencia de aminoácidos, ni el estudio de modificaciones post-traduccionales lograron determinar diferencias entre una y otra, se sugirió que ambas isoformas difieren en aspectos de carácter conformacional que afectan a la estructura de la molécula. En este sentido no tardó en verificarse que la forma patógena se caracterizaba por poseer un mayor porcentaje de estructura en hoja- β (30;31).

Todas estas consideraciones llevaron a Prusiner a formular su hipótesis del prión, según la cual, la PrP^{Sc} es el agente infeccioso y deriva de la PrP^C a través de un proceso

autocatalítico de transformación postraducional que impide un plegamiento correcto de la proteína. El inicio del proceso requiere la presencia de PrP^{Sc}, la cual imprime su conformación aberrante en la PrP^C endógena, que actúa como sustrato necesario durante el proceso de conversión (1). Aunque se desconocen los detalles del mecanismo molecular de conversión, el cambio conformacional confiere a la PrP^{Sc} nuevas propiedades bioquímicas y biofísicas. Esto conlleva una especial tendencia a formar agregados, en ocasiones de tipo amiloide, que la diferencian de la PrP^C por exhibir una gran resistencia parcial a la digestión con proteasas y por su insolubilidad en presencia de detergentes no iónicos (25). Característicamente el tratamiento con proteinasa K (PK), la proteasa más utilizada, digiere por completo la PrP^C, mientras que en la PrP^{Sc} provoca un truncamiento N-terminal, en torno a la posición ~90, que da lugar a la formación de un núcleo resistente de 27-30 kDa (32), conocido como PrP27-30 o PrPres. Por su movilidad electroforética, este fragmento es fácilmente distinguible de la proteína celular completa (33-35 kDa).

A pesar de la existencia de otro tipo de aproximaciones y de marcadores de orientación poco específicos, el diagnóstico definitivo de las EETs se realiza *post-mortem* mediante la toma de muestras de tejido nervioso en el individuo afectado y la detección bioquímica de PrPres (*ELISA* o *Western blot*). Por lo que la presencia de este fragmento de PrP^{Sc} resistente a proteinasa K se ha convertido en el único marcador válido de la enfermedad. No obstante, en las EETs el agente infeccioso se replica lentamente en el organismo, de modo que los niveles de PrP^{Sc} sólo son detectables en los órganos donde esta se acumula y muy cerca de la fase sintomática de la enfermedad. No cabe duda de que el desarrollo de métodos de diagnóstico precoz *in vivo* para la detección de PrP^{Sc}, o de marcadores secundarios, en otros tejidos o fluidos, como sangre u orina, supondría un gran avance en la prevención de las EETs.

A nivel molecular, una misma secuencia de aminoácidos puede dar lugar a más de una conformación tridimensional. A pesar de tener una conformación nativa estable, algunas proteínas logran estabilizarse adoptando otra conformación característicamente rica en láminas β . Una de las consecuencias del aumento del contenido en lámina- β es la generación de interacciones intramoleculares que inducen un proceso de oligomerización y/o agregación de la proteína anómala, pudiendo formar depósitos fibrilares en diferentes

tejidos. Ocasionalmente, la PrP^{Sc} forma fibras amiloideas que se acumulan en el SN formando diversos tipos de depósitos. Aunque las propiedades biofísicas, bioquímicas o biológicas pueden variar, estos depósitos presentan características morfológicas, estructurales y tintóreas similares: se tiñen específicamente con Rojo Congo y Tioflavina S; poseen una mayor resistencia a la degradación proteolítica; presentan un aspecto fibrilar bajo el microscopio electrónico. No obstante, se desconoce el papel que juegan estos depósitos de PrP^{Sc} en relación al daño cerebral, y si estos son causa o efecto de la enfermedad.

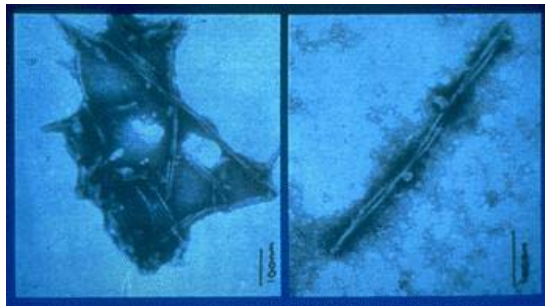


Figura 3: Prion Rods. Imágenes de TEM mostrando Rods.

Mediante microscopía electrónica pronto se detectaron unas “fibrillas asociadas a *scrapie*” (SAF) en cerebros infectados. Además, estas copurificaban con la infectividad (33-35). Posteriormente, se obtuvieron imágenes de fibras a modo de “bastoncillos” o “Prion Rods” (Figura 3) en preparados enriquecidos con el agente infeccioso y tratados con PK en presencia de detergentes, donde precisamente la PrP₂₇₋₃₀ resultó ser el principal constituyente (36-38).

El estudio de los priones adquiere una gran relevancia para la comprensión de los procesos neurodegenerativos en las EETs y otras enfermedades relacionadas con la acumulación de proteínas mal plegadas en el hospedador (“enfermedades conformacionales de proteínas”). Procesos análogos se han descrito en hongos y levaduras. Aspectos fundamentales del paradigma priónico y de su mecanismo de propagación permanecen a día de hoy irresueltos. Se ha hipotetizado que los priones se autopropagan formando

estructuras fibrilares o amiloides de PrP que constituyen la entidad infecciosa, y que la fragmentación de estas fibras se traduce en un incremento exponencial de la concentración del agente infeccioso (39;40).

La proteína celular: PrP^C

La PrP^C es una sialoglicoproteína soluble y monomérica de ~250 residuos anclada a la membrana plasmática por su cara extracelular a través de un dominio de anclaje a glicosil fosfatidil inositol (GPI).

El gen de la PrP: Prnp

El gen *Prnp* fue identificado en 1986 (41). Este gen se expresa de forma constitutiva en prácticamente todos los tejidos del organismo, alcanzando su expresión máxima en tejidos neuronales, fundamentalmente en el cerebro, cerebelo e hipotálamo. Se trata de una secuencia altamente conservada en todos los mamíferos con un grado de identidad del 80-90%. Existe una única copia del gen de la PrP localizada en el brazo corto del cromosoma 20, 2, y 13 de humano, ratón y vaca, respectivamente. En el humano y en el hámster, este gen está constituido por dos exones, el primero no codificante y separado por un intrón de 10 Kb del segundo exón (2 Kb), que contiene toda la pauta de lectura abierta (ORF) (Figura 4). Este hecho descarta un corte y empalme alternativo del ARNm (“*splicing*”) como posible causa de la generación de PrP^{Sc}. Posteriormente, se vio que esta peculiaridad era extensiva a todos los genes de PrP conocidos en aves y mamíferos. El gen de la PrP murina, ovina y bovina dispone de tres exones, siendo el tercero el que contiene la pauta de lectura abierta completa. El promotor del gen ha sido identificado en el ratón, el hámster, la rata, la vaca y el ser humano. Tras el promotor, encontramos una caja TATA y una región rica en GC que permite la unión de diversos factores de transcripción como: Sp1; AP-1; AP-2 (42). El 15% de las enfermedades priónicas en humanos se ha correlacionado con alguna de las más de 20 mutaciones identificadas en el gen de la PrP.

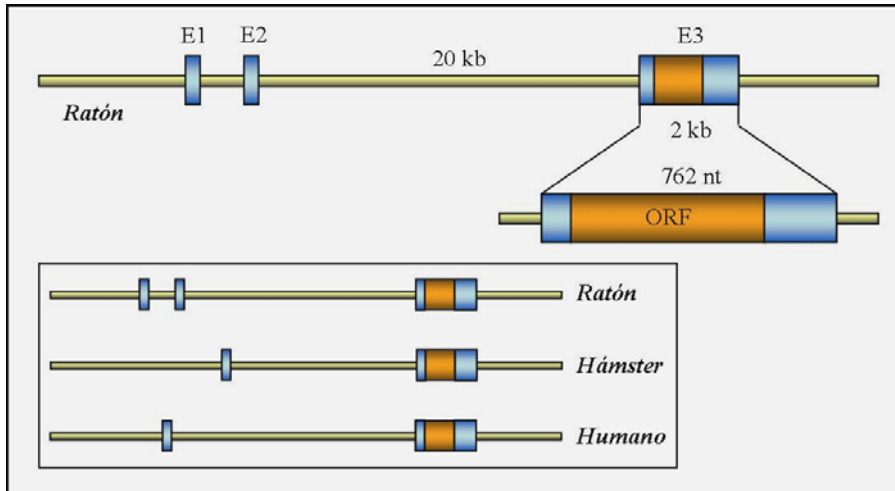


Figura 4: Esquema del gen de la PrP (*Prnp*). Esquema del gen *prnp* en tres especies distintas de mamífero: ratón, hámster y humano.

Estructura primaria

La PrP^C es una proteína de 33-35 kDa altamente conservada entre las distintas especies. Está constituida por 253 aminoácidos en la especie humana, 254 en ratón y hámster y 256 en la vaca. Distinguimos 5 regiones a lo largo de su secuencia primaria (Figura 5):

➤ *Región 1-22*: péptido señal que dirige la proteína hacia el retículo endoplasmático donde será digerida.

Región 23-91: región muy conservada donde se ubican una serie de repeticiones de octapéptidos ricos en glicina y prolina. Se ha mostrado que estas octarrepeticiones son capaces de unir cobre y zinc (43-46), y aunque su significado funcional es controvertido, se han propuesto toda una serie de roles en los que podrían estar implicados (47;48). El número de repeticiones está bastante conservado dentro de una determinada especie; así, son 5 en el ser humano y en el ratón, mientras que en la vaca pueden ser 5, 6 ó 7.

Inserciones o deleciones en esta zona de la proteína humana están asociadas con la aparición de enfermedades familiares.

➤ *Región 92-135*: región hidrofóbica altamente conservada a la que se asocia un papel crucial en la conversión de PrP^C en PrP^{Sc} (49). Una simple mutación (A117V) puede conducir espontáneamente el desarrollo de este tipo de patologías, tanto en el hombre como en animales. Los fragmentos peptídicos correspondientes a la secuencia 106-126 (PrP106-126) son neurotóxicos para cultivos celulares y susceptibles de formar fibras (50).

➤ *Región 136-231*: contiene dos sitios de N-glicosilación en las asparraginas 181 y 197 (51;52). Durante el proceso de síntesis, a su paso por el aparato de Golgi, la incorporación de dos, una o ninguna cadenas azucaradas genera las tres especies electroforéticas características de PrP^C, que se corresponden con las formas diglicosilada, monoglicosilada y no glicosilada, respectivamente (52). La proporción de cada una de ellas puede variar entre diferentes cepas. La presencia en esta región de dos cisteínas en las posiciones 179 y 214 forman un puente disulfuro intracatenario. Finalmente, en la posición 231 hay una serina a la que se une el grupo glicofosfatidilinositol (GPI), responsable del anclaje de la proteína a la cara externa de la membrana celular (53;54).

➤ *Región 232-253*: secuencia C-terminal hidrofóbica que se digiere durante la maduración de la proteína y que sirve de péptido señal para el anclaje del grupo GPI (53).

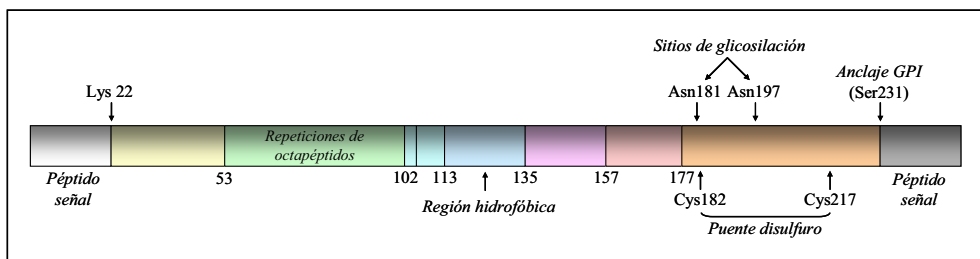


Figura 5: Estructura primaria de la PrP^C.

Estructura secundaria y terciaria

La estructura de la PrP^C ha sido ampliamente analizada (55-57) y, en general, se aprecia un alto grado de conservación entre especies (56). A nivel de estructura secundaria, los análisis de espectroscopía infrarroja con transformación de Fourier (FTIR) determinaron que la PrP^C madura, purificada y en su estado nativo contiene un ~42% de α -hélice y un ~3% de hoja- β . Estos resultados fueron confirmados mediante dicroísmo circular, CD (30).

No obstante, la estructura terciaria de la proteína celular fue definitivamente establecida mediante estudios de espectroscopía con resonancia magnética nuclear (NMR) y análisis cristalográfico por difracción de rayos-X (55;57-61). Dicha estructura consiste en un dominio globular C-terminal con tres hélices- α largas y dos hojas- β cortas y antiparalelas que se conectan a través de cuatro lazos y conforman un núcleo ordenado (Figura 6). A su vez, las hélices- α 2 y 3 se unen por un puente disulfuro. En la región N-terminal, existe un largo segmento de ~90 residuos aminoacídicos a modo de cola desestructurada y flexible en solución (62). Esta región alberga la secuencia octapeptídica repetida en tándem.

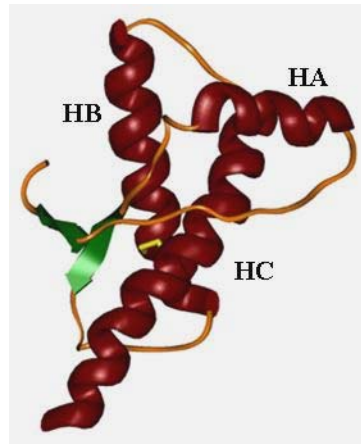


Figura 6: Conformación propuesta para PrP^C.

Las tres hélices- α se han indicado como HA, HB y HC.

Expresión y localización

La traducción de la PrP^C comienza en el citoplasma desde donde tiene lugar su translocación al retículo endoplasmático mediada por el péptido señal N-terminal. Mientras este péptido se digiere en el retículo, el resto de la proteína se dirige al aparato de Golgi donde tienen lugar las modificaciones postraduccionales: incorporación de oligosacáridos, formación del puente disulfuro, eliminación del péptido señal C-terminal, incorporación del grupo GPI, y el consiguiente anclaje a la membrana (Figura 7). Existe un amplio patrón de expresión para la PrP^C que incluye el músculo esquelético, riñón, corazón, sistema linforreticular y SNC (63;64). Dentro de este último, se ha detectado un alto nivel de PrP^C en las membranas sinápticas de neuronas (65) y astrocitos (66). En la periferia, se ha encontrado en linfocitos, células dendríticas foliculares y eritrocitos (63). La PrP^C también aparece en fluidos corporales como el plasma y la leche.

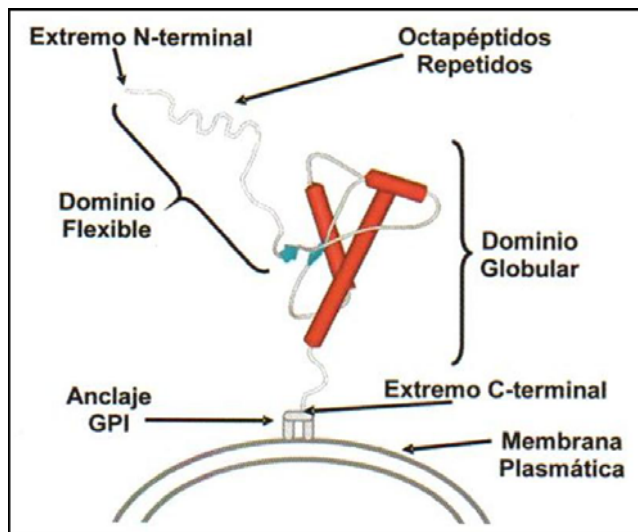


Figura 7: Anclaje a la membrana de la PrP^C.

Al igual que otras proteínas que unen grupos GPI, la PrP^C se localiza en la superficie celular asociada a microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos insolubles a los detergentes (*rafts*), pero por contra su vida media es de 3-6 horas (67). El tráfico

intracelular parece estar sometido a un ciclo de reciclaje desde la superficie celular, si bien, la proteína pierde parte del extremo amino terminal (68). Es posible que la función de este ciclo esté relacionada con el transporte de un ligando extracelular hacia el citoplasma (69). Hasta la fecha, no se ha encontrado un receptor para la PrP^C.

Función biológica

A pesar de que el gen *Prnp* fue identificado en 1986 (41) y que se dispone de ratones *knock out* desde 1992 (70), la función fisiológica de la PrP^C aún no ha sido clarificada. Muchos autores coinciden en que el conocimiento de su función puede ayudar a comprender las características fisiopatológicas de los priones en general (71). En cualquier caso, los elevados niveles de expresión de esta proteína en el cerebro, que dicha expresión esté bien regulada durante el proceso de desarrollo, su expresión en otros tejidos del organismo, y su alto grado de conservación entre especies, no presagian que se trate de una función realmente dispensable. Junto a la ausencia de un fenotipo alterado en los ratones *knock out*, se ha constatado que la eliminación postnatal de PrP^C no desencadena neurodegeneración (72). Sin embargo, la dimerización de PrP^C si parece inducir una señal apoptótica. También se ha sugerido la posibilidad de que la PrP^C actúe regulando la proliferación de precursores neurales durante la neurogénesis de mamíferos en etapa de desarrollo y adulta (73). Sea cual sea la función que desempeñe la PrP^C, el hecho de que esta pueda perderse o verse alterada por la unión a PrP^{Sc}, o durante el propio proceso de conversión, podría constituir en sí mismo la causa de la neurodegeneración (74), especialmente si se consideran funciones relacionadas con transducción de señales, antiapoptosis y neuroprotección; si bien, el fenotipo de los ratones KO para PrP no parece apoyar esta última hipótesis. Tal vez, la propia presencia de los agregados de PrP^{Sc} resulte tóxica para la célula, con lo que se establecería un cierto paralelismo con otras enfermedades de carácter neurodegenerativo como el Alzheimer (75).

Entre la gran variedad de funciones atribuidas a la PrP^C se incluyen: inmunorregulación, protección ante el estrés oxidativo, transmisión sináptica, unión a cobre, transducción de señales de supervivencia neuronal y crecimiento axonal, inducción

de apoptosis o protección frente al estímulo apoptótico, mantenimiento de la estructura sináptica, adhesión celular, regulación del ciclo celular y otras (63).

- *Transmisión sináptica.* Se apoya principalmente en la localización de la PrP^C a nivel de las membranas y vesículas presinápticas (65); y en su interacción directa con proteínas implicadas en vías de señalización, como la fosfoproteína sinapsina Ib y la proteína adaptadora Grb2, con las que co-inmunoprecipita (76). Esto sugiere un papel en el reciclaje de vesículas y en la actividad sináptica; además, su ausencia repercute en la capacidad de almacenamiento de señal neuronal.

- *Unión a cobre.* La PrP^C une cobre con alta afinidad (44) y de una forma selectiva con respecto a otros cationes (77). La unión goza de un carácter cooperativo a través de cuatro sitios de unión idénticos en la región altamente conservada de octapéptidos repetidos del extremo N-terminal (78). Parece probable que la internalización de la PrP^C sea una manera de transportar cobre desde los compartimentos extracelulares a los intracelulares. De esta manera, la PrP^C podría actuar en la regulación de la concentración de cobre presináptico como un aceptor, capturándolo y cediéndolo a otros transportadores.

- *Función neuroprotectiva.* La co-localización de la PrP^C, junto a la alta concentración de receptores y otras moléculas que participan en señalización en los dominios ricos en colesterol de las membranas sinápticas (79), apunta a una posible implicación de la PrP^C en funciones señalizadoras. Se ha propuesto que la interacción de la PrP^C a la proteína STII (*stress inducible protein 1*), presente en estos dominios, provocaría una señal de supervivencia a través de la vía de señalización de la PKA. Durante el desarrollo de la enfermedad, los cambios conformacionales asociados a la conversión de la PrP^C producirían una disminución de la afinidad por el ligando, eliminando la señal e imposibilitando la acción neuroprotectiva (74).

La isoforma infecciosa: PrP^{Sc}

Respecto de la PrP^C, la PrP^{Sc} es una forma anómala, agregada e infecciosa que se constituye en el único agente responsable de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) conocido hasta la fecha. La principal diferencia entre ambas isoformas se atribuye a un cambio de carácter conformacional.

Características bioquímicas

La presencia de dominios hidrofóbicos en la PrP^{Sc} le confieren una serie de características biofísicas y bioquímicas diferenciales frente a la PrP^C (80):

- ✓ La PrP^{Sc}, al contrario que la PrP^C, es insoluble en detergentes no iónicos (81).
- ✓ La PrP^{Sc} es parcialmente resistente a la digestión con proteasas, en tanto que la PrP^C es completamente sensible a la proteólisis en las mismas condiciones. Cabe destacar que la resistencia parcial es función de la concentración del enzima, y de las condiciones de temperatura y duración de la digestión.
- ✓ La PrP^{Sc} se acumula *in vivo* y posee un gran tendencia a polimerizar; mientras que la PrP^C es monomérica y se degradada rápidamente.

Estructura secundaria, terciaria y cuaternaria

La elucidación de la estructura de PrP^{Sc}, esencial para comprender los mecanismos moleculares que rigen el proceso de transmisión, continúa siendo uno de los mayores desafíos en la investigación sobre priones. El carácter insoluble y polimérico de la PrP^{Sc} han impedido cristalizar los agregados heterogéneos que la constituyen, obstaculizando el análisis estructural y frustrando la posibilidad de aplicar las técnicas de difracción de rayos-X o espectroscopía de NMR, y en consecuencia, la obtención de información estructural de alta resolución. No obstante, se ha logrado determinar algunas de sus características estructurales. Las diferencias entre PrP^C y PrP^{Sc} aparecen a nivel de estructura secundaria,

terciaria y cuaternaria. Los estudios realizados mediante FTIR indicaron que la transición de PrP^C a PrP^{Sc} estaba asociada a una disminución en el contenido en hélice- α (~30%) y a un incremento de la proporción de estructura en hoja- β (~43%). En otro estudio, la espectroscopía de infrarrojos sobre PrP27-30 en agua establece un 47-54% de hoja- β , un 17-21% de hélice- α , y un porcentaje significativo (31%) en forma de lazo (30;31).

Los primeros estudios de la ultraestructura de la PrP^{Sc} basados en la detección y el análisis de cristales bidimensionales de PrP27-30 - y del “miniprion” (PrP106-126) - mediante microscopía electrónica (82;83) establecieron una serie de importantes restricciones estructurales muy a tener en cuenta en cualquier propuesta estructural para PrP^{Sc}. Aquí se plantea que los monómeros de PrP^{Sc} pueden empaquetarse en una red de celdillas hexagonales, cuyas dimensiones determinadas por difracción electrónica son $a = b = 69 \text{ \AA}$ y $\gamma = 120^\circ$ (Figura 8A). Aunque con un cierto carácter especulativo, la combinación de datos biofísicos y el análisis informático, usando una serie de algoritmos matemáticos, ha servido para inferir distintos modelos estructurales de PrP^{Sc} (84-88). En base a las citadas micrografías y a estudios de modelización, Govaerts *y col.* (84) propusieron que la porción de la secuencia del prion correspondiente a los residuos 89-175 - en ratón - adquiriría una estructura en hélice- β . Estos autores interpretan que la secuencia de PrP es compatible con una conformación en hélice- β con disposición levógira y en paralelo, interrumpida por dos lazos alojados entre las posiciones K100-P104 y E145-R163, que puede ensamblarse formando trímeros (Figura 8B-1). Así mismo, se propone que los discos de trímeros se podrían apilar gracias a las interacciones que se establecerían entre sus respectivas hélices- β , cuyas subunidades se expanden desde el residuo 89 al 174 (numeración en ratón), dando lugar a una fibrilización de tipo amiloide (Figura 8B-4). Este modelo trimérico es compatible con las micrografías 2D obtenidas por Wille *y col.* (Figura 8B-2 y 3), sin embargo, no es menos cierto que son muchas las conformaciones que podrían caber en esta celdilla hexagonal. Así, una interpretación alternativa de la red de celdillas hexagonales consistiría en el empaquetamiento de los monómeros de PrP^{Sc} en el plano de la rejilla del microscopio electrónico. Bajo esas condiciones, un embaldosado hexagonal ofrece una manera muy eficiente de ocupar el máximo espacio posible, y las dimensiones de cada celda estarían definidas por el contorno formado por los elementos α -helicoidales localizados en la periferia, así como por los azúcares y el grupo GPI unidos a estos. Dada la

flexibilidad de los lazos que conectan tales elementos al núcleo amiloide, estos podrían quedar en un nivel diferente con respecto a dicho núcleo, lo que proporcionaría un espacio extra para empaquetar los voluminosos azúcares y el GPI. Además, como sugirieron recientemente Carulla *y col.* para agregados amiloides (89), esos monómeros de PrP^{Sc} podrían estar en equilibrio dinámico con las fibras de PrP^{Sc}.

En otro modelo, la estructura de la PrP^{Sc} se deriva de una simulación molecular dinámica bajo condiciones amiloidogénicas (85). En esta simulación para la estructura protofibrilar del prión, las hojas- β se extienden alternativamente de manera paralela y antiparalela formando láminas en espiral sobre el eje de la fibra (Figura 8C-1 y 3). En adelante, DeMarco *y col.* (88) establecen una comparación entre este modelo en espiral y el modelo en hélice- β (84) y paralelamente los contrastan con la información estructural disponible en la literatura (micrografías electrónicas; simetría; estructura secundaria; digestión enzimática; interfase de oligomerización; exposición de epitopos; y perfiles de desagregación). La hélice A se conserva ampliamente en el modelo en espiral, mientras que en el modelo en hélice- β sufre importantes cambios de conformación (pasando a formar parte de la hélice- β y de un lazo desestructurado), lo que constituye una de las grandes diferencias entre ambos modelos. El modelo en espiral también es compatible con las micrografías 2D (Figura 8C-2) de Wille *y col.* (83), y aunque se basa en una mera modelización, sus autores destacan su consistencia con el resto de los resultados experimentales previos, a la par que señalan las dificultades para encajar algunas de estas observaciones con el modelo en hélice- β .

En los últimos tiempos, se han descrito determinados segmentos en “cremallera estérica” formados por dos láminas- β fuertemente interdigitadas dentro de la arquitectura atómica en “*cross-beta spine*” (apilamiento de pares de láminas- β firmemente empaquetadas) definida por Eisenberg *y col.*; estructura que se observa en diferentes proteínas que forman fibras amiloides, asociadas a diversas enfermedades, y entre las que se incluye la PrP (90).

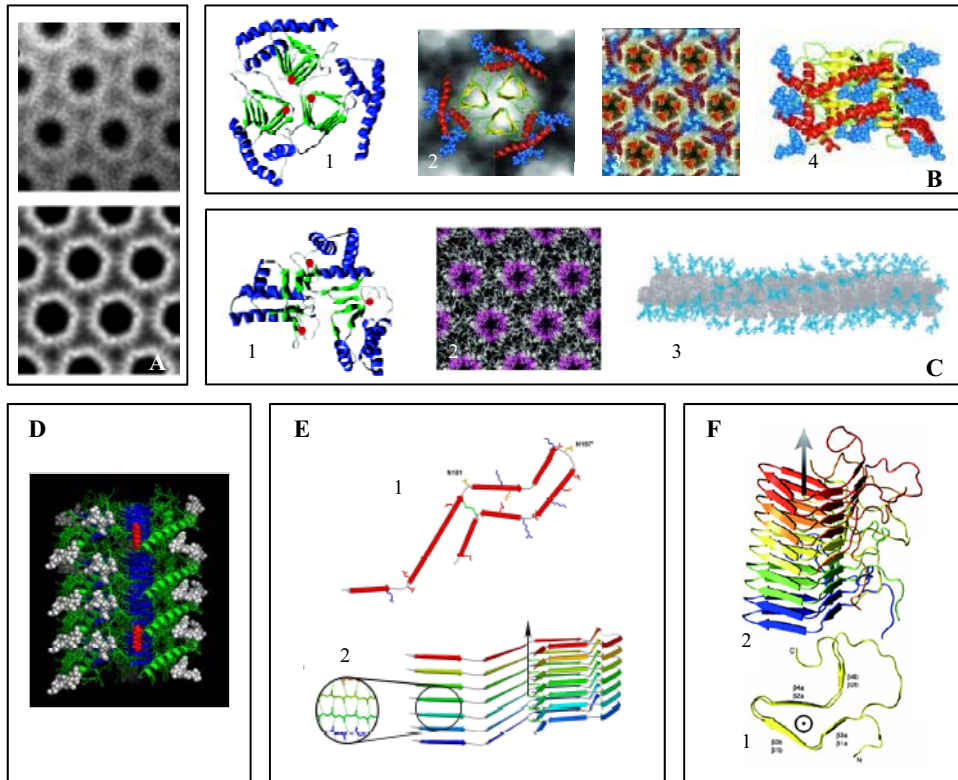


Figura 8: Modelos estructurales propuestos para PrP^{Sc}. **A:** Micrografías de cristales 2D de PrP27-30 mostrando celdillas hexagonales (Wille *y col.*, 2002). **B:** Modelo trimérico en hélice- β levógira para la PrP27-30 (Govaerts *y col.*, 2004). 1: Trímero; 2 y 3: Superposición del modelo sobre las celdillas obtenidas por micrografía electrónica; 4: Fibrilización de los discos triméricos. **C:** Modelo en espiral (DeMarco *y col.*, 2004; DeMarco *y col.*, 2006). 1: Representación trimérica del modelo; 2: Compatibilidad del modelo con las imágenes de microscopía electrónica; 3: Crecimiento de la protofibrila. **D:** “Distance constraints” entre las Gly-90 N-terminales de dos moléculas contiguas del agregado de PrP27-30 (Onisko *y col.*, 2005). **E:** Modelo para fibras amiloides formadas por PrP90-231 recombinante humana (Cobb *y col.*, 2007). 1: Núcleo amiloide de PrP (residuos 159-219); 2: Motivo del apilamiento en registro y detalle del establecimiento de puentes de hidrógeno intermoleculares. **F:** Modelo en solenoide β para Het-s 218-289 (Wasmer *y col.*, 2008). 1: Estructura molecular propuesta para cada subunidad; 2: Visión lateral del ensamblaje de subunidades bajo condiciones de mínima energía calculada a partir de las restricciones obtenidas por NMR.

Nuestro grupo también ha proporcionado datos experimentales que constituyen “*distance constraints*” a considerar en futuras aproximaciones a la arquitectura de la PrP^{Sc} (91). Este estudio se realizó mediante una técnica de entrecruzamiento molecular con un reagente químico bifuncional (BS³) sobre PrP27-30 purificada de cerebros de hámster sirio infectados con *scrapie*. El BS³ reacciona con los grupos amino y permite caracterizar aquellos aminoácidos que quedan próximos entre si en el seno de la PrP27-30, concretamente a una distancia inferior a la longitud de la cadena del BS³. Esta información es recuperada posteriormente tras una digestión de la proteína con tripsina y detectar, mediante MALDI-TOF o LC-MS/MS (nanoLC-ESI-Q-q-TOF), los péptidos generados *de novo* y que contienen un “*cross-link*” de BS³. El estudio dicta que los residuos de Gly-90 N-terminales de monómeros de PrP27-30 contiguos deben situarse a una distancia que no exceda los ~ 12 Å, evidenciando la proximidad de dos moléculas de PrP27-30 en el ensamblaje del agregado, y restringiendo el abanico de posibles disposiciones espaciales. El entrecruzamiento químico Gly-90/Gly-90 sería compatible con el modelo de trímeros de PrP basado en datos de cristalografía electrónica (83), siempre que se establezca verticalmente entre monómeros de PrP apilados a lo largo del eje de la fibra, y no entre los monómeros adyacentes que forman el trímero en el plano horizontal (Figura 8D).

A estos estudios cabría agregar otros realizados sobre fibras de PrP recombinante, mucho más asequibles al análisis y basados en el intercambio de deuterio y espectrometría de masas, crio-microscopía electrónica, proteólisis parcial y microscopía de fuerza atómica (AFM). Estos estudios han aportado un buen número de datos estructurales (92;93). Cobb y *col.* aplicaron *site-directed spin labeling* (SDSL) y espectroscopía EPR para estudiar la arquitectura molecular de fibras amiloides formadas por PrP90-231 recombinante humana (94). Este fragmento truncado N-terminalmente se corresponde a un prion sintético usado previamente en estudios de infectividad (40) que contiene la secuencia completa de PrP^{Sc} resistente a PK, y resulta suficiente para la propagación de la enfermedad. En este caso, de entre todas las mutaciones conocidas asociadas con formas hereditarias (1;6), esta molécula contiene la D178N (95). En contra de los modelos teóricos previos (84;85), este trabajo revela que el núcleo amiloide se extiende hasta la región C-terminal de la molécula, de modo que esos residuos (~ 160 -220) van formando difentes capas apilables una encima de otra con una disposición en paralelo, donde las hojas- β quedan alineadas en registro (Figura

8E). Esto podría tener implicaciones sobre las bases moleculares de la propagación, así como en la heredabilidad de las enfermedades priónicas. No obstante, se desconoce su relevancia respecto a la PrP^{Sc}, por lo que se debe mantener una considerable cautela a la hora de hacer extrapolaciones.

Los denominados priones de levaduras y hongos también podrían proporcionar datos estructurales extrapolables a la PrP^{Sc}. Así, recientemente se ha presentado un nuevo modelo estructural basado en estudios de NMR en estado sólido de fibras amiloides formadas a partir del dominio priónico (residuos 218-289) de la proteína Het-s extraída del hongo filamentoso *Podospora anserina* (96). Aquí, Wasmer y col. encuentran que Het-s (218-289) se estructura en un solenoide β con giro a la izquierda (levógira), donde cada molécula forma dos hélices sinuosas, un núcleo hidrofóbico compacto, al menos 23 puentes de hidrógeno, tres puentes salinos, y dos escaleras de asparragina (Figura 8F).

Mecanismo de conversión

Uno de los grandes retos de la investigación sobre priones pasa por dilucidar con precisión el verdadero mecanismo de conversión conformacional de PrP^C en PrP^{Sc}. Con el paso del tiempo fueron surgiendo toda una serie de hipótesis que trataban de explicar los mecanismos que rigen este proceso, atribuyendo normalmente esta transformación a modificaciones químicas postraduccionales. Entre algunas de las propuestas sugeridas se incluyen: la intervención de chaperonas; la propia naturaleza del *holoprión* de Weissmann (97), donde el agente infeccioso consta de una parte proteica (*apoprión*) y ácido nucleico (*coprión*); la presencia de algún factor adicional, proteína X, como requisito necesario para catalizar el proceso (98). Se ha postulado que la presencia del producto maduro del gen *Prnp* - PrP^C - es necesaria, aunque no suficiente, para el proceso de replicación de priones. Actualmente, la comunidad científica se debate principalmente entre uno de los dos modelos siguientes (63):

Modelo de conversión asistida por molde

Este modelo postula que la PrP^{Sc} actúa como molde, imprimiendo su configuración a la PrP^C. Se asume que la PrP^C coexiste en equilibrio con un estado conformacional alternativo o PrP*, que actuaría como intermediario transitorio participando en la formación de PrP^{Sc}, bien a través de su unión a PrP^{Sc} o a otra molécula de PrP*. La formación de PrP* estaría catalizada por la unión de PrP^C a la proteína X. Una barrera energética alta previene la conversión espontánea de PrP^C en PrP^{Sc}. La formación del amiloide no resulta esencial para el proceso de replicación (Figura 9A).

Cuando el organismo se infecta con priones, la fuente exógena de PrP^{Sc} desencadena el proceso de conversión mediante su unión a PrP*, formándose un heterodímero que posteriormente se transformará en un homodímero de PrP^{Sc}. No obstante, cabe destacar que hasta la fecha estos intermediarios necesarios para el proceso de replicación no han sido detectados.

En las formas hereditarias de la enfermedad, aumenta la concentración de PrP* debido a un efecto desestabilizador de la mutación y/o a un incremento de la estabilidad del dímero de PrP*. De este modo, aumenta la probabilidad de que un dímero de PrP*/PrP* se convierta en PrP^{Sc}/PrP^{Sc} e inicie el ciclo de replicación.

Las formas esporádicas se explicarían por la concurrencia de un evento molecular raro, como la formación de un complejo PrP*/PrP* o una mutación somática, que desencadene el proceso de conversión (98).

Modelo de Nucleación-Polimerización

En este otro modelo no son los dímeros, sino los agregados o polímeros de PrP^{Sc} los que juegan un papel fundamental durante el proceso de conversión. Aquí, la PrP^C y la PrP^{Sc} se encuentran en un equilibrio termodinámico reversible en solución. La inestabilidad de los supuestos monómeros de PrP^{Sc} desplaza el equilibrio hacia la formación de la isoforma patógena, induciendo el crecimiento de los agregados de PrP^{Sc} (99).

El proceso se caracteriza por una fase de latencia que da lugar a la formación de un núcleo o “semilla”; seguida de una fase de crecimiento exponencial del polímero atribuible al rápido reclutamiento de nuevas subunidades de PrP^{Sc} en cada extremo de la fibra en expansión, que conduciría a la formación de agregados de tipo amiloide y a la estabilización de la semilla. La fragmentación de estos agregados incrementaría el número de semillas disponibles acelerando el proceso de replicación (Figura 9B).

Este mecanismo se apoya en modelos matemáticos; en datos cualitativos obtenidos en experimentos de conversión in vitro; y en la caracterización morfológica de los agregados como polímeros-fibras no ramificadas y de diámetro relativo constante.

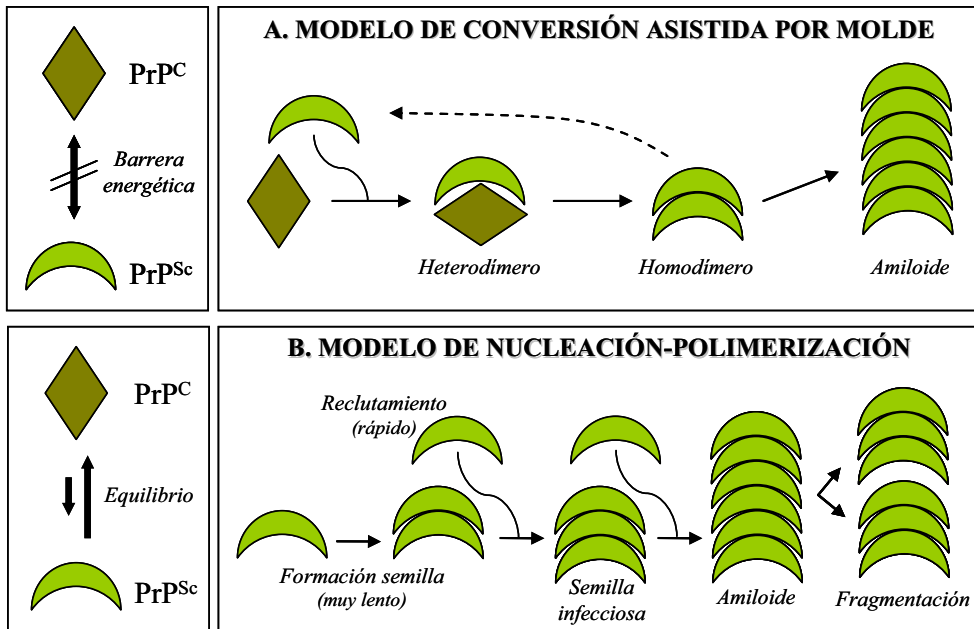


Figura 9: Modelos de conversión conformacional de PrP^C en PrP^{Sc}.

A: Modelo de conversión asistida por molde. **B:** Modelo de polimerización-nucleación.

(Figura adaptada de Aguzzi y col., 2004)

Concepto de “cepa”

Una cepa priónica puede ser definida como aquel aislado de EET - o fuente de infección - que siendo inoculado en hospedadores genéticamente idénticos produce una prionopatía con características estables. Este concepto aplicado a priones nace una vez que se establece que distintas cepas pueden ser amplificadas y propagadas en líneas murinas con idéntico fondo genético, tras la adaptación mediante pases seriados de diferentes aislados de *scrapie* de ovejas y cabras. Una vez adaptadas a ratón y estabilizadas, las distintas cepas son diferenciables de acuerdo al periodo de incubación (PI) y la distribución y severidad de la vacuolización en el cerebro. Comoquiera que las distintas cepas se propagaron en líneas murinas homocigotas para el gen PrP, el fenotipo específico mostrado por cada una de ellas no puede estar codificado por la secuencia de la PrP^C. El hecho de que una misma secuencia aminoacídica sea capaz de generar distintas dolencias es una de las cuestiones que más escepticismo ha creado en torno a la hipótesis de “solo proteína” (100;101). No obstante, se ha sugerido que la diversidad de cepas priónicas vinculadas a las distintas EETs está codificada en la propia estructura de la PrP^{Sc}, dentro del abanico de posibles conformaciones mínimamente estables que, desde un punto de vista termodinámico, esta puede adoptar. A nivel molecular, se han ido acumulando evidencias a favor de la existencia de variaciones estructurales de la PrP^{Sc} entre distintas cepas. Además, cada una de estas cepas está asociada a una especie molecular que difiere en sus propiedades bioquímicas, incluyendo la movilidad electroforética tras tratamiento con PK, el perfil de glicosilación o la estabilidad frente a agentes desnaturalizantes. Así, cuando se realiza una digestión parcial con PK sobre “*Hyper*” (HY) y “*Drowsy*” (DY), dos cepas bien diferenciadas de hámster, se generan sendos núcleos de PrP resistente que difieren en ~1-2 kDa de tamaño, fácilmente apreciable en PAGE (102;103). Precisamente, esta variabilidad en el grado de resistencia a la proteólisis entre cepas refleja una accesibilidad diferencial a la región N-terminal de la molécula de PrP, lo que sugiere que un cambio conformacional en la estructura de una proteína, que conserva idéntica secuencia primaria, puede suponer un plegamiento diferencial que exponga ciertos residuos aminoacídicos, que de otro modo podrían permanecer protegidos frente al ataque enzimático. Estudios adicionales de Bessen y col. pusieron de manifiesto discrepancias estructurales entre HY y DY en relación a sus respectivas propiedades de sedimentación durante el proceso de purificación, y de

resistencia a la desnaturalización exhibida frente a diversos agentes caotrópicos (103). Igualmente, el análisis de ocho cepas pasadas en hámster sirio mediante un inmunoensayo dependiente de conformación sugiere una conformación proteica específica para cada una de ellas (104). Los estudios de FTIR sobre PrP^{Sc} y PrP27-30 derivadas de diferentes cepas mostraron que la estructura secundaria difiere específicamente para varios de estos agentes, y que estas diferencias se manifiestan en variaciones en los componentes amida I (105;106).

La proporción relativa de cada una de las formas glicosiladas (“perfil de glicosilación”) de PrP^{Sc} también varía entre diferentes cepas. Dado que el proceso de glicosilación difiere entre los distintos tipos celulares, se ha postulado que el patrón de glicosilación podría actuar como conductor de la PrP^{Sc} hacia una región determinada del SNC. De esta forma, glicoformas concretas de PrP^{Sc} podrían replicarse de una forma más activa en poblaciones neuronales que expresan una glicoforma similar de PrP^C en su superficie celular (6).

Estudios realizados con el prion de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Sup35 revelaron que la incubación a distintas temperaturas de esta proteína genera varias cepas. El análisis posterior mediante espectrometría de resonancia paramagnética electrónica (EPR) y “*site-directed spin labeling*” (SDSL) corroboró que existían diferencias conformacionales entre las distintas partículas priónicas, lo que permite establecer una correlación entre estas y el fenotipo de la cepa. Además, el estudio estructural revela que estas diferencias conformacionales específicas de cepa se localizan en regiones del dominio del prion implicadas en contactos intermoleculares (107;108).

La naturaleza de los signos clínicos neurológicos, el PI, la localización e intensidad de vacuolización o el perfil lesional general del SNC, continúan siendo criterios muy utilizados para definir, identificar o clasificar una determinada cepa una vez que ha sido estabilizada mediante varios pases seriados en ratón (109). Por lo tanto, antes de establecer como tal una nueva cepa de priones, las diferencias moleculares, estructurales y neuropatológicas inducidas por una determinada especie molecular de PrP^{Sc} deben ser corroboradas mediante pases seriados en líneas murinas seleccionadas, donde deben

reproducirse fielmente todas las propiedades biológicas que la caracterizan. No obstante, cepas distintas inoculadas en animales con el mismo genotipo pueden producir tiempos de incubación y lesiones similares.

Otro aspecto destacable y relacionado con el concepto de cepa es el fenómeno de “memoria” (110), referido al hecho de que una determinada cepa pueda ser aislada nuevamente en la especie de origen, tras haber sido pasada en una especie intermedia con distinta secuencia de PrP.

El fenómeno de “barrera de transmisión”

La transmisión de enfermedades priónicas entre diferentes especies de mamíferos, aunque factible, resulta típicamente menos eficiente que entre individuos de la misma especie; circunstancia que se ha dado a conocer con el sobrenombre de “barrera de especie”. Esta dificultad inherente para la transmisión de priones a una especie diferente a la de origen del inóculo se haya íntimamente relacionada con el concepto de “cepa”, que encierra la capacidad de un agente infeccioso exclusivamente proteico de codificar la información necesaria para determinar la especificidad fenotípica de las diferentes afecciones que provoca. El comportamiento de este fenómeno recuerda al de un suceso de naturaleza estocástica. Característicamente, durante el primer pasaje de un inóculo procedente de la especie donadora (A) en una especie hospedadora (B), no todos los animales inoculados de la especie B sucumben a la enfermedad (disminuye el “*Attack rate*”), y en caso de hacerlo se observan tiempos de supervivencia mucho más prolongados y variables que cuando la transmisión se lleva a cabo dentro de la misma especie, donde todos los animales sucumben transcurrido un periodo de incubación (PI) relativamente corto y remarcadamente similar. Así, ratones inoculados con PrP^{Sc} de hámster desarrollan la enfermedad tras ~500 días post-inoculación (dpi), tiempo que se reduce a ~130 dpi si se trata de PrP^{Sc} murina. Sin embargo, en posteriores pasajes seriados de B en B se observa una reducción del PI, hasta que finalmente se estabiliza, como sucede con el patrón de lesión y otras propiedades neuropatológicas (109), y la transmisión de priones entre especies deja de parecer un proceso estocástico. La duración del PI en la especie receptora en el primer y segundo pase de la enfermedad, se ha utilizado como herramienta para

evaluar semicuantitativamente la magnitud de la barrera entre dos especies. No obstante, se obtiene una mejor estimación a través de la titulación del agente en la especie receptora y donadora, y posterior comparación de la dosis letal media (DL_{50}) - dosis mínima capaz de inducir la muerte del 50% de los animales inoculados - en cada una de ellas.

Desde un punto de vista evolutivo, el gen de la PrP posee una secuencia altamente conservada entre mamíferos. Sin embargo, los priones no saltan fácilmente de una especie a otra, por lo que mínimas divergencias en la secuencia de aminoácidos entre especies podrían tener un gran impacto en la eficiencia de la transmisión interespecífica. De hecho, los primeros estudios sugerían que el fenómeno de barrera está determinado por la identidad de secuencia entre la PrP^{Sc} exógena de la especie donadora y la PrP celular de la aceptora. Efectivamente, la imposibilidad de transmitir una prionopatía a los ratones *Knock out* para el gen de la PrP, puso de manifiesto que la presencia de PrP^C era necesaria tanto para la persistencia del inóculo, independientemente de su procedencia, como para la replicación del mismo. Experimentalmente, estos ratones no solo han servido para el estudio sobre la función de la PrP y su implicación en la transmisión de EETs, en tanto que afecta al comportamiento del prión (replicación, PI, alteraciones neuropatológicas), además resultan una herramienta básica para el desarrollo de ratones transgénicos que expresan únicamente la PrP^C de interés sobre un fondo genético KO, eliminando la posibilidad de interferencia con la PrP^C murina. Conviene recordar que los priones sintetizados *de novo* durante el proceso de replicación poseen la secuencia del gen de la PrP del huésped (PrP endógena) y no la correspondiente a la PrP^{Sc} del inóculo (PrP exógena). El resultado de desarrollar ratones transgénicos que expresaban el gen PrP de otras especies (como el hámster, HaPrP) en lugar de la PrP murina, introduciendo un transgén con la secuencia de la PrP de la especie de la que procede el inóculo, fue que desaparecía la barrera entre ambas especies, manifestando una relación inversamente proporcional entre los niveles de expresión del transgén y el PI. Así, los ratones transgénicos que expresan la HaPrP, a diferencia de los “*wild-type*”, son altamente susceptibles a los priones Sc237 de hámster (111). Igualmente, el hecho de que la ECJ esporádica y adquirida se da principalmente en individuos homocigotos para el polimorfismo del residuo 129 de la PrP, apoya la idea de que el proceso de propagación de priones es más eficiente cuando la PrP^{Sc} y la PrP^C que interactúan poseen idéntica estructura primaria (6;112;113). Sin embargo, puede darse el

caso de que una determinada cepa se transmita con relativa facilidad a otras especies; este comportamiento fue observado para la nueva cepa responsable de la EEB. Esta cepa es muy promiscua y se transmite eficientemente a un rango amplio de especies, pero mantiene sus características biológicas al pasar especies intermediarias con distinta secuencia de PrP (110). En estudios de enfermedades priónicas de humanos se comprobó que la transmisión de la ECJ clásica a ratones convencionales es difícil o simplemente falla, mientras que en ratones transgénicos que expresan la PrP humana - y no murina - no existe barrera de especie (15;114). Por el contrario, y a pesar de que posee la misma secuencia de PrP que la ECJ clásica, la vECJ se transmite fácilmente en ratones “*wild-type*” e ineficazmente en ratones humanizados (15). Consecuentemente, y dado que dos cepas propagadas en el mismo hospedador pueden sufrir barreras completamente diferentes en otras especies, se ha sugerido que quizás resulte mucho más apropiado el término de “barrera de transmisión” (17;115).

En ensayos de conversión libre de células, se ha observado que la PrP^C adquiere la impronta molecular de la semilla de PrP^{Sc}, sugiriendo que la especificidad de cepa puede estar codificada a nivel de la conformación de la proteína, en particular en la estructura terciaria de la PrP^{Sc}. Estudios de interacción homóloga (caracterizados por la presencia de núcleos de PrP^{Sc} de la misma especie que la PrP^C sustrato) o heteróloga (donde la especie de origen de la PrP^{Sc} empleada para desencadenar el proceso de conversión es distinta a la de la PrP^C) realizados con la variante de la proteína del prión recombinante Y145Stop (PrP23-144), demostraron que la nueva fibra amiloidea generada adquiere la estructura secundaria y morfología del molde. Además, estas diferencias estructurales están controladas por uno o dos residuos en regiones críticas de la molécula, cuya sustitución implica alteraciones conformacionales que afectan a la barrera de transmisión entre mamíferos (116). Otros trabajos, como los realizados por Tanaka *y col.* con priones de levaduras (107;108), también sugieren que la estructura molecular del agente infeccioso puede jugar al menos un papel tan decisivo como la secuencia de la PrP del hospedador en los eventos de transmisión de priones, y por lo tanto, en el establecimiento de la barrera entre especies. Todos estos indicios sugieren que cada secuencia primaria de PrP^C presenta un abanico de conformaciones patológicas permitidas que da lugar a la generación de distintas cepas, y que la susceptibilidad de una especie a la infección con un prión está

determinada por la compatibilidad conformacional entre la PrP^{Sc} inoculada y la PrP^{Sc} del huésped. Siendo así, la identidad de secuencia afectará en mayor medida a la transmisión en caso de conllevar cambios estructurales significativos entre las moléculas de ambas especies. En función de la compatibilidad conformacional se comprende fácilmente que entre especies pueda existir desde una barrera débil a una completamente infranqueable.

Indudablemente, el fenómeno de la “barrera de transmisión” resulta de vital importancia para valorar el riesgo de contagio entre especies y sus implicaciones en salud pública y animal. Al respecto, un estudio de Espinosa *y col.* en ratones transgénicos que expresan la PrP bovina, pone de manifiesto que el agente causal de la EEB sufre una serie de alteraciones al traspasar la barrera de especie que supone su paso por la oveja, que afectan a sus propiedades patológicas y redundan en un incremento de virulencia con respecto a la EEB. El incremento de virulencia de este nuevo prión emergente “EEB pasado por oveja” implica un riesgo evidente de transmisibilidad potencial que atañe a otras especies, incluyendo al humano (117).

Entre otros, los grupos de Chesebro y Collinge han reincidido en el estudio de las denominadas “infecciones subclínicas”, donde el hecho de que la replicación activa del agente infeccioso no vaya acompañada de la correspondiente manifestación de signos clínicos, no implica necesariamente una barrera de transmisión absoluta (118-120). Esta situación puede observarse tras inocular seriadamente priones de hámster de la cepa 263K en ratón (121).

Amplificación cíclica de proteínas anormalmente plegadas (PMCA)

En la actualidad se viene usando cada vez con más frecuencia un nuevo sistema de conversión *in vitro* designado como PMCA (*protein misfolding cyclic amplification*) que permite la transformación de grandes cantidades de PrP^C en PrP^{Sc} partiendo de cantidades ínfimas de la isoforma patógena (122). Este ensayo fue diseñado para imitar algunos de los aspectos fundamentales de la replicación *in vivo* de priones pero siguiendo una cinética acelerada (123). Conceptualmente, se puede establecer una analogía entre la PMCA y la

amplificación de ADN mediante PCR, donde un molde crece a expensas de un sustrato en una reacción cíclica.

Durante el proceso, la PrP^{Sc} actúa como molde y es incubada en presencia de un exceso de PrP^C, esta última interviene como sustrato de la reacción y permite el crecimiento de los agregados de PrP^{Sc}. Tras una primera fase de incubación, las muestras se someten a la acción de ultrasonidos con el fin de romper los agregados y generar múltiples núcleos de la forma infecciosa; éstos se comportan como nuevas semillas proporcionando más extremos libres para el proceso de amplificación de la PrP^{Sc}. Tras varios ciclos de incubación-sonicación se incrementan drásticamente los niveles de priones en la muestra, desde valores indetectables hasta niveles fácilmente determinables por medio de cualquier sistema bioquímico convencional como el Western blot (122).

El propio fundamento de la técnica sugiere que el proceso de replicación tiene lugar de una forma cíclica, y que la PrP^{Sc} generada *de novo* es capaz de perpetuar el cambio de conformación (123). Además, sus autores aseguran que la PMCA reproduce el proceso de conversión de modo que la PrP^{Sc} imprime fielmente su conformación característica en la proteína sustrato con independencia de la especie y cepa utilizada, lo que permite incrementar su ámbito de aplicación al estudio de las distintas prionopatías. Aunque quizás, la mayor ventaja de este método reside en su enorme eficiencia de conversión, alcanzando unos niveles de detección de gran aplicabilidad para el diagnóstico de las EETs.

La PrP^{Sc} sensible a proteinasa K

Tradicionalmente, la ausencia de anticuerpos definitivos específicos de conformación, y la falta de datos estructurales, condujo a una definición operacional de la PrP^{Sc} basada en dos propiedades físico-químicas que nos permiten distinguirla de la PrP^C; la resistencia a proteinasa K y la insolubilidad en detergentes no aniónicos (1;124). Así, el tratamiento de una muestra con 50 µg/ml PK durante 1 hora a 37 °C destruye completamente la PrP^C; sin embargo, la PrP^{Sc} resulta parcialmente resistente en las mismas condiciones, si bien, sufre un corte a nivel del extremo amino-terminal de la molécula, que la priva de 60-70 residuos y genera un núcleo resistente a PK, conocido como PrP27-30. En

presencia de detergente, la PrP²⁷⁻³⁰ forma unos “bastoncillos” característicos de aspecto fibrilar (“*rod-shaped structures*”) visibles fácilmente usando microscopía electrónica de transmisión (38). Los estudios de NMR realizados con PrP recombinante en solución postulan el alto grado de desorden que afecta al tramo final del extremo amino-terminal de la PrP^C, se extiende hasta la posición 121, aproximadamente. Igualmente, se ha propuesto que parte de este tramo, coincidiendo con el área de corte de la PK, se haya también desordenado en la PrP^{Sc}.

En relación con la insolubilidad en detergentes, como segundo criterio operacional para diferenciar la PrP^{Sc}, una centrifugación a alta velocidad bajo “condiciones estándar” (100,000 g durante 1 hora a 4 °C) permite sedimentar la PrP^{Sc}, mientras la PrP^C permanece en el sobrenadante (124). Así pues, la resistencia a PK y la insolubilidad, siempre bajo “condiciones estándar”, se han convertido en las propiedades más explotadas como estrategia para distinguir la PrP^{Sc} “clásica” (124). Actualmente, estos test son también la base del diagnóstico de todos los kits comerciales desarrollados para la detección de priones en humanos y animales infectados.

La cuestión es si esta definición operacional basada en la proteólisis y la sedimentación es apropiada y completa para distinguir entre ambas isoformas de PrP. Inesperadamente, estudios posteriores aportaron una serie de observaciones que matizaban esta idea de PrP^{Sc} y planteaban un escenario diferente. Inicialmente, en trabajos realizados incluso antes de que la PrP fuera descubierta, se encontró infectividad asociada con tamaños del agente del *scrapie* aparentemente demasiados pequeños para ajustarse al criterio de sedimentación predicho para la PrP^{Sc}. Así, mediante el análisis en gradientes de sacarosa, se determinó que la infectividad asociada al agente del *scrapie* podía encontrarse en fracciones con un coeficiente de sedimentación tan pequeño como 40S (125); análogamente, mediante electroforesis en gel de agarosa, se mostró que la partícula infecciosa migraba a la altura de los fragmentos de ADN de 10⁶ Da (126). A su vez, de otro estudio, basado en el análisis de electroforesis en gel de agarosa y la inactivación de la infectividad del *scrapie* con radiación ionizante, se infiere la presencia de partículas con un tamaño de ~55 kDa (127). Esto implicaría que el tamaño mínimo del prión, o al menos el del sitio catalíticamente activo para la propagación, podría ser incluso un dímero de PrP, y

por tanto, resulta difícil que un oligómero tan pequeño sedimente bajo las condiciones estándar.

En 1997, Lasmezas *y col.* observan la ausencia de la isoforma anormal de PrP resistente a proteasa (PrPres) durante la transmisión del agente causal de la EEB a ratones. Los animales inoculados con homogenado de cerebro de vaca afectada de EEB exhiben signos neurológicos y muerte neuronal; sin embargo, en más del 55% de los ratones no se detecta la presencia de PrPres (128). Esta aparece al realizar pasajes seriados una vez que el agente se ha adaptado al hospedador.

No obstante, fueron Safar *y col.* los primeros en describir la existencia de una fracción de PrP^{Sc} sensible a PK (104). Estos autores desarrollan un inmunoensayo dependiente de conformación (CDI) altamente sensible, capaz de discriminar entre moléculas de PrP^{Sc} procedentes de ocho cepas diferentes de priones propagadas en hámsteres sirios. Al contrario que la PrP^C, el inmunoensayo muestra que la desnaturalización con agentes caotrópicos (Gnd-HCl) mejora la inmunorreactividad de la isoforma PrP^{Sc} frente a ciertos anticuerpos (mAb 3F4), lo que sugiere la presencia de un epitopo parcialmente críptico cuando la proteína se encuentra en su estado nativo (129). Esto concuerda con estudios previos donde se predice que durante la conversión de PrP^C en PrP^{Sc} la región que aloja el epitopo para el anticuerpo monoclonal 3F4 adquiere una conformación con un alto contenido en hoja- β (130). Inesperadamente, el tratamiento previo con PK de las muestras infectadas hace decaer considerablemente el efecto de mejora de la inmunorreactividad dependiente de desnaturalización. El análisis mediante espectroscopía de dicromismo circular (CD), indica que la proteólisis elimina buena parte la PrP^{Sc} atendiendo a la disminución del porcentaje en lámina- β de la muestra original, sugiriendo la coexistencia de una subfracción de moléculas de PrP^{Sc} completamente susceptibles a la degradación, designada, en conformidad, como PrP^{Sc} sensible a PK. Este hecho contradice nuevamente la definición operacional, donde el término de PrP^{Sc} se refiere exclusivamente a la isoforma resistente a proteasa.

El CDI permite distinguir entre todas las cepas analizadas en base a la razón de PrP desnaturalizada/nativa como función de la concentración PrP^{Sc} antes y después de la

digestión parcial con PK. Estos hallazgos, además de contrastar con la idea de que la estructura primaria de una proteína determina una única estructura terciaria, indican que cada cepa encierra una PrP^{Sc} de conformación única; que las propiedades biológicas de cada una de ellas podrían ser explicadas en función de estas diferencias de conformación; y que la variación en los tiempos de incubación está relacionada con la proporción relativa de PrP^{Sc} sensible a proteasa en cada cepa. Las cepas con mayor porcentaje de PrP^{Sc} sensible a PK se caracterizan por presentar periodos de incubación más prolongados.

En otro estudio, Shaked *y col.* logran establecer una disociación entre infectividad y PrP resistente a proteasa e insoluble en detergente (PrP27-30). Para ello, inhiben la agregación de la PrP27-30 con dimetil sulfóxido (Me₂SO), y tras una precipitación con metanol, inoculan el material aún agregado en hámsteres observando menos del 1% de infectividad que cuando inoculan la misma cantidad de PrP27-30 procedente de los *rods* “clásicos” (131).

Posteriormente, Tzaban *y col.* demuestran por primera vez la presencia de moléculas de PrP^{Sc} sensibles a proteasa que forman agregados de bajo peso molecular en tejidos infectados con priones. Estos estudios se sirvieron de las técnicas de filtración en gel y sedimentación en gradientes de sacarosa, sobre homogenados de cultivos celulares o de cerebros infectados con scrapie, para revelar que la PrP presentaba una distribución continua de agregados de diferente tamaño. Además, mientras la PrP^{Sc} de las fracciones más densas, asociadas a grandes polímeros, era resistente y dependiente de la desnaturalización, la PrP^{Sc} recuperada de las fracciones intermedias, ligadas a oligómeros más pequeños, resultó sensible a PK y con elevada inmunorreactividad en estado nativo (124). Por contra, los homogenados control, de cerebro o de cultivos celulares, solo contenían PrP en fracciones muy ligeras, coherente con una entidad monomérica o, a lo sumo, dimerica (124). Estos resultados sugieren que la PrP^{Sc} presente en dichos homogenados es una colección heterogénea de oligómeros de diferente tamaño, y que la resistencia a PK depende, al menos en parte, de la estructura cuaternaria.

El número creciente de situaciones donde la correlación entre el acúmulo de PrP^{Sc} y el desarrollo cambios neuropatológicos o neurodegeneración en enfermedades priónicas

se debilita o está simplemente ausente, llevó a Chiesa *y col.* a desarrollar un sistema en ratones transgénicos Tg(PG14) que les permitiese discriminar, a nivel molecular, entre dos importantes propiedades de los priones: la patogeneidad (neurotoxicidad) y la infectividad (132). La PrP mutante (PG14) se expresa espontáneamente en estos ratones en la forma patogénica pero no infecciosa, PG14^{sp^{on}}; cuando los animales son previamente inoculados con priones exógenos de la cepa RML, se presenta la forma infecciosa PG14^{RML}. En ambos casos se produce una acumulación de PG14 en el cerebro de estos animales, y ambas formas presentan características propias de PrP^{Sc}, pero los agregados de PG14^{sp^{on}} son mucho menos resistentes a proteasa. Las dos formas difieren profundamente en su estado de oligomerización, siendo los agregados de PG14^{RML} mucho más grandes y resistentes a la disociación.

Estudios más recientes resaltan la importancia de la sPrP^{Sc}. Así, una investigación realizada con pacientes fallecidos a consecuencia de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (EJD) constata que hasta un ~90% de la PrP^{Sc} presente en sus cerebros, tanto a nivel de la materia blanca como de la gris, se corresponde con sPrP^{Sc} (133). Dado que la mayoría de los métodos utilizados para distinguir entre PrP^{Sc} y PrP^C confían en el uso de la PK (1), sería lógico esperar que se produzca una considerable infraestima de la cantidad de PrP^{Sc} presente en una muestra determinada. Indudablemente, esto comporta una serie de implicaciones directas que adquieren particular importancia en el contexto del desarrollo de métodos analíticos para la detección de cantidades mínimas de PrP^{Sc} en fluidos biológicos como la sangre, pudiendo ayudar a sentar las bases de un futuro test diagnóstico preclínico para enfermedades priónicas en humanos y animales. Más allá de esta consideración práctica, la sPrP^{Sc} podría aportar pistas significativas acerca de la estructura de la PrP^{Sc}, así como del proceso que conduce a su generación y propagación.

Cada vez existen más evidencias de que los agregados pequeños (oligómeros o protofibrillas) son las principales especies citotóxicas en las enfermedades amiloides (134-138). Al respecto, un estudio de Silveira *y col.* determina el tamaño de las partículas priónicas de mayor capacidad infecciosa (139). Para evaluar la relación entre infectividad, actividad conversora y tamaño de los agregados de PrP resistente a proteasa, la PrP^{Sc} fue purificada y tratada con PK, obteniendo PrP27-30 que fue disgregada parcialmente

mediante el tratamiento con detergentes y la aplicación de sonicación; posteriormente, las muestras fueron fraccionadas (FIFFF) y analizadas por “light scattering” y electroforesis en gel no desnaturizante. El estudio concluye que las partículas no fibrilares, con masas equivalentes a 14-28 moléculas de PrP (17-27 nm; 300-600 kDa) son las más infecciosas. Además, la infectividad desaparece en los agregados formados por menos de 5 unidades de PrP.

En cualquier caso, estos resultados apuntan en la misma dirección que los hallazgos derivados de otras afecciones neurodegenerativas, caracterizadas por la formación de depósitos anormales de proteínas (como el Alzheimer, el Parkinson y otras amiloidosis), donde se ha sugerido que quizás las grandes fibras de naturaleza amiloide no sean la principal causa de la enfermedad, sino consecuencia de un proceso protector que secuestra los peligrosos oligómeros subfibrilares. Por ello, tanto en prionopatías como en el resto de enfermedades amiloides, evitar la formación de oligómeros podría constituir un medio de prevención. Impedir o disgregar agregados maduros (amorfo o amiloides) puede llevar al aumento de la concentración de protofibrillas tóxicas (122). Así pues, cualquier información estructural acerca de la formación de protofibrillas podría ser de vital importancia en la búsqueda de algún objetivo con fines terapéuticos.

Contexto estratégico

Una reflexión conjunta de todas estas consideraciones sugiere la hipótesis de que la PrP^{Sc} se constituye en un continuo de moléculas con distinto estado de agregación, y que este estado de agregación se correlaciona de algún modo con su capacidad de resistencia a proteasas. Siendo así, mediante un fundamento meramente físico basado en diferencias en el tamaño de estos agregados, y partiendo de una suspensión de PrP^{Sc} purificada a través de un procedimiento estandarizado de ultracentrifugación en presencia de detergente, a priori deberíamos ser capaces de aislar una fracción ligera constituida por pequeños oligómeros de PrP^{Sc}, cuya mayor solubilidad les permitiese permanecer en el sobrenadante al reducir la fuerza centrífuga. En base a los resultados de Tzaban *y col.*, estos pequeños oligómeros de PrP^{Sc} podrán ser más susceptibles, en términos relativos, a la proteólisis catalizada por la proteinasa K. De este modo, un ajuste operacional de las condiciones experimentales,

permitiría obtener una fracción de la forma patogénica e infecciosa de la PrP sensible a PK (sPrP^{Sc}). En este estudio se describe principalmente el aislamiento de dicha fracción, su posterior caracterización bioquímica y su aportación al ámbito del análisis estructural de la PrP^{Sc}. Esta fracción, detectada de forma indirecta, ha cobrado un gran protagonismo recientemente, ya que constituye una importante proporción de la PrP^{Sc} total.

En el análisis de proteínas, la espectrometría de masas combinada con métodos bioquímicos (técnicas de entrecruzamiento molecular con reagentes químicos bifuncionales, proteólisis parcial, intercambio de deuterio) permiten “capturar” la información estructural que se extiende a lo largo de un dominio tridimensional y transformarla en un dominio monodimensional: la masa peptídica. Precisamente, la susceptibilidad a proteasas y la solubilidad de esta nueva fracción “sPrP^{Sc}” ofrecen extraordinarias posibilidades de cara al análisis estructural mediante proteólisis parcial y/o microscopía electrónica (crio-TEM y tomografía).

Paralelamente, y en un contexto estratégico orientado a incrementar el conocimiento de la arquitectura molecular de la PrP^{Sc} desde diversos flancos, este estudio se propone aportar una serie de nuevos datos experimentales aplicando de nuevo un tipo de análisis basado en la proteólisis parcial. Existe una buena correlación entre la proteólisis parcial y determinados parámetros conformacionales como la accesibilidad, la movilidad de segmentos y la protusión. Experimentos modelo han demostrado que los residuos localizados en hojas- β son resistentes a la proteólisis, mientras que los alojados en lazos y hélices- α pueden ser fácilmente cortados (140). En cualquier caso, la exposición a la superficie no es el único parámetro a tener en cuenta en experimentos de proteólisis parcial, antes bien, resulta importante considerar la flexibilidad de la región de proteína expuesta. De acuerdo con Fontana *y col.*, la proteólisis parcial de proteínas en estado nativo acontece en sitios con alta movilidad (flexibles) y rara vez a nivel de segmentos dispuestos en una estructura secundaria regular como hélices- α . Por lo tanto, los residuos susceptibles a la proteólisis parcial están localizados en segmentos muy flexibles o desplegados (141-144).

Bajo estas premisas, se ha realizado un estudio comparativo de los puntos de corte para PK N-terminales entre 263K y Drowsy (DY), dos cepas de PrP^{Sc} en hámster que

difieren significativamente en sus tiempos de incubación y en su sensibilidad a proteinasa. Para simplificar el análisis, la molécula de PrP^{Sc} se truncó N-terminalmente a la altura de la cys-179 con ácido 2-nitro-5-tiocianatobenzoico (NTCB), después del tratamiento con PK. Este reactivo se usa habitualmente para cianilar las cisteínas libres y romper el enlace amido por el lado N-terminal de los residuos de cisteína modificados, mediante una reacción en dos pasos. Los fragmentos generados pueden ser convenientemente analizados mediante electroforesis en gel, métodos cromatográficos, o espectrometría de masas (145;146). La PrP contiene dos cisteínas y carece de cadenas de carbohidratos antes de la cisteína situada en la posición 179, lo que nos permite la identificación de cada especie amino-terminal como un único péptido cuya secuencia va desde la posición “x” a la 178, siendo “x” el residuo amino-terminal. Posteriormente, los péptidos serían analizados por MALDI-TOF y nanoLC-ESI-Q-q-Tof.

Los resultados indican que la PrP^{Sc}, además de los puntos de corte amino-terminales descritos en la bibliografía, contiene en su núcleo regiones susceptibles a proteasa separadas por secuencias donde no se observan lugares de corte. Estos resultados son compatibles con una estructura forjada por tramos en lámina-β conectados por lazos y giros. Además, no se han encontrado diferencias en la localización de los puntos de corte de los productos de digestión generados por la acción de la proteinasa K entre las cepas 263K y Drowsy, pero sí varían sus proporciones relativas después de la digestión con PK entre ambas cepas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

1. El aislamiento de una fracción de PrP^{Sc} sensible a proteinasa K (sPrP^{Sc}).
2. La caracterización bioquímica de dicha fracción y el estudio de su carácter transmisible e infeccioso.
3. El análisis estructural de la PrP^{Sc}, utilizando tanto la sPrP^{Sc} obtenida a través del primer objetivo, como la PrP^{Sc} total.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Tampones y Soluciones

➤ “Assay Buffer”

0,96% (v/v) dietanolamina “DEA” (Panreac); 0,0667% (v/v) $MgCl_2$ 1.5M en H_2O milli-Q.
Ajustar pH a 10,0

➤ “Chemiluminiscent Substrate Solution” (CSS)

0,8% (v/v) CSPD (Tropix), 5% (v/v) Nitro-bock (Tropix) en assay buffer (Nota: usar “Nitro-bock” solo para membranas de nitrocelulosa)

Estas dos soluciones se han utilizado exclusivamente con el sistema de detección “Tropix” y el anticuerpo secundario “Fosfatasa Alcalina” conjugado.

➤ H8.5

H_2O milli-Q, pH ajustado a 8,5 con 1M Tris

➤ Homogenado de cerebro sano - “Normal Brain Homogenate” (NBH)

10% homogenado de cerebro sano en CB

➤ PBS (*Phosphate Buffer Saline*)

58 mM Na_2HPO_4 , 17 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 68 mM NaCl en H_2O milli-Q; o PBS 10X comercial en tabletas (Sigma ó Calbiochem)

➤ Solución Azul Coomassie (AC)

0,005% (p/v) Azul Coomassie, 50% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético glacial; o Simply Blue™ SafeStain (Invitrogen)

➤ Solución de Desteñido (SD) - “Destaining Solution”

30% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético glacial (Nota: desteñir simplemente con H_2O milli-Q cuando el gel ha sido teñido con Simply Blue™ SafeStain, Invitrogen)

➤ Solución Negro Amido (NA)

0,1% (p/v) Negro Amido 10B (Panreac), 40% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético glacial en H₂O milli-Q

➤ Solución de preservado (SP) – “*Gel Preserving Solution*”

20% (v/v) metanol, 2% (v/v) glicerol o Gel-Dry Drying Solution 1X (Invitrogen)

➤ Solución Rojo Ponceau

0,5% (p/v) Ponceau S (Sigma), 1% (v/v) ácido acético glacial en H₂O milli-Q

➤ “*Stripping Buffer*”

10% Glicina 2M, pH 2,2, 0,1% SDS; 1% (v/v) Tween-20 en H₂O milli-Q

El proceso de retirada de anticuerpos (*stripping*) requiere la incubación de la membrana a T^a ambiente con “stripping buffer” en agitación, y posteriormente, 3 x 5-10 min lavados con TL.

➤ Tampón de Bloqueo (TB) - “*Blocking Buffer*”

0,2% (p/v) I-Block (TROPIX, Applied Biosystems), 0,1% (v/v) Tween-20 en PBS; o 5% (p/v) leche desnatada, 0,05% (v/v) Tween-20 en PBS

Para la inmunodetección con el anticuerpo Anti-oligómeros A11, el porcentaje de Tween-20 se redujo diez veces (0,03% en TL y 0,01% en TB).

➤ Tampón de carga (Tc)

Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad), 5% (v/v) 2-β-mercaptoetanol (Sigma); o NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen)

➤ Tampón de Conversión - “*Conversion Buffer*” (CB)

150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 4 mM EDTA, Complete 1X en PBS

➤ Tampón de electroforesis (TE) - “*Running Buffer*”

25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% (p/v) SDS, pH 8,3; o Tris/glicina/SDS 10X (Bio-Rad); o NuPAGE® MES SDS Running Buffer (for Bis-Tris Gels only) 20X (Invitrogen)

➤ Tampón de Homogenización (PrP^{Sc})

10% (p/v) sarkosyl (Merck), 0,95% 1M NaH₂PO₄, 1X Complete™ cocktail (Complete, Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania) en H₂O milli-Q; pH ajustado a 8,5 (Nota: sin Complete cuando se trata de una preparación de PrP27-30)

➤ Tampón de Lavado (TL) - “*Washing Buffer*”

0,3% (v/v) Tween-20 (Sigma) en PBS

➤ Tampón T8.5

20 mM Tris/HCl en H₂O milli-Q; pH ajustado a 8,5

➤ TNS

10 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% sarkosyl

➤ Tampón de transferencia (TT) - “*Transfer Buffer*”

25 mM Tris, 192 mM glicina, 10-20% (v/v) metanol, pH 8,3

El “grado reactivo” ha sido el mínimo utilizado en la preparación de todos los tampones y soluciones.

Modelo animal

El desarrollo de la fase experimental necesario para llevar a cabo la realización de este proyecto se ha basado en el modelo que nos proporciona el hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*). Indistintamente, ejemplares de ambos sexos con cuatro semanas de edad y 40-60 g de peso fueron sedados con una solución anestésica de Xilacina-Ketamina (10 µl/g) e inoculados por vía intracerebral con 30 µl de homogenado al 10% (p/v) en PBS de cerebros procedentes de hámsteres en fase clínica terminal infectados previamente con 263K (gentileza de Michael Baier del Robert Koch Institut de Berlín) o Drowsy (InPro, San Francisco), dos cepas cuyo origen podemos encontrar, respectivamente, en el scrapie ovino (147) y en la ETV (148). Alternativamente, en el caso de la cepa 263K, la afección se transfirió por vía intraperitoneal suministrando 150 µl del inóculo. Por motivos éticos, se aplicó la eutanasia con CO₂ una vez que los animales desarrollaron al menos tres de los siguientes signos inequívocos de la enfermedad:

- ✓ *Hiperestesia* o *Hipersensibilidad* e *Hiperactividad* (“*Reactivity*”).
- ✓ *Excitabilidad* (“*Very jumpy*”) y *Agresividad*.
- ✓ “*Cabeceo*” (“*Head bobbing*”): movimiento distintivo e incontrolado de sacudida de la cabeza hacia arriba y hacia abajo.
- ✓ *Marcha tambaleante*: andar como un pato (“*Waddling gait*”) o anadear.
- ✓ *Apatía*, *Embotamiento* (“*Dullness about head*”) y *Expresión “triste”* en el rostro con aparente disminución de estado de alerta y dificultad para responder frente a estímulos externos. Frecuentemente, el animal se desplaza describiendo trayectorias circulares de un modo compulsivo.
- ✓ *Temblor* (“*Tremor*”).
- ✓ *Aspecto desaliñado* (“*Rough coat*”): pelo erizado, áspero o alborotado.
- ✓ *Postura erecta* (“*Erect posture*”): dificultad para erguirse sobre las patas traseras.
- ✓ *Espalda aplanada* (“*Flattened back*”)
- ✓ *Legañas*: descargas oculares pegajosas (“*Sticky eyes discharge*”).
- ✓ *Bradiquinesia* (“*Bradykinesia*”): enlentecimiento de los movimientos voluntarios.
- ✓ *Cifosis* (“*Kiphotic posture*”): exageración o angulación de la curva posterior normal de la columna vertebral a modo de joroba (“*Hunched*”).

- ✓ *Pérdida de equilibrio.*
- ✓ *Ataxia:* disminución de la capacidad de coordinación de los movimientos musculares voluntarios. Movimientos irregulares, inseguros y espasmódicos.
- ✓ *Incontinencia urinaria (“Incontinence”):* reconocible visualmente en el propio animal, pero a su vez acompañada de un cambio de matiz e intensidad del olor que se desprende, y de la desaparición de la zona de concentración de orina en una de las esquinas de la jaula.
- ✓ *Pérdida de masa corporal (“Weight loss”) y Deshidratación.*
- ✓ *Posición supina (“Supine position”):* dificultad para incorporarse y/o mantenerse a cuatro patas. Característicamente, el animal permanece tumbado de costado mientras manifiesta un movimiento natatorio de las extremidades.
- ✓ *Párpados cerrados y Hemorragia nasal.*
- ✓ *Catalepsia (“Catalepsy”) y Letargia (“Lethargy”).*

Los animales alcanzan este estado una vez transcurrido un periodo de incubación (PI) que varía entre los ~70 y los >150 días post-infección (dpi). Dicha variabilidad responde fundamentalmente a las diferencias en el PI encontradas en función de la cepa transferida, el sexo y la edad del ejemplar, y la vía de inoculación utilizada.

Finalmente, la acumulación de PrP^{Sc} en estos cerebros se detectó mediante Western blot (mAb 3F4).

Anticuerpos

Primarios. A una dilución 1:5.000: **3F4** (Dako, Glostrup, Denmark), anticuerpo monoclonal primario de ratón que reconoce específicamente PrP por su extremo N-terminal (epitopo ~107-TNMKHMAGA-115) en humano, hámster, gato, etc; **W226** (cortesía de Lothar Stitz, Friedrich Loeffler Institut, Tuebingen, Alemania), anticuerpo primario anti-PrP que reconoce un epitopo de la zona central de la molécula (~145-WEDRYREN-153); **R1** (InPro Biotechnology), mAb anticuerpo primario recombinante anti-PrP Fab HuM-R1 de la zona C-terminal (epitopo ~226-YDGRRS-231), que exhibe alta reactividad por la PrP de ratón y hámster. A una dilución 1:2.000-2.500: **6H4** (Prionics, Zurich, Switzerland), anticuerpo monoclonal primario de ratón que reconoce específicamente PrP de humano,

vaca, oveja, conejo, visón, hámster, ratón, rata y diversos primates en una zona central de la molécula (epitopo ~144-DWEDRYRE-152); **anti-oligómeros A11** (Biosource), anticuerpo policlonal de conejo que reconoce específicamente oligómeros y polipéptidos amiloidogénicos (149); **anti-fibras WO1**, gentileza de Roland Wetzfel, University of Tennessee, USA (150).

R2 (gentileza de Holger Wille, UCSF, San Francisco, USA), mAb recombinante que reconoce la PrP Fab por su extremo C-terminal; epitopo ~225-YYDGRRS-231 (151). Los conjugados de R2-Au (Aurion™) fueron utilizados en estudios de microscopía electrónica.

Secundarios. A una dilución 1:5.000: anti-ratón IgG de oveja (peroxidasa conjugado, Amersham Biosciences) o de cabra (fosfatasa alcalina conjugado, Tropix, Applied Biosystems); anti-conejo IgG de asno (peroxidasa conjugado, Amersham Biosciences); anti-humano IgG de cabra, fragmento F(ab')₂ (peroxidasa de rábano, Pierce). Alternativamente el anticuerpo secundario anti-ratón (peroxidasa conjugado) se usó a una dilución 1:3.000.

Detección de PrP

Tinciones

Azul Coomassie. Los geles (12-16%) sometidos a SDS-PAGE se tiñen con la solución AC durante 15-30 min y se destiñen suficientemente con SD durante ~1h. En su caso, el gel fue preservado con SP (Gel-Dry, Invitrogen) según las especificaciones del fabricante. Se utilizaron los marcadores de peso molecular “*SDS-PAGE standars, broad range*” (Bio-Rad).

Negro Amido. Los “*spots*” de 2 µl (dot blot) depositados sobre la membrana de nitrocelulosa (Protran, Whatman) se dejan secar al aire durante ~10 min; se lava la membrana 2 x 5 min con TL; se tiñe con la solución NA durante 5 min; se destiñe con 3 x 5 min lavados en SD; y se deja secar al aire (152).

Inmunoblots

Dot blot. Se deposita una gota de 2 μ l en cada cuadrícula dibujada sobre una membrana de nitrocelulosa (Protran, Whatman); se deja secar al aire durante ~10 min; y se lava la membrana 2 x 5 min con TL en agitación.

Western blot. Las muestras se diluyen a 1/2 en Tc (2,5% v/v final de 2- β -mercaptoetanol); se hierven durante 10 min y seguidamente se resuelven mediante SDS-PAGE, en gel discontinuo 4/12-16% y 1 mm de grosor, a 200 V durante 45-50 min en presencia de TE (Mini-Protean[®] 3 Cell, Bio-Rad). Posteriormente, se lleva a cabo una transferencia a membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore) a 60-75 V durante 90-180 min en presencia de TT (Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad) y en condiciones de frío.

Alternativamente se utilizaron las siguientes condiciones: gel continuo del 4-12% (Invitrogen) o gel con gradiente lineal Tris-HCl 4-15% (Bio-Rad); muestras diluidas a 2/3 en Tc (NuPAGE LDS Sample Buffer, Invitrogen Life Technologies, CA, USA) en condiciones reductoras; SDS-PAGE (Invitrogen); a 80 V durante 20 min + 150 V otros 60 min en TE (Invitrogen); transferencia a membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) a 0,8 A durante 1h en TT (Bio-Rad).

Se usaron marcadores de peso molecular preteñidos “*Prestained SDS-PAGE Standards, broad range o low range*” (Bio-Rad).

En ambos tipos de inmunoblot se procede al bloqueo de la membrana en TB con agitación, bien durante 1h a T^a ambiente, o bien, “overnight” a 4^o C; la membrana se incuba con el anticuerpo primario (anti-PrP), y posteriormente con el secundario (peroxidasa conjugado), a la dilución pertinente en TB durante 1h a T^a ambiente en agitación; después de cada anticuerpo se lava la membrana 5 x 5 min con TL en agitación. A continuación, como sustrato quimioluminiscente para la detección se añade sobre la membrana una mezcla de los reactivos A y B (ECL Plus, Amersham Biosciences) en proporción 1:40, y se

incuba en oscuridad a temperatura ambiente durante 5 min sin agitación, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Alternativamente la detección se realizó con el sistema “Tropix”, usando un anticuerpo secundario fosfatasa alcalina conjugado; e incubando la membrana a T^a ambiente 2 x 5-10 min en assay buffer con agitación y 5 min en CSS sin agitación y en oscuridad.

Finalmente, las bandas inmunorreactivas se visualizaron a través de un revelado manual mediante exposición a la membrana de una película fotográfica azul (TDI) en condiciones de oscuridad. El tiempo de exposición puede variar entre 1 s y varias horas. A continuación, la película se sumerge durante ~1 min en solución reveladora primero y fijadora después (Fuji); se lava en agua y se seca al aire. El resultado es digitalizado para un posterior tratamiento informático de la fotografía. En su caso, se procedió a un revelado automatizado y directo sobre la propia membrana con el equipo UVP Bioimaging System EC3 (Upland, CA) y el programa informático (LabWorks, UVP).

Deglicosilación de PrP^{Sc}

La reacción se llevó a cabo con un kit de deglicosilación (New England Biolabs). Las muestras diluidas convenientemente en H₂O milli-Q se incubaron a 100 °C durante 10 min en presencia de 1X tampón desnaturalizante de glicoproteínas; procurando que la concentración de proteína no exceda los 0,5 µg. A continuación, se dejaron enfriar y se añadió un volumen 1/10 de 10% nonidet P-40 (NP-40) y de 10X Tampón G7. Finalmente, se añadió 1-2 µl de N-glicosidasa F (PNGase F) de la solución “*stock*” (NEB), típicamente en un volumen final de reacción de ~20 µl, y se incubó a 37 °C durante 1 h, o “*overnight*”. La reacción se detuvo hirviendo directamente en tampón de carga (Bio-Rad) durante 10 min.

Purificación de PrP^{Sc}

Varios métodos han sido descritos para purificar PrP^{Sc} (153;154), todos ellos basados en el mismo principio de sedimentación en presencia de detergentes, y con variaciones menores en el número de ciclos o tiempos de centrifugación, composición de los tampones, etc. En este caso, la PrP^{Sc} se purificó a partir de cerebros de hámster sirio infectados con *scrapie* en fase terminal, usando una versión ligeramente modificada del método propuesto por Diringer y col. (155). Básicamente, la variación del método consiste en incluir un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete, Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania) a una concentración final de 1X en todos los tampones utilizados en el proceso hasta el penúltimo *pellet*, designado como P145c, según precisa el mencionado estudio (155), el cual se resuspende en ausencia de Complete. Naturalmente, otro aspecto diferenciador frente a los métodos propuestos para purificar de un modo directo PrP27-30, pasa por suprimir durante el procedimiento el tratamiento con PK.

De este modo, se prepara un homogenado de cerebro al 10% (p/v) en tampón de homogenización con un 10% de sarkosyl (ver tampones y soluciones), y se incuba a T^a ambiente durante 30 min. Este homogenado se filtra en un tamiz construido con gasas antes de ser transferido a tubos de 26,3 ml de policarbonato con tapas de aluminio (Beckman Coulter), donde posteriormente será sometido a cinco ciclos consecutivos de centrifugación en un rotor Ti (ultracentrífuga XL-90, Beckman Coulter). La primera centrifugación se realiza a baja velocidad, 16.000g (12.500 rpm), durante 15 min a 20 °C. A partir de este momento los restantes ciclos de sedimentación se llevan a cabo a gran velocidad, $g_{av} = 149.008g$ (45.000 rpm), y 20 °C sobre un pequeño colchón de 20% sacarosa (1-1,5 ml). Se recupera sobrenadante obtenido en el paso anterior, se añaden 8 ml 0,1 M EDTA (pH 7,6) y se somete a un ciclo de 90 min. En adelante, se desechan los sobrenadantes y se recuperan los sucesivos *pellets* generados en cada ciclo (Figura 10), que serán resuspendidos suficientemente con pulsos de sonicación a una amplitud de 50% con un homogenizador de ultrasonidos 4710 Series (Cole Parmer, Chicago, IL). El primero de estos *pellets* se resuspende en 0,1% de Z-3,14 (N-tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, Boehringer Mannheim, Alemania) y se centrifuga durante 60 min. El siguiente *pellet* se resuspende en H8.5 y se somete a un nuevo ciclo de sedimentación durante 60 min. Este

último *pellet* (P145c) generado se resuspende en 6 ml H8.5 en ausencia de inhibidores de proteasas, se añaden 2 ml T8.5 y se incuba toda la noche con agitación en presencia de 12 μl de 0,5 mM MgCl_2 , 10 μg de RNase y 10 μg de benzonasa. Finalmente, se añade Z-3,14 sin Complete, se centrifuga a 4 °C durante 120 min y se recupera el definitivo *pellet*. La suspensión final resulta de la resuspensión del último *pellet* aplicando 3-4 pulsos de 1 segundo a una amplitud de 50% en el citado homogenizador de ultrasonidos. A menudo, esta resuspensión tiene lugar en T8.5 con 1% sarkosyl (Merck) o 0,1% β -OG (Calbiochem), o incluso en H8.5, siempre en ausencia de inhibidores de proteasas, a concentraciones que suelen oscilar entre 1-2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La suspensión preparada de este modo es alicuotada y congelada para su posterior uso.

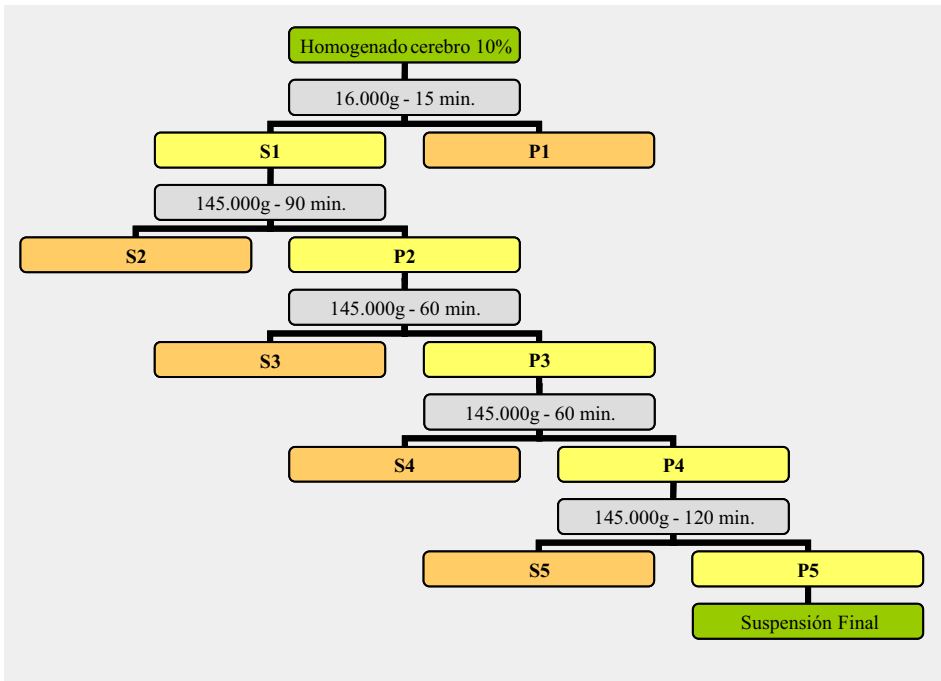


Figura 10: Diagrama esquemático del proceso de purificación para PrP^{Sc}.

S1-5: sobrenadantes; P1-5: *pellets*.

Tanto cerebros de hámsters adultos infectados con *scrapie* en fase clínica terminal, como cerebros sanos (control), han sido utilizados para realizar un seguimiento, mediante Western blot (mAb 3F4), de la presencia de PrP en las diferentes fases del proceso de purificación de PrP^{Sc} anteriormente descrito.

Caracterización y cuantificación de PrP^{Sc}

La pureza de una suspensión “*stock*” de PrP^{Sc} se evaluó mediante SDS-PAGE (gel 12-16%) y posterior tinción con Azul Coomassie. Se cortaron las principales bandas del gel; se llevó a cabo una reducción a 56 °C con bicarbonato amónico y ditioneitol (DTT), y una alquilación con iodoacetamida; las muestras fueron desteñidas con 25 mM bicarbonato amónico, y deshidratadas en acetonitrilo puro. A continuación, se practicó una digestión en gel con tripsina porcina (“Gold” grado espectrometría de masas, Promega) a 37 °C durante 3 horas; las muestras se lavaron y extrajeron con 0,2% TFA; y se eluyeron en una solución de 0,1% TFA y 50% ACN. Finalmente, se realizó un análisis proteómico mediante sendas técnicas de espectrometría de masas. De un lado, con un analizador de trampa iónica lineal modelo Q-trap LC-MS/MS (Applied Biosystems) acoplado a un nanoHPLC (Ultimate nanoLC, FAMOS Micro Autosampler y Switchos Micro Column Switching Module, LC Packings). Tras la fragmentación, el análisis con el programa informático *Analyst 1.4.1* (Applied Biosystems), y la búsqueda en la base de datos de proteínas “Mascot”, se logró confirmar la identidad de las bandas de PrP^{Sc} e identificar otras pequeñas bandas de impurezas. Paralelamente, y concentrando previamente la muestra en una placa “Anchor-Chip” (MTP AnchorChip - 600 µm Ø/384 anchors - TF, Bruker Daltonics), se realizó un análisis de las bandas correspondientes a PrP por MALDI-TOF (Autoflex, Bruker Daltonics) en modo reflectrón con ayuda del paquete informático para análisis e interpretación de espectros “BioTools” (FlexAnalysis, Bruker Daltonics), considerando los fragmentos producidos mediante corte con tripsina y, entre otros parámetros, la variación en el estado de oxidación de las metioninas y un margen de error de 125 ppm. Finalmente, la interpretación de los picos de los espectros obtenidos se llevó a cabo con los programas informáticos *m/z* y *Gpmaw 6.01* (Lighthouse data, Dinamarca).

La cuantificación de la concentración de PrP^{Sc} se estimó mediante dot blot con Negro Amido (156); para ello, se compararon diluciones seriadas de la suspensión final con diluciones seriadas de una proteína de concentración conocida, preferentemente PrP recombinante de hámster sirio, recSHaPrP(90-231) cortesía de Giuseppe Legname (UCSF, San Francisco, USA). Posteriormente, se llevó a cabo un análisis densitométrico de la señal obtenida con ayuda del programa informático *LabWorks 3.0 Image Analysis* (UVP,

Cambridge, UK). En paralelo, estos resultados se confirmaron mediante inmunodetección (mAb 3F4) bajo el fundamento de las técnicas de dot blot, sobre material previamente desnaturalizado, y Western blot.

Aislamiento de sPrP^{Sc}

La sPrP^{Sc} se aisló a partir de PrP^{Sc} purificada mediante ultracentrifugación a velocidad intermedia. Habitualmente, una alícuota (50-150 μ l) de la suspensión “*stock*” de PrP^{Sc} (~1 μ g/ μ l) obtenida según la descripción previa, y suficientemente homogenizada con vortex ó aplicando, si es preciso, 3-4 pulsos de sonicación de 1 segundo, se centrifuga en una ultracentrifuga TLX (Beckman, Fullerton, CA) a 40.000 rpm (g_{av} = 56.806g) durante 2 horas a 20 °C usando un rotor TLA-120-1 (Beckman Coulter). Se rescata el sobrenadante, y se resuspende el *pellet* mediante breve sonicación en un volumen de T8.5 y 1% sarkosyl equivalente al del sobrenadante. Ambas fracciones, sobrenadante y *pellet*, se trataron con 50 μ g/ml of PK a 37 °C durante 1 hora, y la reacción se detuvo con 2 mM Pefabloc (Fluka, St. Louis, MO). Las muestras se someten a SDS-PAGE (157), bien para ser examinadas mediante tinción con Azul Coomassie, o bien, para su posterior transferencia a membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA) y análisis mediante Western blot (mAb 3F4).

Proteólisis parcial de sPrP^{Sc} con PK

Varias alícuotas de 4 μ l (~0,6 μ g) de sPrP^{Sc} se sometieron a un tratamiento con concentraciones gradualmente crecientes de PK (0, 5, 10 y 50 μ g/ml), en un volumen final de reacción de 5 μ l, manteniendo siempre constante el tiempo y la temperatura de incubación (1 hora a 37 °C). Las muestras fueron analizadas mediante Western blot (mAb 3F4).

Inmunorreactividad dependiente de conformación

Para medir la inmunorreactividad dependiente de conformación de sPrP^{Sc} y rPrP^{Sc} se utilizó la técnica de dot blot descrita por Serban *y col.* (158). Ambas muestras fueron diluidas en H₂O milli-Q para igualar sus concentraciones a ~12,5 ng/μl. Por su parte, el “stock” (~1 μg/μl) de PrP recombinante, recSHaPrP(90-231), conservado a -70 °C en 6M hidrocloreuro de guanidinio, se renaturalizó por dilución 1/20 en 1X PBS; se incubó durante 1 h; y se diluyó convenientemente. Se depositaron gotas de 2 μl (~25 ng de PrP) de cada muestra sobre una membrana de nitrocelulosa (Protran, Whatman) y se dejaron secar durante ~10 minutos al aire. Las membranas, una vez lavadas con TL, fueron incubadas, en presencia o ausencia de 4M hidrocloreuro de guanidinio (Gnd-HCl), en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras ser de nuevo lavadas suficientemente con TL, las membranas fueron analizadas con el anticuerpo monoclonal 3F4. La intensidad de la señal obtenida para cada “spot” fue cuantificada mediante análisis densitométrico a través del programa informático *LabWorks 3.0 Image Analysis* (UVP, Cambridge, UK). La dependencia de conformación (Y) para cada “especie” molecular (N) fue calculada en virtud de la fórmula:

$$Y(N) = I_{(N, XM)} / I_{(N, 4M)}$$

donde $I_{(N, XM)}$ representa la intensidad media de la señal obtenida para cada tipo molecular testado en ausencia ($X=0$) o en presencia ($X=4$) de tratamiento con hidrocloreuro de guanidinio 4M. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes ($n = 4$), promediando en cada ensayo hasta 3-4 réplicas diferentes por “especie” molecular. Finalmente, la significación estadística de las diferencias de inmurreactividad (señal del mAb 3F4) encontradas entre las distintas muestras se evaluó mediante el test t-student.

Sedimentación en gradiente de sacarosa

Los gradientes se formaron en tubos de polialómero (11 x 34 mm) dispensando 600 μl de cada una de las siguientes concentraciones de sacarosa: 10, 15, 20, 25, 30 y 60%, preparadas en agua. 360 μl de homogenado de cerebro al 10% infectado con *scrapie* se

diluyeron $\frac{1}{2}$ en TNS y se incorporaron sobre uno de estos gradientes de sacarosa. Los gradientes se centrifugaron a 50.000 rpm ($g_{av} = 200.620g$) en un rotor MLS-50 (Beckman Coulter) durante 1 hora a 4 °C en una ultracentrifuga Optima MAX Biosafe (Beckman Coulter, Fullerton, California). Se extrajeron de arriba abajo 14 fracciones de 350 μ l (las fracciones 0₁ y 0₂, de 360 μ l, se corresponden con el volumen muestra cargado) y se tomó una pequeña porción (30 μ l) de cada una de ellas para su análisis por WB (mAb 3F4). A continuación, el volumen restante (~300 μ l) de cada una de las fracciones 1-12 se sometió a ultracentrifugación a 55.000 rpm (141.957g) durante 1 h a 4°C en un rotor MLA-130 (Beckman Coulter). Se retiraron los sobrenadantes, se añadieron 0.8 ml de TNS y volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. Nuevamente, se recuperaron los *pellets*, se resuspendieron en 200 μ l de TNS con 3-4 pulsos usando la mínima potencia del sonicador, y se tomó una alícuota de 20 μ l de cada uno de ellos para detectar por WB (mAb 3F4) la presencia de PrP en cada una de las 12 fracciones seleccionadas antes y después del tratamiento con PK (50 μ g/ml; 37 °C, 1 h).

De igual manera, alícuotas de 5 μ l de sPrP^{Sc} y rPrP^{Sc} (~2,5 μ g) fueron diluidas en 1,2 ml de TNS y cargadas sobre sendos gradientes del 10-60% de sacarosa (124). Los gradientes se ultracentrifugan a 50.000 rpm ($g_{av} = 200.620g$) durante 1 hora a 4 °C en un rotor MLS-50 (Beckman Coulter). Se recogen de arriba a abajo 12 fracciones de 300 μ l; sin contar con la fracción 0 (1,2 ml) e incluyéndose el *pellet* en la fracción 12. Una vez más, se toma una porción de 30 μ l de cada una de ellas, se someten a SDS-PAGE y se analizan mediante WB (mAb 3F4).

Como control de la estabilidad del sistema de gradientes de sacarosa, las fracciones 3 y 4 obtenidas en el fraccionamiento previo de sPrP^{Sc} se combinaron en una única muestra. Esta se sometió a diálisis en PBS (“overnight”; 4 °C) para eliminar la sacarosa usando cassettes de 0,1-0,5 ml de capacidad y un límite de exclusión molecular de 3,5 kDa (Kit Slyde-A-Lyzers, Pierce). Una vez dializada se llevó hasta 1,2 ml en TNS y se sometió a un segundo proceso de fraccionamiento. Al margen de la fracción 0 (1,2 ml), esta vez se recogieron 6 fracciones, en lugar de 12, doblando el volumen de cada una de ellas (600 μ l) respecto al primer fraccionamiento. Finalmente, la PrP de cada fracción fue concentrada mediante una precipitación en metanol (incubación a -20 °C “overnight” en

85% metanol frío y centrifugación a 14.000 rpm durante 30 min a 4 °C) previa al subsiguiente análisis por Western blot (mAb 3F4).

La calibración del sistema se realizó con la ayuda de dos marcadores de peso molecular (“gel filtration molecular weight markers”, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA), la Apoferritina de bazo de caballo (443.000 kDa) y el Azul Dextrano (2.000.000 kDa). Ambos se sometieron independientemente al proceso de centrifugación en gradiente de sacarosa en las condiciones previamente descritas. En el caso de la Apoferritina, se disolvieron ~0,05 mg del marcador en un volumen final de 1,2 ml de TNS; se recogieron 6 fracciones de 600 µl del gradiente; se tomó una alícuota (30 µl) de cada una de ellas y se resolvieron mediante SDS-PAGE (gel del 4-12%, Invitrogen). Posteriormente, tras teñir con Azul Coomassie (Simply Blue™ SafeStain, Invitrogen) y desteñir suficientemente con agua milli-Q, se procedió al análisis del gel. Por su parte, se disolvieron 0,1 mg de Azul Dextrano en 1,2 ml TNS; el intenso color de este marcador permitió observar su migración directamente en el propio gradiente.

Efecto del detergente

Diferentes *pellets* de PrP^{Sc} de las cepas 263K y DY, obtenidos a través del proceso de purificación previamente descrito, fueron resuspendidos en paralelo en un mismo volumen de T8.5 - sin detergente, con 1% sarkosyl, o con 0,1% β-octil-glucósido - aplicando breves pulsos de sonicación. Estas suspensiones se centrifugaron a 56.806g (40.000 rpm) a 20 °C durante 2 horas en un rotor TLA-120-1 (Beckman Coulter). Se rescataron los sobrenadantes y se resuspendieron los *pellet* en la misma solución y volumen de partida mediante sonicación con 3-4 pulsos de 1 s (< 40% amplitud). Las muestras se sometieron a SDS-PAGE (gel 16%) y se analizaron mediante Western blot (mAb 3F4).

PMCA

Se seleccionaron las fracciones 0 y 1+2 de sPrP^{Sc} y la 11 de rPrP^{Sc} obtenidas en los experimentos de sedimentación en gradientes de sacarosa descritos anteriormente y se igualaron sus concentraciones diluyendo convenientemente en tampón de conversión (CB), tras una estimación previa realizada usando la técnica de Western blot (mAb 3F4). Cantidades equivalentes de PrP, en un volumen de 8-10 µl, de cada una de estas tres fracciones fueron diluidas seriadamente a 1/2, desde 1/20 a 1/320, hasta un volumen final de 100 µl en NBH al 10% preparado en CB. Se tomaron alícuotas de 18 µl de cada una de estas diluciones que inmediatamente son apartadas y congeladas a -80 °C (muestras control). Los 82 µl restantes de cada dilución se someten a amplificación mediante PMCA durante 48 horas (122;159), en tubos PCR de polipropileno de 0,2 ml (Fisher Scientific, Hampton, NH), especialmente aptos para la sonicación por su gran resistencia y mínimo grosor. Estos tubos se insertan en un adaptador situado en la placa del microsonicador (Misonix Model 3000, Farmingdale, NY), y esta última se dispone de manera que las muestras permanezcan inmersas en el agua de la cubeta del sonicador donde serán incubadas sin agitación. El sonicador fue programado para aplicar ciclos de incubación de 30 minutos a 37 °C seguidos de pulsos de 20-40 s de sonicación a una potencia del 60-80%. Entre 18-20 µl, tanto de las muestras amplificadas como de las control, se incubaron con 50 µg/ml de PK durante 1 hora a 37 °C; esta reacción de digestión se detuvo inmediatamente hirviendo las muestras en presencia de tampón de carga (Invitrogen). Finalmente, se sometieron a SDS-PAGE (gel 4-12%); y la presencia de PrP^{Sc} resistente a PK generada de *novo* se analizó mediante Western blot (mAb 3F4).

Paralelamente, se tomaron dos alícuotas de 2 µl de sPrP^{Sc} (~0,5-1 µg) y se incubaron en T8.5 durante 1 hora a 37 °C, con o sin 50 µg/ml de PK, en un volumen final de reacción de 10 µl. La reacción fue detenida con 2 mM PMSF, y posteriormente, las dos muestras se diluyeron a 2 ml en CB para equiparar su concentración a la de las fracciones utilizadas en el experimento anterior. Se tomaron 20 µl de para analizar mediante WB (mAb 3F4) la presencia de PrP en ambas muestras; mientras, otros 10 µl de cada una de ellas se sometieron a PMCA durante 48 horas, siguiendo puntualmente el proceso descrito

con anterioridad para las muestras amplificadas y control; y analizando los resultados indistintamente por WB (mAb 3F4).

Estudios de Infectividad

Para testar la capacidad infecciosa *in vivo* de la sPrP^{Sc}, y comparar su eficiencia relativa frente a la fracción de rPrP^{Sc}, se llevaron a cabo una serie de bioensayos sobre el modelo de hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*). El cálculo de la cantidad de PrP a inocular, ~25 ng, se realizó a partir de una suspensión original de PrP^{Sc} purificada (1% sarkosyl); cuya concentración, estimada según la descripción previa, fue de ~1 µg/µl. A continuación, esta muestra fue fraccionada en sPrP^{Sc} y rPrP^{Sc}, y la proporción relativa de cada fracción se determinó mediante análisis densitométrico de las bandas de PrP obtenidas por WB (mAb 3F4) con el programa *LabWorks 3.0 Image Analysis* (UVP, Cambridge, UK); esta proporción sPrP^{Sc}/rPrP^{Sc} resultó ser de ~1/3, de donde [sPrP^{Sc}] = ~0,25 µg/µl y [rPrP^{Sc}] = ~0,75 µg/µl. Para inocular cantidades equivalentes de cada una de las fracciones, ambas se diluyeron convenientemente en PBS hasta alcanzar una concentración de ~0,83 ng/µl de PrP; para lo cual, hubo que diluir 300 veces la sPrP^{Sc} (0,003% sarkosyl), y 900 veces la rPrP^{Sc} (0,001% sarkosyl).

Acto seguido, se establecieron varios grupos de seis ejemplares de hámster sirio con cuatro semanas de edad y 40-60 g de peso que fueron inoculados en paralelo con 30 µl de la dilución de sPrP^{Sc} o rPrP^{Sc}, esto es, ~25 ng de PrP en cada caso. Ambas fracciones se administraron indistintamente con aguja hipodérmica de 25G por tres vías: intracerebral dorsal (ic-d), de acceso directo al cerebro a través del lóbulo interparietal; intracerebral lateral (ic-l), atravesando el escuamoso derecho a nivel del foramen post-glenoide para acceder al cerebelo; e intraperitoneal (ip), en este último caso, aumentando cinco veces (150 µl) la cantidad de inóculo (~125 ng de PrP).

Posteriormente, se midió el tiempo de supervivencia (TS) para cada ejemplar, definido como “días transcurridos después de la inoculación (dpi)”, y se halló la media aritmética (TS promedio) ± desviación estándar para cada uno de los seis grupos resultantes. Finalmente, se aplicó el test t-student para evaluar la significación estadística de

las diferencias en TS (dpi) encontradas entre los distintos grupos de animales inoculados; principalmente atendiendo a la fracción de PrP^{Sc} inoculada, pero también en función de la ruta de inoculación utilizada en cada caso.

La presencia de PrP^{Sc} resistente a PK (50 µg/ml; 37 °C; 1 h) en estos ejemplares fue corroborada mediante Western blot (mAb 3F4) a partir de un homogenado de cerebro al 10% en PBS.

Proteólisis parcial

Entre 1,5-3,5 µg de sPrP^{Sc} se trataron con tripsina (Promega, Madison, WI) a 37 °C durante 1 hora y en T8.5, en un volumen de reacción final de 10 µl, pero variando la proporción E:S utilizada en cada caso. Una cantidad equivalente de rPrP^{Sc} recibió el mismo tratamiento. Por su parte, el “*stock*” (~1 µg/µl) de recSHaPrP(90-231), conservado a -70 °C en 6M hidrocloreuro de guanidinio y recién renaturalizado, mediante dilución a 1/10 en PBS 0.1X (pH ~7.5) e incubación a T^a ambiente durante 30 min, se dializó (0,1-0,5 ml - 3,5 kDa, Slyde-A-Lyzers, Pierce) suficientemente en el mismo tampón durante 2 horas a T^a ambiente y en agitación, para eliminar la Gnd-HCl. A continuación, se expuso igualmente al tratamiento con tripsina. En todos los casos, la digestión se detuvo con 1X Complete (Roche). Las distintas mezclas de reacción fueron analizadas por Western blot.

Estas mismas mezclas se procesaron en paralelo para su análisis mediante espectrometría de masas. Así, una vez detenida la reacción de digestión, las muestras se desnaturalizaron añadiendo guanidina sólida hasta alcanzar una concentración final de 6M, se acidificaron con 10% ácido trifluoroacético (TFA) y se adsorbieron sobre una matriz de C-18 (Zip-Tips[®], Millipore), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los péptidos se eluyeron de la matriz en 10 µl de acetonitrilo al 50% y TFA 0.1%. Posteriormente, las muestras se evaporaron por centrifugación en un SpeedVac (Savant, Farmingdale, USA), se redisolvieron en 40 µl de hidrocloreuro de guanidinio 6M y se analizaron mediante nanospray LC-ESI/MS/MS.

Por su parte, ~4 µg de PrP^{Sc} total de DY, resuspendida en H₂O desionizada con 0,1% sarkosyl, se trataron con concentraciones crecientes de tripsina a 37 °C durante 1 h, en un volumen final de reacción de 10 µl en T8.5. En cada caso, la reacción se detuvo con Complete IX, y las muestras se analizaron mediante Western blot (mAb 3F4).

Finalmente, se analizó el resultado de la digestión parcial de 9 µl de sPrP^{Sc} con PK, esta vez manteniendo constante la concentración de enzima a 1 µg/ml (37 °C). El seguimiento de esta reacción se llevó a cabo tomando alícuotas de 3 µl (~0,6 µg de sPrP^{Sc}) a distintos intervalos de tiempo entre 5 y 30 min. La reacción se detuvo con 1 mM Pefabloc (Fluka, St. Louis, MO). A continuación, las muestras fueron deglicosiladas con PNGasa F (New England Biolabs) “overnight” a 37 °C y precipitadas con metanol (incubación a -20 °C durante ~30 min en 85% metanol frío y centrifugación a 14.000 rpm durante 30 min). Posteriormente se sometieron a SDS-PAGE (16%); y el resultado de la digestión a distintos tiempos se analizó por WB con el anticuerpo C-terminal R1 (InPro Biotechnology) a una dilución 1:2.500.

C-18: Zip-Tips y Clin-Prot

Zip-Tip[®] (Millipore). Se añade el volumen necesario de una solución concentrada (al 10%) de ácido fórmico o TFA hasta alcanzar una concentración final del 0,1% para garantizar que la muestra posea un pH < 4. La unión óptima de los péptidos o proteínas a la columna requiere la desnaturalización de la muestra con agentes caotrópicos (1-6 M Gnd-HCl). La matriz de C-18 se activa con 100% ACN y se equilibra con 0,1% TFA en agua mili-Q. Se aspira y dispensa la muestra 7-8 veces para permitir que los péptidos o proteínas se adsorban a la matriz; se lava con 0,1% TFA en agua mili-Q. Finalmente, los péptidos o las proteínas se eluyen en un volumen de 1-4 µl de 0,1% TFA/ 50% ACN.

Clin-Prot[®] (Bruker Daltonics). Se usó una suspensión de bolas magnéticas C-18 siguiendo las indicaciones del fabricante.

Nanospray LC-ESI/MS/MS

El análisis mediante nanospray LC-ESI/MS/MS se realizó con un espectrómetro de masas Applied Biosystems (ABI/MDS Sciex, Toronto, Canadá) Modelo QStar Pulsar equipado con una fuente de nano-electrospray (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark). Se cargaron de forma automática los digeridos trípticos redisueltos (20 μ l) sobre un cartucho C-18 de pre-concentración, y después de lavar, los péptidos atrapados en el cartucho se cromatografiaron en una columna de fase reversa (Vydac 238EV5.07515, 75 μ x 150 mm; Hesperia, CA) acoplada en su extremo final con una punta de nebulización (“spray”) (FS360-50-5-CE, New Objective, Woburn, MA). Se utilizó un sistema de LC de nano-flujo LC Packings (Dionex, Sunnyvale, CA) con módulo automatizado de muestreo, módulo de intercambio de columnas, bomba de carga, y sistema de bombeo de solventes de nano-flujo, para eluir la columna. Los solventes de elución fueron: A (0,5% ácido acético en agua) y B (80% acetonitrilo, 0,5% ácido acético). Se eluyeron las muestras a 250 nl/min con el siguiente gradiente: 8% B a los 0 min hasta 80% B en un gradiente lineal de 15 min; mantener a 80% de B durante 5 min, vuelta a un 8% de B durante 10 min. El QStar Pulsar fue calibrado externamente a diario y siempre se operó por encima de una resolución de 7.000. El ciclo de adquisición de 6 s consistió en un barrido de MS de búsqueda de 1s (“MS survey scan”) seguido de un barrido MS/MS de 5 s. Se seleccionaron para ser fragmentados los iones de m/z de entre 400 y 1.000 con estados de carga de +2 a +5 y con intensidades mayores que 40 cuentas en el barrido de búsqueda. Se ajustó la ventana de exclusión dinámica para que fuesen siempre excluidas las masas fragmentadas previamente. La energía de colisión optimizada para el estado de carga y valor de m/z se seleccionó automáticamente por el programa Analyst QS 1.1 después de ajustar los parámetros para obtener una fragmentación satisfactoria del péptido del Glu fibrinógeno (+2) y de los del ACTH (+3 y +4). Se utilizó nitrógeno como gas de colisión y la presión de la célula de colisión se mantuvo entre 3×10^{-6} y 6×10^{-6} Torr. Se procesaron los barridos de búsqueda TOF-MS externamente calibrados con la herramienta “LCMS Reconstruct” del programa Analyst. El resultado es una lista de masas moleculares peptídicas calculadas mediante deconvolución de estados de carga múltiples y la posterior identificación de las especies monoisotópicas ^{12}C .

Digestión química con NTCB

Entre 15-20 μg de tPrP^{Sc} (purificada de 263K o DY) o sPrP^{Sc} (263K) se redujeron en 2 mM DTT durante 1 hora a 37 °C en condiciones desnaturalizantes (Gnd-HCl 6M; tampón Tris 100 mM; pH 8,00). En el mismo tampón, las muestras fueron cianiladas con 2-nitro-5-(tiocianato)-benzoico (NTCB) 10 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras una precipitación en metanol (incubación a -20 °C durante ~30 min en 85% metanol frío y centrifugación a 14.000 rpm durante 30 min), las muestras se redisolviéron en tampón Tris 100 mM con 6M Gnd-HCl. La PrP^{Sc}, cianilizada en los grupos tiol, se cortó mediante hidrólisis alcalina con NaOH 150 mM durante 15 minutos a 37°C. El proceso finaliza con la adición de ácido trifluoroacético (TFA) hasta alcanzar un pH final de 2–3. Todos los tampones y reactivos utilizados en las distintas reacciones a lo largo del proceso corte con NTCB fueron preparados en el momento.

De acuerdo con las instrucciones del fabricante, los péptidos de PrP^{Sc} se recuperaron de la mezcla de reacción por adsorción usando una columna C-18 (Zip-Tips[®], Millipore) o bolas magnéticas C-18 (Clin-Prot[®], Bruker Daltonics). Los péptidos se eluyeron de la columna en 3-4 μl de acetonitrilo al 50% y TFA 0.1%, o de las bolas en 5 μl de 50% ACN en agua desionizada, y se sometieron directamente a análisis por MALDI-TOF; alternativamente, el eluido se concentró evaporando previamente por centrifugación en un Speed-Vac (Savant, Farmingdale, USA).

Análisis mediante MALDI-TOF

Una porción de 1-2 μl del eluido peptídico se mezcla con un volumen equivalente de una solución acuosa de la matriz (Bruker Daltonics) saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (α -chc) o ácido sinapínico preparada en acetonitrilo y 0.1% TFA en proporción 1:2. Se deposita 1 μl de esta mezcla sobre una placa de muestras (Bruker Daltonics), se deja secar al aire, y se analiza por MALDI-TOF (Bruker Autoflex) en modo reflectrón (< 4.000 Da) o lineal (> 4.000 Da) según el rango de masas escrutado, usando “pepcal” o “proteína I” (alícuotados en una solución acuosa 0,1% TFA siguiendo las especificaciones del fabricante) como calibrante (Bruker Daltonics), respectivamente. Los

péptidos se ionizan mediante disparos con un láser, a una frecuencia de 25 Hz, con pulsos de 140-150 ns, promediando entre 25-30 disparos.

El análisis de los picos del espectro obtenido se realizó con los programas informáticos *m/z* y *Gpmaw 6.01* (Lighthouse data, Dinamarca).

Obtención de fibras amiloides

Las muestras deben encontrarse desaladas y liofilizadas, de lo contrario se dializan en 0,1% TFA y se liofilizan.

Proteína β -amiloide 1-40. 250 μg de proteína liofilizada (sal de trifluoroacetato, Bachem) se disolvieron en 25 μl de NaOH 0,1 M, se sonicaron en un baño de ultrasonidos durante 5 min y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación se diluyó con tampón Tris 0,1 M (pH 7,4), en presencia de 0,05% azida sódica, hasta alcanzar una concentración final de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Esta solución se incubó a 37 °C sin agitación, aunque vortexeando levemente cada cierto tiempo.

Prion Protein 106-126 (PrP106-126). Los péptidos desalados y liofilizados (sal de trifluoroacetato/ humano, Bachem) se disolvieron en una solución acuosa al 50% de acetonitrilo (ACN), se alicuotaron en alícuotas de 250 μg y se evaporaron por centrifugación en un Speed-Vac (Savant, Farmingdale, USA) durante ~2 h. Los péptidos desecados se disolvieron en 200 μl de dimetil sulfóxido (DMSO) o hexafluoroisopropanol (HFIP) y se sonicaron en un baño de ultrasonidos durante 30 segundos. La solución se transfirió con una pipeta Hamilton a un nuevo vial de 1,5 ml (Eppendorf) al que previamente se han añadido 700 μl de agua y practicado 3-4 agujeros con una jeringa (18 G) en la tapa para facilitar la evaporación del disolvente. Opcionalmente, este paso puede ser acelerado utilizando un Speed-Vac a 300 rpm y 0,2 bar de vacío. Tras homogenizar suficientemente, la muestra se incubó a 65 °C durante 30 min, procurando en todo momento que no se formen burbujas ni llegue a hervir. Finalmente, se añade un pequeño imán y se incuba a T^a ambiente con agitación.

En ambos casos, las muestras se vortexearon suficientemente y se analizaron mediante dot blot en membrana de nitrocelulosa con los anticuerpos anti-oligómeros A11 y anti-fibras WO1 a diferentes tiempos. Paralelamente, la presencia de fibras se corroboró mediante microscopía electrónica de transmisión (Philips CM-12, FEI Company, Eindhoven, Países Bajos).

Inmunorreactividad frente a anticuerpos conformacionales específicos de amiloide

Suspensiones de PrP^{Sc} de las cepas 263K y DY en T8.5 (1% sarkosyl) se diluyeron a 1/2, bien en este mismo tampón; o bien en Tc para ser previamente desnaturalizadas a 100 °C durante ~10 min. En ambos casos, se depositaron 2 µl (~1 µg) de cada muestra sobre una membrana de nitrocelulosa (Protran, Whatman) y se analizaron por dot blot con los anticuerpos (1:2500) anti-oligómeros A11 (160) y anti-fibras WO1 (161). Paralelamente, como control de carga de proteína, este mismo análisis se llevó a cabo mediante tinción con Negro Amido; e igualmente, como control positivo de PrP se utilizó el anticuerpo monoclonal 3F4 (1:5000), aunque en este caso usando 10 veces menos cantidad de muestra (~0,1 µg). En todos los casos se utilizó BSA en exceso (~5 µg) como control negativo de los anticuerpos A11 y WO1.

La especies moleculares sPrP^{Sc}, rPrP^{Sc}, PrP27-30 y el fragmento PrP106-126 también fueron testadas con los anticuerpos A11 y WO1; usando como control positivo la proteína β-amiloide 1-40; y como controles negativos la ribonucleasa A o BSA.

Microscopía electrónica

Las muestras fueron enviadas al laboratorio del Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek Hospital (Amsterdam, Países Bajos) donde se procedió a su análisis mediante tinción negativa (TEM). Por su parte, los estudios de crio-TEM se realizaron en el laboratorio de la Universidad Técnica de Eindhoven. En ambos casos, las imágenes fueron obtenidas por Matthijn Vos.

El análisis de las muestras mediante microscopía electrónica de transmisión se llevó a cabo utilizando sendas técnicas e instrumentos de TEM con tinción negativa y crio-TEM. En ambos casos, se usaron rejillas de cobre recubiertas de carbono de 200 de malla, R2/2 Quantifoil Jena (Aurion). Las rejillas Quantifoil se trataron con plasma de superficie usando un recubridor de carbono Cressington 208 funcionando a 5 mA durante 40 segundos. Dependiendo del tipo de microscopio empleado, siempre se utilizó el voltaje de aceleración más alto posible.

Los conjugados de R2-Au (Aurion™), marcados por encargo con partículas de oro de 0.8-1,2 nm (*ultrasmall gold conjugates*) y 5 nm mediante adsorción al anticuerpo monoclonal R2, se usaron tal cual con una densidad óptica (DO) de 1. Según el tamaño de las partículas de oro se adhiere un anticuerpo (0.8-1,2 nm) o 2-3 (5 nm). En cada caso, la muestra se mezcló con la solución de R2-Au en una proporción 1:1, y se incubó durante 30 min. Asimismo, se utilizaron como referencia de tamaño partículas libres de oro de 10 nm. Dependiendo del tipo de análisis, llegado este punto se procedió a la vitrificación de las muestras siguiendo el procedimiento que se describe a continuación.

TEM

Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Tecnai™ 12 tipo spirit (FEI, Eindhoven, Países Bajos) equipado con un filamento LaB6 funcionando a 120 kV. Las imágenes se grabaron con una cámara 4k x 4k Eagle CCD acoplada en la parte inferior del equipo.

Durante la preparación de las muestras para tinción negativa, la rejilla de malla de 200 y cobre recubierta de carbono se trató con plasma de superficie, tras lo cual, se dispuso sobre ella una gota de la solución de la muestra durante 15 minutos. A continuación, la rejilla se lavó con tampón o agua. Finalmente, la rejilla se incubó sobre una gota de una solución acuosa de 2% acetato de uranilo durante 2 minutos y se secó manualmente desde un lado usando papel de filtro.

Crio-TEM

El estudio se realizó con un TEM Titan KriosTM (FEI, Eindhoven, Países Bajos) equipado con un emisor de campo operando a 300 kV (Figura 41). Las imágenes se grabaron usando un filtro de energía post-columna (Gatan) equipado con una cámara CCD 2k x 2k (Gatan).

Antes del proceso de vitrificación, las rejillas Quantifoil se trataron con plasma de superficie. Para el análisis mediante crio-TEM se usó un crio-fijador funcionando a ~ -170 °C. El proceso de vitrificación de la muestra se llevó a cabo con un robot de vitrificación (Figura 41) automatizado VitrobotTM Mark III (FEI, Eindhoven, Países bajos).

Para el procesamiento de las muestras para crio-TEM, pequeñas alícuotas (3 µl) de la solución de la muestra se aplicaron sobre las rejillas R2/2 Quantifoil Jena previamente tratadas con plasma de superficie dentro de la cabina (100% de humedad relativa) del VitrobotTM a 22 °C. El exceso de líquido se secó con papel de filtro usando un aparato de secado automático dentro de la cabina del VitrobotTM. La rejilla se sumergió rápidamente en el etano líquido colocado justo en el exterior de la cabina. Las muestras vitrificadas se almacenaron en nitrógeno líquido y se analizaron a -170 °C (Crio-fijador, Gatan) en condiciones de baja dosis de electrones.

RESULTADOS

RESULTADOS

Purificación de PrP^{Sc}

En las diferentes fases del proceso de purificación de PrP^{Sc}, descrito en el apartado anterior, se obtienen una serie de sobrenadantes y “*pellets*” consecutivos donde se ha realizado un seguimiento de la presencia de PrP utilizando la técnica de Western blot y el mAb 3F4 (Figura 11). De este modo, partiendo de cerebros de hámster infectados con la cepa 263K, y usando cantidades equivalentes de cada una de las fases representadas, puede apreciarse que la señal asociada a PrP aparece siempre en los sucesivos *pellets* (Figura 11A); a excepción del primer sobrenadante (S1), resultado de una primera centrifugación a baja velocidad que permite desechar buena parte de las estructuras más densas y otros restos celulares residuales. Idéntico resultado, aunque con una migración electroforética visiblemente mayor, se obtiene cuando estas mismas muestras se someten antes a un tratamiento con PK en condiciones estándar (50 µg/ml; 37 °C; 1 h), confirmando la presencia de PrP resistente a proteínasa (162) exactamente en las mismas fracciones donde previamente se detectó señal para el mAb 3F4 en ausencia de tratamiento (Figura 11B).

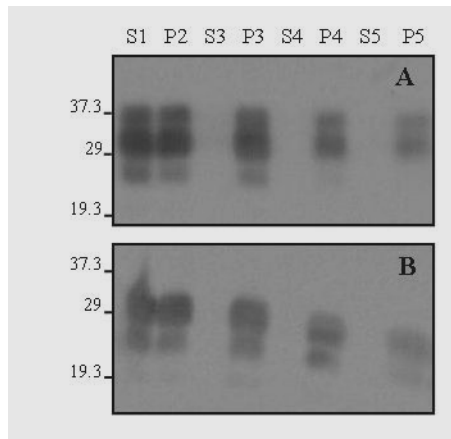


Figura 11: Western blot (mAb 3F4) mostrando algunas de las fases más representativas del proceso de purificación para PrP^{Sc}. A: sin PK. B: con PK (50 µg/ml; 37 °C; 1 h).

S1-5: sobrenadante; P1-5: *pellet*.

A diferencia de lo que sucede durante una purificación de PrP^{Sc} ordinaria con preparados derivados de cerebros de hámster sirio infectados con *scrapie* (163), cuando un homogenado procedente de cerebros de ejemplares sanos (control) se somete al mismo procedimiento (Figura 12), no aparecen trazas de señal específica de PrP a partir del segundo sobrenadante “S2” (162). Inicialmente, el homogenado de cerebros sanos de hámster sirio al 10% (p/v), preparado en tampón de homogenización con un 10% de sarkosyl, no contiene tipo alguno de PrP resistente a PK (50 µg/ml; 37 °C; 1 h). Tras una primera centrifugación a baja velocidad se aprecia claramente la presencia de PrP (PrP^C) en el sobrenadante (S1). En un siguiente paso de sedimentación a alta velocidad, toda la PrP apreciable permanece en el sobrenadante (S2), por consiguiente, es desechada y no aparece en sucesivos sobrenadantes y *pellets*. Consecuentemente, y a diferencia de lo que sucede con animales enfermos, nótese que en este caso se obtiene una suspensión final a partir del *pellet* P5 en la que no se aprecia presencia alguna de señal asociada a PrP (Figura 12). Previamente, en un estudio de McKinley *y col.* se estimó que tan solo el ~10% de la PrP de un cerebro de hámster afectado de *scrapie* se corresponde con PrP^C (38).

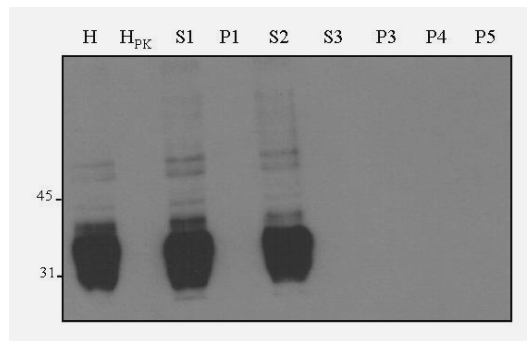


Figura 12: Distribución de PrP en las sucesivas fases del proceso de purificación estandarizado para PrP^{Sc} a partir de cerebros sanos de hámster sirio. Western blot (mAb 3F4) mostrando algunos pasos representativos del procedimiento realizado con cerebros sanos. H=homogenado; H_{PK}= homogenado tratado con PK (50 µg/ml, 37°C, 1h). S1-5: sobrenadantes; P1-5: *pellets*.

Cuantificación de PrP^{Sc}

El grado de pureza en PrP^{Sc} de los preparados finales obtenidos tras el proceso de purificación representa típicamente el ~75-80% de la intensidad total de las bandas del gel, como se desprende de los resultados obtenidos mediante SDS-PAGE y posterior tinción con Azul Coomassie (Figura 13D). Esta estimación se ajusta igualmente a purificados de PrP^{Sc} obtenidos a partir de las cepas 263K o DY; no obstante, y conforme a lo esperado, se aprecia un claro incremento de la pureza de los preparados cuando se purifica directamente PrP^{Sc} 27-30 de 263K (Figura 13D). Además, el análisis proteómico de las principales bandas del gel mediante Q-trap nanoHPLC y posterior búsqueda en Mascot (score > 44; p<0.05) confirmó la identidad de las bandas PrP en sus diferentes estados de glicosilación; y determinó la presencia de dos proteínas que copurifican durante el proceso: la Ferritina (~500 kDa), cuya cadena pesada se halla constituida por 24 subunidades de ~21 kDa; y la Tubulina- β (~50 kDa). Al nivel de esta última, sin resolverse definitivamente en el gel, se han detectado trazas de PrP que, en función de su peso molecular aparente en relación a su capacidad de migración, fácilmente pudieran corresponderse con dímeros de PrP^{Sc} (Figura 13D).

Paralelamente, el análisis de estas mismas bandas de PrP por MALDI-TOF en modo reflectrón (rango < 4.000 Da) ratifica los resultados anteriores; una vez que los espectros obtenidos (Biotools, Bruker) son examinados con los programas *m/z* y *Gpmaw 6.01*. Este análisis permite asignar péptidos trípticos concretos a determinados picos con una enorme exactitud (< 0,3 Da) entre la masa teórica de cada fragmento de digestión y la observada para cada pico. De este modo, también se han conseguido identificar otros picos, como aquellos que se corresponden con productos que presentan un grado variable de oxidación a nivel de las metioninas (Figura 14). No obstante, conviene recordar que la identificación de otros fragmentos teóricos escapa a este análisis, ya que, por ejemplo, podrían encontrarse glicosilados en la molécula nativa.

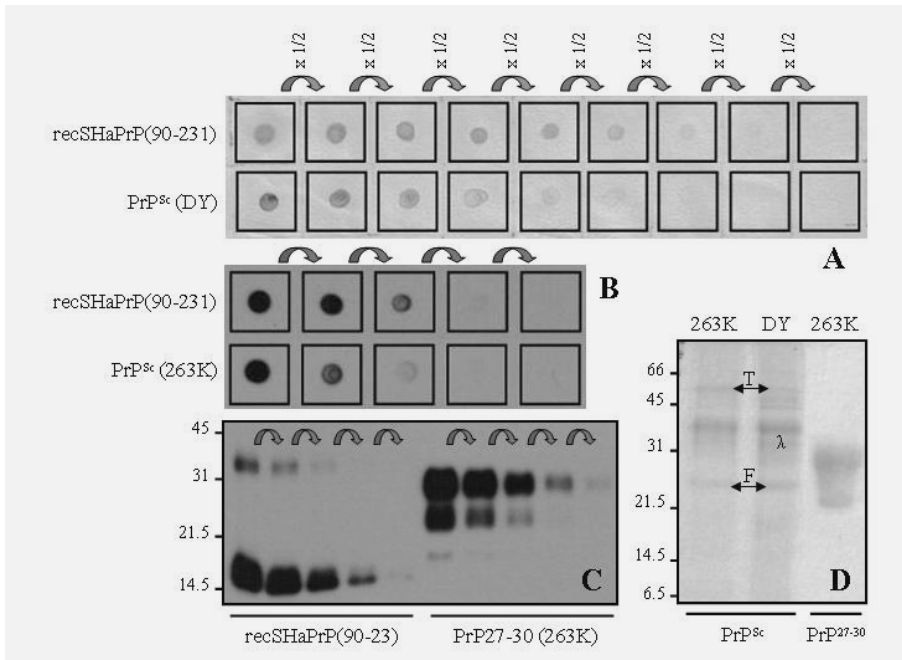


Figura 13: Estima de la pureza y concentración de una suspensión de PrP^{Sc}. Cuantificación de la concentración de PrP^{Sc} mediante diluciones seriadas y tinción con Negro Amido (A) o inmunodetección (mAb 3F4) usando la técnica de dot blot (B) o Western blot (C). Análisis del grado de pureza mediante SDS-PAGE (gel 12-16%) y posterior tinción con Azul Coomassie (D). F: Ferritina (cadena pesada, ~21 kDa); T: Tubulina-β (~50 kDa); λ: banda de PrP correspondiente a la forma monoglicosilada.

Un análisis densitométrico (*LabWorks 3.0 Image Analysis*, UVP, Cambridge, UK) para evaluar la intensidad de los “spots” obtenidos mediante dot blot con Negro Amido (164) a partir de diluciones seriadas ($x \frac{1}{2}$) de una suspensión de PrP^{Sc} representativa, y usando la SHaPrP(90-231) recombinante como estándar, permite realizar una estima de la cantidad de PrP^{Sc} obtenida tras el proceso de purificación (Figura 13A). Así, considerando que de una purificación optimizada para 11 cerebros de hámster se obtiene típicamente alrededor de 1 mg, y dado que no se espera que la eficiencia del proceso alcance el 100%, la cantidad de PrP^{Sc} en cerebros de hámster afectados con *scrapie* en fase clínica terminal podría incluso superar los 90 µg/cerebro. Estudios previos habían estimado ~50 µg/cerebro usando PrP27-30 (165). Paralelamente, el resultado de esta estima puede ser reproducido

mediante inmunodetección (mAb 3F4) usando las técnicas de dot blot (Figura 13B) y Western blot (Figura 13C) sobre material previamente desnaturalizado.

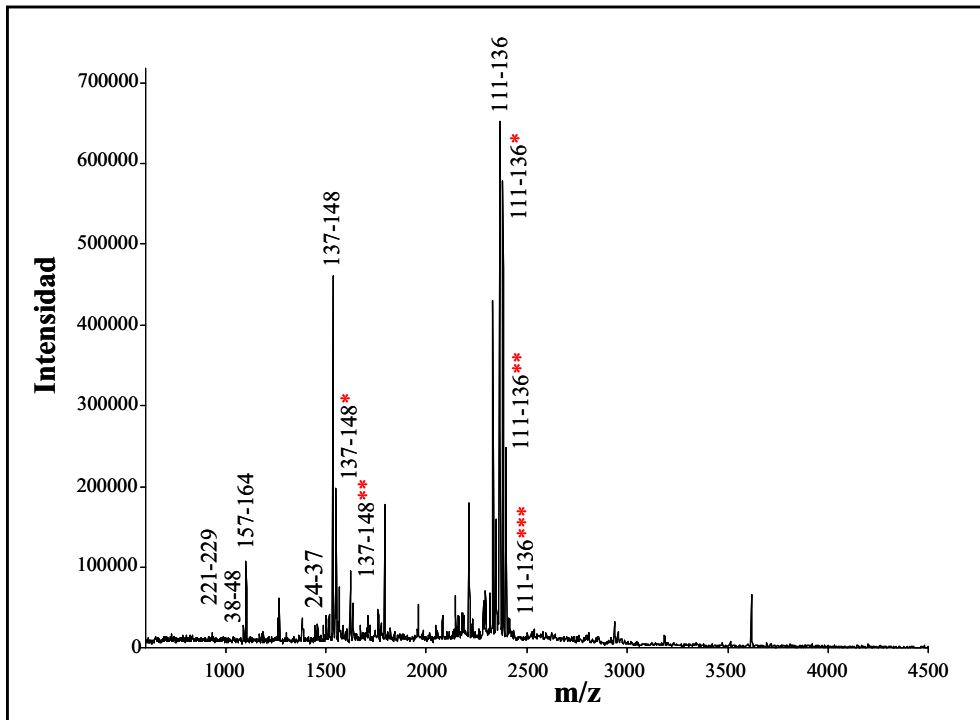


Figura 14: Análisis proteómico de la banda λ . Espectro representativo de MALDI-TOF en modo reflectrón obtenido tras la digestión triptica en gel de la banda λ , correspondiente a la forma de PrP monoglicosilada. El análisis se llevó a cabo con los programas *m/z* y *Gpmaw* 6.01. La muestra contenida en una matriz de α -cnc fue concentrada en una placa de MALDI “MTP AnchorChip” (600 μm \varnothing /384 anchors - TF, Bruker Daltonics). Cada * representa una oxidación en metionina.

Aislamiento de la fracción sPrP^{Sc}

Tal y como se describe previamente en la sección de materiales y métodos, la centrifugación de una suspensión de PrP^{Sc} purificada a una fuerza intermedia genera un sobrenadante y un *pellet* notoriamente divergentes en términos de resistencia a PK. El sobrenadante, cuyo porcentaje de PrP representa habitualmente entre el 35-55% de la PrP total de partida, se caracteriza por poseer una baja resistencia a la acción de la PK con

respecto al *pellet*. Optimizando las condiciones de centrifugación (fuerza, tiempo y temperatura), y según se desprende de los resultados obtenidos mediante tinción del gel con Azul Coomassie o del propio análisis por Western blot usando el anticuerpo monoclonal 3F4 (Figura 15), se ha logrado obtener una fracción soluble de PrP^{Sc} (sobrenadante) completamente susceptible a la hidrólisis con PK si se aplica un tratamiento estándar de 50 µg/ml durante 1 hora a 37 °C (sPrP^{Sc}). Bajo las mismas condiciones, se observa como una cantidad equivalente de material procedente del *pellet* muestra el característico perfil del núcleo resistente a PK (PrP27-30), cuya movilidad electroforética se ve ostensiblemente incrementada a consecuencia del truncamiento que sufre la molécula y que elimina los primeros ~65-70 residuos del extremo amino-terminal. Por contraposición, usamos el término de “rPrP^{Sc}” para referirnos a esta fracción de PrP^{Sc} no soluble (*pellet*).

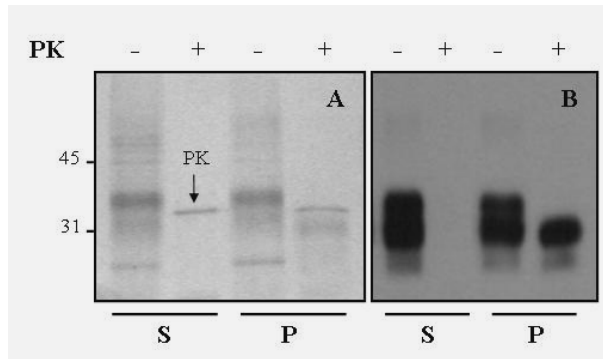


Figura 15: Aislamiento de la fracción de PrP^{Sc} sensible a PK. Ambas fracciones, sobrenadante y *pellet*, obtenidas tras la ultracentrifugación de PrP^{Sc} a velocidad intermedia, $g_{av} = 56.806g$ (40.000 rpm), fueron sometidas a un tratamiento con PK bajo condiciones estándar (50 µg/ml; 37 °C; 1h), y analizadas mediante SDS-PAGE. **A:** Tinción con Azul Coomassie; **B:** Western blot (mAb 3F4).

S: sobrenadante; P: *pellet*.

Caracterización bioquímica de la sPrP^{Sc}

Resistencia parcial a PK

A pesar de que la sPrP^{Sc} exhibe esta susceptibilidad a la digestión con PK bajo condiciones estándar, el análisis mediante Western blot (mAb 3F4) de una porción de la

fracción de sPrP^{Sc} sometida a un tratamiento con concentraciones gradualmente decrecientes de PK (50, 10 y 5 µg/ml), pero manteniendo constantes el tiempo y la temperatura de incubación (1 h a 37 °C), revela un cierto grado de resistencia parcial a la digestión con este enzima proteolítico (Figura 16). Este comportamiento se aleja del previsto para la isoforma PrP^C, que sería completamente degradada bajo las mismas condiciones de digestión.

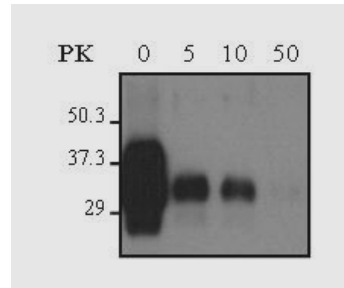


Figura 16: Resistencia parcial de sPrP^{Sc} a PK. Western blot (mAb 3F4) mostrando el comportamiento de la fracción de sPrP^{Sc} tras ser sometida a concentraciones paulatinamente crecientes de PK (µg/ml) a 37 °C durante 1 hora.

Resistencia a tripsina

Una vez analizada la conducta frente a PK, se realizaron una serie de experimentos destinados a caracterizar el comportamiento de la sPrP^{Sc} cuando se expone a la digestión con tripsina; un enzima menos agresivo cuya especificidad de acción proteolítica (corta en Lys y Arg por el lado carboxilo del enlace peptídico) podría conferir, a posteriori, una herramienta útil para abordar un análisis estructural de la molécula. El seguimiento de la reacción de digestión de la sPrP^{Sc} con tripsina mediante Western blot, a 37 °C durante 1 hora, con proporciones E:S en un rango de 1:20-1:60 (existe cierta variabilidad experimental en función de los diferentes sustratos y/o lotes de tripsina), nos muestra la desaparición virtualmente completa de la señal específica asociada al anticuerpo monoclonal anti-PrP 3F4, revelando que esta fracción posee una considerable susceptibilidad a la acción de este enzima proteolítico (Figura 17A). Por contra, una cantidad equivalente de rPrP^{Sc}, tratada en las mismas condiciones y con idéntica proporción de tripsina, mostró una elevada resistencia a tripsina; a tenor de la intensidad de la banda

que rinde, equiparable a la que apreciamos en la muestra sin tratar, aunque exhibiendo una mayor movilidad electroforética (Figura 17A). Esta aparente diferencia de peso molecular sugiere un corte específico de la rPrP^{Sc} a nivel de las argininas de las posiciones 37 y 48, contenidas en una zona de la molécula que probablemente adquiere una estructura desplegada (“random-coil”) a nivel del extremo amino-terminal. Conforme con los resultados previamente descritos para PrP^{Sc}, esta “cola” podría extenderse hasta las proximidades de la Gly-90, como parece indicar la presencia del punto de corte para PK en torno a esta posición (38).

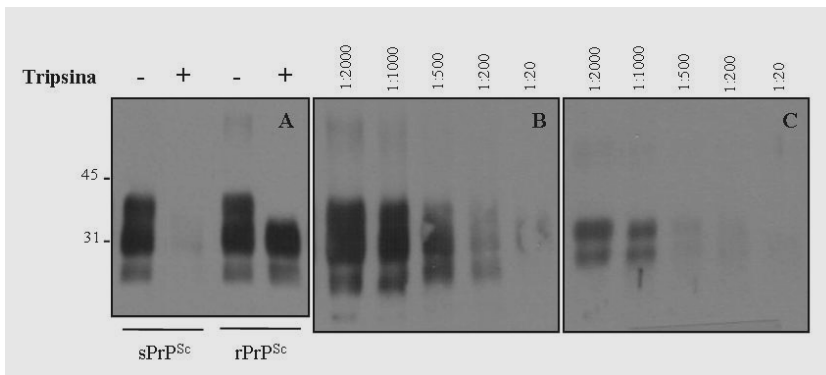


Figura 17: Susceptibilidad de sPrP^{Sc} a la digestión con tripsina. Análisis mediante Western blot de preparados de sPrP^{Sc} y rPrP^{Sc} previamente sometidos a tratamiento con tripsina a 37 °C durante 1 hora. **A:** Cantidades equivalentes de sPrP^{Sc} y rPrP^{Sc} tratadas con una proporción E:S de 1:60 (mAb 3F4). **B y C:** Perspectiva de la digestión parcial de sPrP^{Sc} con el incremento progresivo de la proporción tripsina:sustrato a través de los mAb 3F4 y 6H4, respectivamente.

De la susceptibilidad a tripsina mostrada por la sPrP^{Sc} surge la posibilidad de realizar sobre esta fracción una digestión parcial. El análisis mediante Western blot pone de manifiesto este efecto tras exponer a la sPrP^{Sc} al tratamiento con proporciones progresivamente crecientes de tripsina a 37 °C durante 1 hora. La disminución paulatina de la intensidad de la señal con el aumento progresivo de la proporción E:S se observa igualmente si el seguimiento de las reacciones se realiza con un anticuerpo anti PrP de la zona N-terminal (epitopo ~107-115), como el mAb 3F4 (Figura 17B), o si se utiliza otro de una zona más interna de la molécula (epitopo ~144-152), como el mAb 6H4 (Figura 17C). Esta proteólisis subordinada a la concentración de tripsina utilizada en cada caso, y

aparentemente independiente de la zona que reconoce cada anticuerpo, sugiere una degradación generalizada de la molécula. De otro modo, este hecho podría ser interpretado como un mero reflejo de que la degradación estuviese afectando exclusivamente a un determinado epitopo.

Inmunorreactividad dependiente de conformación

Otra particularidad reveladora de la PrP^{Sc} “clásica” frente a la PrP^C es su inmunorreactividad dependiente de conformación (CDI), descrita por Serban y col. (129). Precisamente, esta reactividad diferencial manifestada por la PrP^{Sc} frente a determinados anticuerpos al ser desnaturalizada con agentes caotrópicos, puede ser utilizada como criterio diferenciador entre ambas isoformas. En efecto, la desnaturalización de la PrP^{Sc} afecta al grado de exposición de determinados epitopos aumentando la accesibilidad de aquellos que pudieran encontrarse previamente “ocultos” o “inaccesibles”; mientras, en la estructura globular en estado nativo de la PrP^C estos epitopos permanecen expuestos, por lo que su inmunorreactividad no depende de la desnaturalización. Al respecto, se ha testado el comportamiento de la fracción sPrP^{Sc} usando una versión del ensayo CDI, y se ha establecido una comparación frente a rPrP^{Sc}, tPrP^{Sc} y SHaPrP(90-231) recombinante. En este formato, igualmente basado en la técnica de dot blot, la inmunodetección se realizó con el anticuerpo monoclonal 3F4 sobre cantidades equivalentes de PrP de cada una de las muestras; depositando gotas de 2 µl sobre una membrana de nitrocelulosa; con o sin tratamiento previo con Gnd-HCl 4M (Figura 18A). En consonancia con los resultados publicados para extractos de cerebro tratados con PK (129), la tPrP^{Sc} total (tPrP^{Sc}) purificada evidencia un incremento sustancial en la intensidad de la señal detectada después del tratamiento con Gnd-HCl (datos no mostrados). De un modo similar, la rPrP^{Sc} experimenta un comportamiento que se traduce en el reconocimiento diferencial del mAb 3F4 por las muestras tratadas y sin tratar con el agente desnaturalizante, reflejando, igualmente, una elevada dependencia a la desnaturalización. Por su parte, en la sPrP^{Sc} se observa que el tratamiento con Gnd-HCl produce un incremento significativo, pero en todo caso menor, de la intensidad de la señal resultante, exhibiendo un grado de dependencia a la desnaturalización intermedio entre el observado para rPrP^{Sc} y la SHaPrP(90-231) recombinante (Figura 18B). El material recombinante fue utilizado como control, ya que, al igual que la PrP^C, no muestra dependencia significativa a la desnaturalización frente al 3F4

(104;129). La prueba t-student reveló diferencias de inmureactividad (señal del mAb 3F4) estadísticamente significativas entre recSHaPrP(90-231) y sPrP^{Sc} ($p < 0.028$), recSHaPrP(90-231) y rPrP^{Sc} ($p < 0.000037$), y sPrP^{Sc} y rPrP^{Sc} ($p < 0.012$).

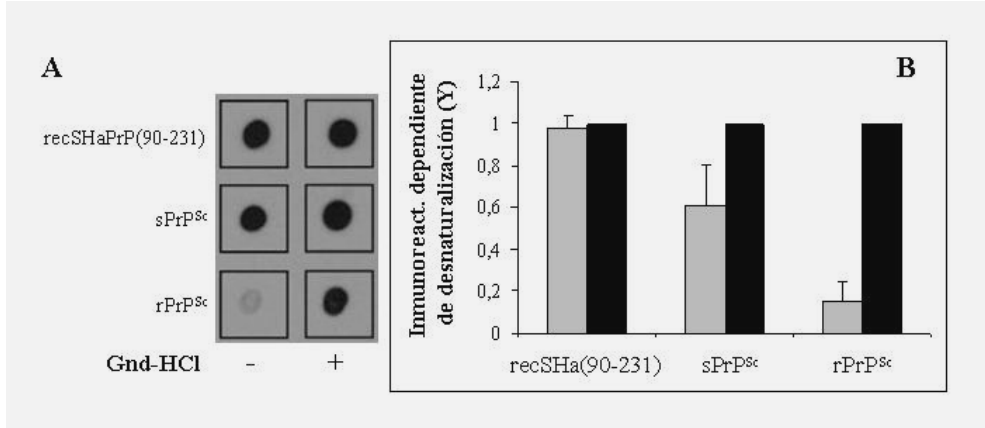


Figura 18: Inmureactividad dependiente de conformación para sPrP^{Sc}, rPrP^{Sc} y recSHaPrP(90-231). **A:** Dot blot representativo (mAb 3F4; ~0.1 µg de PrP por “spot”). **B:** Diagrama de barras cuantificando el grado de dependencia a la desnaturalización. El eje Y representa la proporción $I_{(N, XM)}/I_{(N, 4M)}$, siendo $I_{(N, XM)}$ la intensidad media de la señal obtenida mediante dot blot (mAb 3F4) para cada “especie” molecular (N) en ausencia ($X=0$, barras grises) o presencia ($X=4$, barras negras) de tratamiento con Gnd-HCl 4M. Así, $Y=1$ indicaría una completa independencia de conformación. Los datos expresan la media y la desviación estándar, y son representativos de cuatro experimentos independientes ($n = 4$), promediando 3-4 réplicas diferentes por ensayo y “especie” molecular.

Sedimentación en gradiente de sacarosa

La estima del tamaño de los agregados de PrP^{Sc} se realizó mediante un estudio basado en la velocidad de sedimentación en gradientes de sacarosa. En absoluta concordancia con los resultados obtenidos por Tzaban y col. (124), el fraccionamiento en gradiente de sacarosa (10-60%) de un homogenado de cerebro de hámster infectado con *scrapie*, rindió una serie continua de fracciones de PrP que se distribuyen en toda su extensión en función de su tamaño (Figura 19A). Igualmente, varias de estas fracciones se mostraron sensibles a la digestión con PK cuando aplicamos un tratamiento estándar (50

$\mu\text{g/ml}$; $37\text{ }^\circ\text{C}$; 1 h), por lo que de algún modo vulneran el criterio bioquímico de resistencia a PK postulado para PrP^{Sc} (Figura 19C). Adicionalmente, el presente estudio revela que buena parte de estas fracciones de PrP sensibles a PK son además sedimentables por encima de las 100.000g (Figura 19B), luego en este caso parece verificarse fielmente este otro criterio bioquímico basado en propiedades de sedimentación, tan frecuentemente utilizado para diferenciar entre PrP^{Sc} y PrP^{C} (124). Las fracciones 0_1 y 0_2 representan el volumen muestra cargado, esto es, aquel material soluble que ni siquiera penetra en el gradiente de sacarosa. Por simple extrapolación, adviértase que estas mismas fracciones no serían sedimentables bajo las condiciones indicadas; tanto si se corresponden con PrP^{C} , o con los oligómeros más pequeños de PrP^{Sc} , o incluso con una mezcla de ambas isoformas.

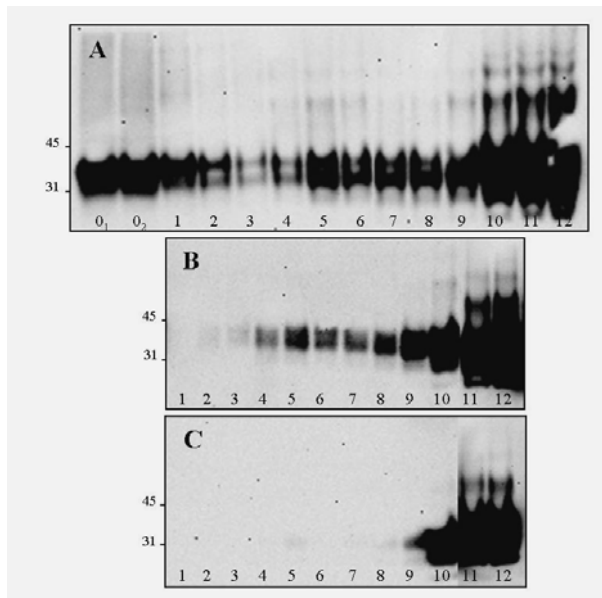


Figura 19: Sedimentación en gradiente de sacarosa. Western blots (mAb 3F4) mostrando el perfil de distribución de PrP en **A**: un homogenado al 10% de cerebro de hámster sirio afectado de *scrapie*, diluido a 1/2 en TNS, y fraccionado en gradiente de sacarosa (10-60%) a 200.620g (50.000 rpm ; 1h; $4\text{ }^\circ\text{C}$); **B**: Resedimentación a 141.957g (55.000 rpm ; $4\text{ }^\circ\text{C}$; 1 h) de las distintas fracciones obtenidas en **A**; **C**: Resistencia a PK ($50\text{ }\mu\text{g/ml}$; $37\text{ }^\circ\text{C}$; 1 hora) de las fracciones resedimentadas en **B**.

Tras este análisis preliminar, el estudio se centró en el fraccionamiento de sPrP^{Sc} y rPrP^{Sc} previamente purificadas, cuyo objetivo pasa por obtener un perfil de distribución que

permita caracterizar ambas fracciones en función del tamaño de sus agregados de PrP^{Sc}; estudiar la correlación entre la capacidad de resistencia a PK y el tamaño de los agregados de PrP^{Sc} de cada una de ellas; y obtener subfracciones de tamaño definido. Así, cuando sometemos a la fracción sPrP^{Sc} a sedimentación ($g_{av} = 200.620g$; 4°C; 1 h) en gradiente de sacarosa (10-60%), este material exhibe preferentemente una distribución que comprende las fracciones inmediatamente superiores del gradiente, particularmente las fracciones 0-7, con una respetable cantidad de material presente a nivel de las fracciones 0 (volumen de muestra cargado) y 1 (Figura 20A). Se aprecia una intensidad señal ligera o residual de PrP en fracciones inferiores (8-11); e incluso se recupera algo de material en la fracción 12 que contiene el *pellet*.

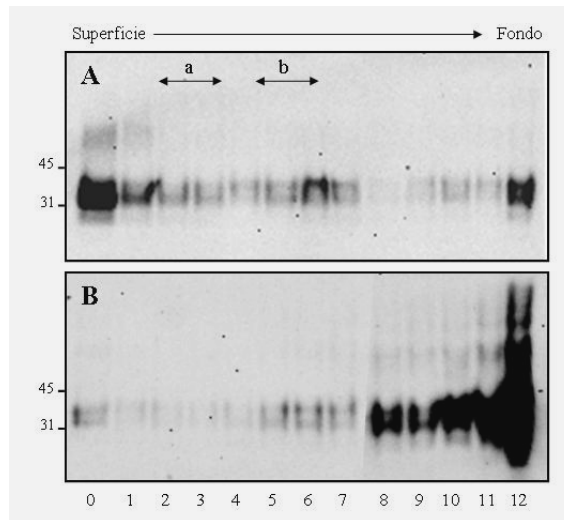


Figura 20: Distribución por tamaño de sPrP^{Sc} y rPrP^{Sc} en gradiente de sacarosa. Cantidades equivalentes de de sPrP^{Sc} (A) y rPrP^{Sc} (B) cargadas sobre un gradiente de sacarosa preformado (10-60%) se centrifugan a $g_{av} = 200.620g$ durante 1 hora a 4°C. Las diferentes fracciones (0-12) son recogidas de arriba abajo y analizadas mediante Western blot (mAb 3F4). En experimentos paralelos y bajo las mismas condiciones, la Apoferritina (443 kDa) y el Azul Dextrano (2.000 kDa) emergen en las posiciones indicadas como **a** y **b**, respectivamente.

La fracción de rPrP^{Sc} se sometió a este proceso de fraccionamiento en las mismas condiciones, observándose un patrón de distribución prácticamente complementario al descrito para sPrP^{Sc}. Aquí, apenas si aparece señal de PrP en las primeras fracciones (0-7),

por contra, la mayor parte del material se sitúa en las últimas fracciones (8-12), donde se incluye el *pellet* (Figura 20B). La concentración de detergente, 1% sarkosyl, utilizada en todas las muestras pretende prevenir la posible formación de micelas lipídicas (*lipid rafts*) que pudieran interferir en la movilidad de las proteínas a través del gradiente de sacarosa (166).

Paralelamente, este sistema de gradientes de sacarosa fue calibrado con la ayuda de dos marcadores de peso molecular, la Apoferritina (443 kDa) y el Azul Dextrano (2.000 kDa). Ambos marcadores sometidos independientemente a centrifugación en gradiente de sacarosa (10-60%) en las mismas condiciones, emergen en las fracciones ~1-2 y ~5, respectivamente (Figura 21A y 21B). Extrapolando estos resultados podríamos llegar a la conclusión de que, asignando un peso molecular aproximado de 35 kDa a cada subunidad de PrP, y asumiendo que los agregados están compuestos exclusivamente por PrP (132), la mayor parte de los agregados de sPrP^{Sc} estarían formados por menos de 12-15 subunidades de PrP; mientras que la mayoría de la rPrP^{Sc} contendría más de 60 subunidades de PrP.

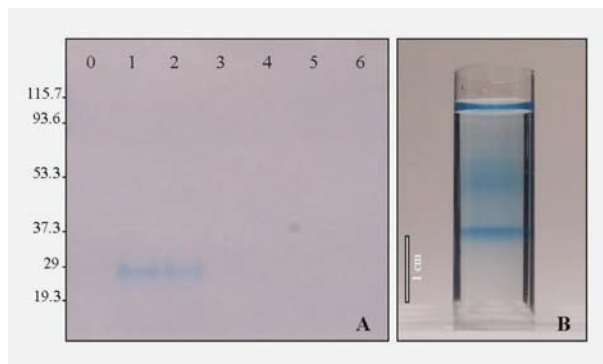


Figura 21: Calibración del sistema de gradientes de sacarosa. Los marcadores de peso molecular se sometieron independientemente a centrifugación en gradientes de sacarosa 10-60% (200.620g; 4°C; 1 h). **A:** La Apoferritina (443 kDa) resuelta mediante SDS-PAGE (gel 4-12%) teñido con Azul Coomassie emerge en las fracciones 1 y 2. Su migración en el gel desnaturalizante, próxima al marcador de ~29 kDa, puede atribuirse al peso molecular de cada una de las 24 subunidades que la conforman. **B:** Fotografía exhibiendo la migración del Azul Dextrano (2.000 kDa) a la altura de la fracción ~5 en el propio gradiente.

Una interpretación correcta de los resultados previos exige que la estabilidad del sistema de gradientes de sacarosa garantice un fraccionamiento real por tamaño de las distintas subfracciones obtenidas. Para reforzar la idea de estabilidad del sistema, e incluso de los propios agregados de PrP^{Sc}, se incluyó un experimento control donde, después de una segunda centrifugación en gradiente de sacarosa, la localización a lo largo del gradiente de una subfracción concreta de supuesto tamaño definido debería ser la misma que se obtuvo tras un primer fraccionamiento. Así, se seleccionaron las fracciones 3 y 4 obtenidas a partir de sPrP^{Sc} en un primer fraccionamiento por centrifugación en gradiente de sacarosa, según descripción previa, y se combinaron en una única fracción (Figura 22A).

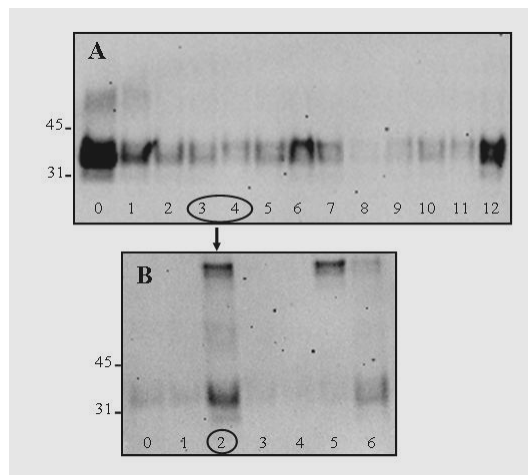


Figura 22: Estabilidad de las fracciones obtenidas mediante centrifugación en gradiente de sacarosa. Western blots usando el mAb 3F4 de **A**: fracciones de PrP obtenidas por centrifugación ($g_{av} = 200.620g$) de sPrP^{Sc} a través de un gradiente de sacarosa (10-60%); **B**: las fracciones 3 y 4, combinadas en una única muestra, se someten a un segundo proceso de fraccionamiento en gradiente de sacarosa. La mayor parte de la señal, a pesar del “smear”, se localiza en la fracción 2, que se corresponde con las fracciones 3 y 4 precursoras (ver detalles en el texto).

Esta nueva fracción (3 + 4), una vez dializada en PBS para eliminar la sacarosa, se llevó hasta 1,2 ml en TNS y se sometió nuevamente al mismo proceso de sedimentación en gradiente de sacarosa. Tras este segundo fraccionamiento, y por simplificación, se dobló el volumen de las fracciones recogidas (6 en lugar de 12), por lo que la fracción 2 se

corresponde exactamente con las fracciones 3 y 4. La PrP de cada fracción fue concentrada mediante precipitación en metanol antes de SDS-PAGE y posterior análisis por Western blot (mAb 3F4). Como se aprecia en la Figura 22B, y a pesar del “smear”, la muestra migra hasta situarse preferentemente a la misma altura a lo largo del gradiente que en el experimento previo de fraccionamiento, confirmando que la fracción seleccionada en el ensayo contiene oligómeros de un tamaño concreto.

Efecto del detergente

Si bien la sPrP^{Sc} es una fracción de la PrP^{Sc} total, se desconoce cuál es su proporción y si esta se mantiene constante, o como varía entre especies moleculares procedentes de distintas cepas; y en cualquier caso, como se ve afectada por la acción del detergente. Como quiera que la fracción sPrP^{Sc} se caracteriza por ser soluble bajo determinadas condiciones, de entre las diversas variables que podrían afectar a la propia “naturaleza” de la sPrP^{Sc}, se ha valorado el efecto del detergente sobre el porcentaje de fracción soluble recuperado de una determinada suspensión de PrP^{Sc} total (tPrP^{Sc}) purificada de cerebros de hámster sirio infectados con las cepas 263K o Drowsy. Manteniendo constantes, en la medida de lo posible, aquellos parámetros que pudieran afectar a la muestra durante el propio proceso de purificación (sonicación, etc) y/o conservación, ambos preparados fueron resuspendidos indistintamente en T8.5, bien en ausencia de detergente, bien con 1% de sarkosyl (aniónico) o 0,1% de β -octilglucosido (no aniónico). Todas las muestras se centrifugaron a g_{av} = 56.806g (40.000 rpm) a 20 °C durante una hora. Se recuperaron los sobrenadantes, se resuspendieron los *pellets* en la misma solución y volumen de partida, y se sometieron a SDS-PAGE (gel 16%) y posterior análisis mediante Western blot (mAb 3F4). Atendiendo a la intensidad de la señal observada en cada caso, los resultados sugieren que la presencia, concentración y tipo de detergente empleado afecta directamente al porcentaje de moléculas de PrP que se observan en los distintos sobrenadantes después de la centrifugación. Un aumento paralelo de la concentración y la eficacia del detergente empleado parece ocasionar una mayor disgregación de la PrP^{Sc} total hacia formas menos agregadas y solubles. En conformidad con los resultados previos, en las suspensiones preparadas en 1% de sarkosyl, aproximadamente el ~35-55% de la tPrP^{Sc} se encuentra en la fracción soluble. Por el

contrario, el material resuspendido en ausencia de detergente o en 0,1% de β -OG contienen escasa o nula cantidad de moléculas en el sobrenadante tras la centrifugación (Figura 23).

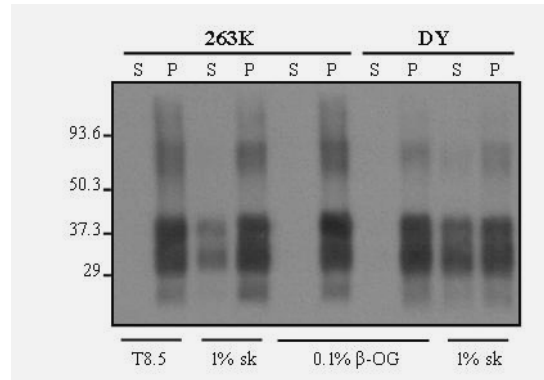


Figura 23: Efecto del detergente sobre la solubilidad de PrP^{Sc}. Western blot (mAb 3F4) mostrando el efecto del detergente sobre el porcentaje de PrP^{Sc} soluble tras la centrifugación a 56.806g (40.000 rpm, 20 °C; 2 h) de suspensiones de las cepas 263K y DY. Las muestras se resuspendieron previamente en T8.5 en ausencia o presencia de detergente: 1% de sarkosyl (sk) o 0,1% de β -OG. P: *pellet*; S: sobrenadante.

Actividad conversora in vitro (PMCA)

La capacidad de conversión es una de esas propiedades exclusivas de la isoforma PrP^{Sc} que le confieren un estatus diferente frente a otro tipo de agregados inertes. En este sentido, la técnica de PMCA nos brinda la oportunidad de comprobar si la fracción de PrP^{Sc} sensible a proteinasa K también posee capacidad para convertir PrP^C en PrP^{Sc} *in vitro* (122). Por este motivo, se extrajeron varias de las subfracciones obtenidas en los experimentos de centrifugación en gradientes de sacarosa, recientemente descritos, y se comprobó su capacidad de conversión sometiéndolas a amplificación cíclica mediante PMCA. Concretamente, se seleccionaron las fracciones 0 y 1+2, que se corresponden con las más ligeras de cuantas ofrece la sPrP^{Sc}; y la 11, la fracción más densa de la distribución de rPrP^{Sc} al excluir la 12 por contener el *pellet*. Cuando cantidades equivalentes de PrP (Figura 24F) de cada una de las tres fracciones se sometieron a PMCA, todas, incluyendo las sucesivas diluciones de cada una de ellas, se mostraron competentes en PMCA exhibiendo actividad conversora; al menos, así se desprende del análisis por Western blot (mAb 3F4)

de la señal específica para PrP^{Sc} resistente a PK generada *de novo* (Figura 24A, B y C). La enorme sensibilidad de esta técnica nos impide cuantificar la eficacia relativa de las diferentes fracciones testadas, por lo que la interpretación de estos resultados se ha realizado desde un punto de vista cualitativo. No obstante, parece evidente que el material obtenido de la fracción 0 también mantiene una gran actividad conversora (Figura 24A).

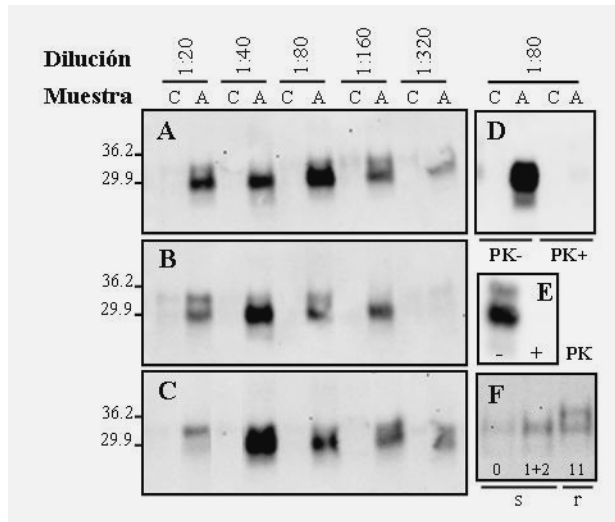


Figura 24: Capacidad conversora de sPrP^{Sc} *in vitro* mediante PMCA. Western blots (mAb 3F4) mostrando: cantidades equivalentes de PrP^{Sc} de diferentes fracciones (A: sPrP^{Sc}, fracción 0; B: sPrP^{Sc}, fracciones 1 y 2 combinadas; C: rPrP^{Sc}, fracción 11) obtenidas de experimentos de sedimentación en gradiente de sacarosa fueron diluidas en NBH y separadas en dos alícuotas, una fue congelada (C), y la otra sujeta a amplificación (A) mediante PMCA. Después del tratamiento con PK (50 µg/mL; 37 °C; 1 h), las muestras fueron analizadas mediante Western blot; D: sujeta al mismo proceso, la sPrP^{Sc} amplifica normalmente si no se incluye un tratamiento con PK (50 µg/mL, 37 °C, 1 h) previo al ensayo de PMCA; E: presencia o ausencia de sPrP^{Sc} en las muestras sometidas posteriormente a amplificación en D; F: estimación previa de la cantidad relativa de PrP en las muestras sometidas a PMCA en A, B y C (s: sPrP^{Sc}; r: rPrP^{Sc}).

Dada la ultrasensibilidad de la técnica de PMCA, se realizó un experimento control para corroborar que es precisamente la sPrP^{Sc} la especie molecular responsable, en su caso, de la actividad conversora observada. Por definición, dicha capacidad debe desaparecer al tratar esta fracción con PK. En dicho experimento se compara la capacidad

conversora de dos alícuotas de sPrP^{Sc}, una sin tratar, y otra previamente tratada con PK bajo condiciones estándar (50 g/ml; 37 °C; 1 h). En el WB (mAb 3F4) se observa que en la muestra previamente digerida con PK se induce la destrucción total de la sPrP^{Sc}, aboliendo consecuentemente su capacidad de conversión (Figura 24D).

Infectividad *in vivo*

Inequívocamente, la capacidad esencial que define y caracteriza a un prion es su carácter infeccioso. Esta circunstancia indujo el desarrollo de ensayos de infectividad *in vivo* usando la fracción de PrP^{Sc} “soluble” y sensible a PK. El estudio trata de verificar la capacidad infecciosa de este material a la par que se compara su eficacia relativa con la fracción “insoluble” y resistente a PK. Para ello, se inocularon hámsteres sirios con cantidades equivalentes de ambas fracciones a través de las vías intracerebral dorsal (ic-d), intracerebral lateral (ic-l), e intraperitoneal (ip); se midió el tiempo de supervivencia (TS) en días post-infección (dpi) para cada ejemplar; y se calculó el TS promedio para cada grupo.

La presencia de PrP^{Sc} resistente a PK (50 µg/ml; 37 °C; 1 h) en los cerebros de estos ejemplares se corroboró mediante WB con el mAb 3F4 (Figura 25A).

La fracción sPrP^{Sc} se mostró competente para infectar a hámsteres sirios a través de las tres vías de inoculación practicadas, con TS promedio incluso por debajo de los 90 dpi tras una inoculación por vía ic-d. Con una TS promedio oscilando entre los $88,5 \pm 3$ dpi (ic-d) y los $115,6 \pm 9,9$ dpi (ip), la sPrP^{Sc} exhibió en general mayor eficacia que la rPrP^{Sc} ($95,3 \pm 8$ y $123,2 \pm 13$ dpi, respectivamente) a la hora de inducir la muerte de los animales, con independencia de la vía de inoculación practicada. Además, la dispersión de los datos “intra-grupo” es menor en el caso de los hámsteres inoculados con sPrP^{Sc}, como refleja el correspondiente valor de desviación estándar (Figura 25B). El análisis de los resultados demuestra que la sPrP^{Sc} resulta cuando menos tan infecciosa como la rPrP^{Sc}. Empíricamente se advierte que la reproducibilidad de los resultados disminuye cuando el inóculo se suministra por vía ic-l ($92,8 \pm 6,2$ dpi para sPrP^{Sc} y 107 ± 10 dpi para rPrP^{Sc}), pese a lo cual, la diferencia entre ambas fracciones puede tasarse en torno a una semana, aproximadamente. Según el método propuesto por Prusiner *et al.* (1978), basado en un

análisis de regresión a partir del PI, esta diferencia equivaldría a un $\sim\log_{10}$ de concentración. Esto supondría que la fracción sPrP^{Sc} pudiese resultar hasta 10 veces más infecciosa que la rPrP^{Sc}.

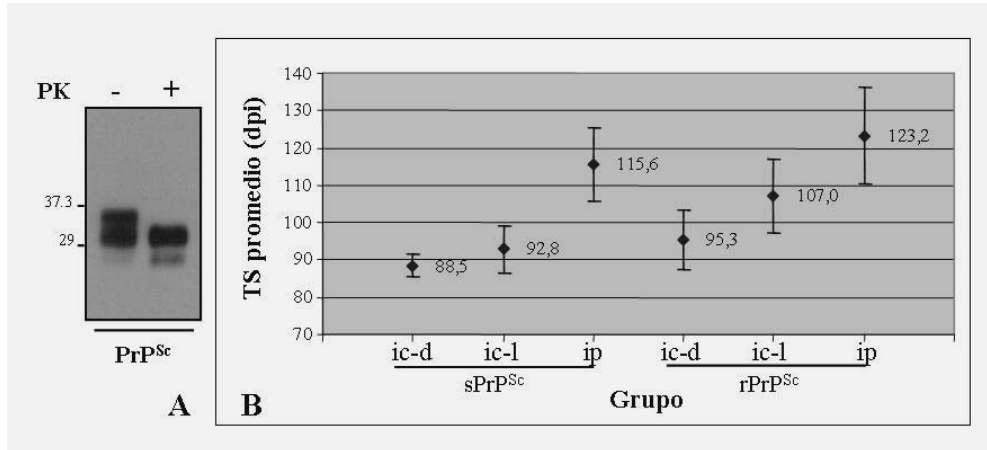


Figura 25: Estudios de infectividad. A: Western blot (mAb 3F4) representativo de la presencia de PrP^{Sc} resistente a PK (50 µg/ml; 37 °C; 1 h) en cerebros de hámster sirio inoculados con la fracción de sPrP^{Sc}. B: TS promedio (dpi) para cada grupo de hámsteres (n=6) inoculados con sPrP^{Sc} y rPrP^{Sc} por las vías: intracerebral dorsal (ic-d); intracerebral lateral (ic-l); o intraperitoneal (ip).

El grado de significación estadística para las diferencias en la TS en dpi encontradas entre los distintos grupos de animales inoculados se estimó mediante el estadístico t-student, resultando:

➤ según la fracción inoculada: sPrP^{Sc} y rPrP^{Sc} por vía ic-l ($p < 0,016$); sPrP^{Sc} y rPrP^{Sc} por vía ic-d ($p < 0,047$); sPrP^{Sc} y rPrP^{Sc} por vía ip ($p < 0,16$).

➤ según la ruta de inoculación: rPrP^{Sc} vía ic-l o ic-d ($p < 0,035$); rPrP^{Sc} vía ic-d o ip ($p < 0,00096$); rPrP^{Sc} vía ic-l o ip ($p < 0,023$); sPrP^{Sc} vía ic-l o ic-d ($p < 0,085$); sPrP^{Sc} vía ic-d o ip ($p < 0,0013$); sPrP^{Sc} vía ic-l o ip ($p < 0,0018$).

Durante la redacción de esta tesis se ha incorporado un experimento control donde una muestra de sPrP^{Sc} se trató previamente con PK (50 µg/ml; 37 °C; 1 h), se detuvo la

reacción con 1 mM Pefabloc (Fluka, St. Louis, MO), y se diluyó hasta alcanzar una concentración de ~ 2 ng/ μ l de PrP. Finalmente, cada ejemplar de un grupo de 7 hámsteres fue inoculado con 25 μ l de esta muestra (~ 50 ng de PrP) por la vía ic-d. Actualmente estos animales no presentan signos de la enfermedad.

Estudios estructurales

Proteólisis parcial de sPrP^{Sc} con tripsina

La susceptibilidad a la digestión con tripsina manifestada abre la posibilidad de someter a la fracción de sPrP^{Sc} a una proteólisis limitada (Figura 26). A priori, esta particularidad distintiva frente a la rPrP^{Sc}, nos capacita para poder explorar, con mayor cobertura, el grado de exposición y flexibilidad de buena parte de las regiones que albergan las lisinas y argininas presentes en la secuencia de la proteína. De este modo, en función de la mayor o menor accesibilidad del enzima, y por consiguiente, de la susceptibilidad que estos residuos muestran a ser cortados, la proteólisis parcial nos proporciona un modo indirecto para obtener información útil acerca de la estructura tridimensional de la molécula. No en vano, la tripsina es un enzima proteolítico menos agresivo y con mayor especificidad de corte que la PK; esto permite simplificar el análisis espectrométrico posterior restringiendo el número de posibles fragmentos de digestión y facilitando su identificación.

En esta aproximación, la fracción de sPrP^{Sc} se sometió a la acción proteolítica de la tripsina durante 1 hora a 37 °C usando proporciones E:S en un rango de 1:2 a 1:2.000, previa determinación por Western blot (mAb 3F4). Cantidades equivalentes de la proteína recSHaPrP(90-231) y de la fracción de rPrP^{Sc} se usaron como control. El análisis de los resultados de las distintas mezclas de reacción se llevó a cabo con un nanosprayLC-MS/MS (Figuras 27 y 28), y Western blot (Figura 26). Nuevamente, en el caso de la sPrP^{Sc}, la inmunodetección (mAb 3F4) muestra una disminución gradual de la intensidad de la banda correspondiente a la proteína, ratificando su degradación progresiva según se incrementa la proporción E:S (Figura 26B). En términos relativos, la escasa resistencia a tripsina de esta fracción contrasta con la observada para la rPrP^{Sc}, ya que cuando una cantidad equivalente

de esta última se somete igualmente a digestión, permanece prácticamente inalterada incluso manteniendo elevadas proporciones de tripsina (Figura 26C).

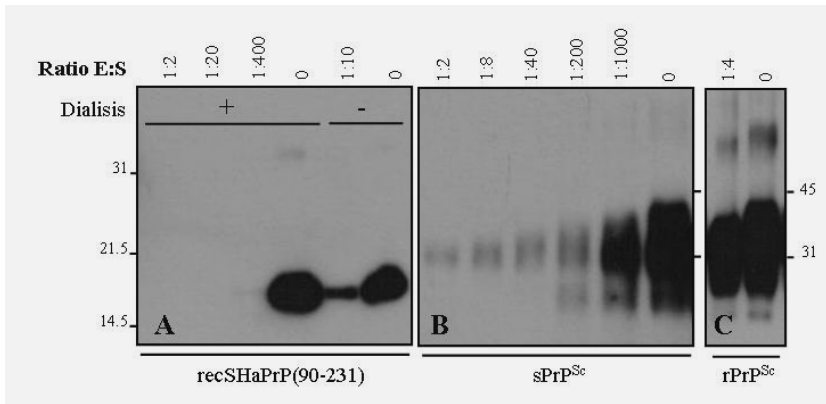


Figura 26: Digestión parcial con tripsina de sPrP^{Sc}, rPrP^{Sc} y recSHaPrP(90-231). Western blots (mAb 3F4) mostrando el resultado de la reacción de digestión con concentraciones crecientes de tripsina (37 °C; 1 hora). **A:** A diferencia de la sPrP^{Sc}, la proteína recombinante SHaPrP(90-231), previamente renaturalizada y dializada, no ofrece resistencia a tripsina a proporciones E:S de ~1:400. **B:** Digestión parcial de la sPrP^{Sc}. **C:** Resistencia de la rPrP^{Sc} a concentraciones relativamente altas de tripsina.

Por su parte, 1-2 μ g de la proteína recombinante SHaPrP(90-231) de ~16 kDa, conservada en guanidina 6 M a -70 °C, se renaturalizó mediante una dilución 1/10 en PBS (pH ~7.5); se dializó para eliminar la guanidina; y se sometió a proteólisis parcial bajo las mismas condiciones. En este caso, los resultados reflejan una resistencia a la degradación con tripsina visiblemente inferior a la observada para la fracción de sPrP^{Sc}, toda vez que la señal captada con el mAb 3F4 desaparece completamente sin apenas superar proporciones de E:S de 1:400. No obstante, nótese que si se suprime el proceso de diálisis previo, y por tanto, manteniendo una concentración de 0.6 M de Gnd-HCl, se inhibe parcialmente la reacción de digestión y la recSHaPrP(90-231) resiste concentraciones de tripsina considerablemente superiores (Figura 26A).

En armonía con los resultados obtenidos con la técnica de Western blot (Figura 26), en el análisis espectrométrico con nanosprayLC-MS/MS de las muestras de sPrP^{Sc}

digeridas parcialmente con tripsina se observa una evidente reducción del número y proporción de fragmentos detectados cuando decrece la proporción E:S. Y viceversa, al incrementar la proporción E:S se detecta un aumento considerable en el número de fragmentos detectados y un incremento en la intensidad de los mismos (Figura 27).

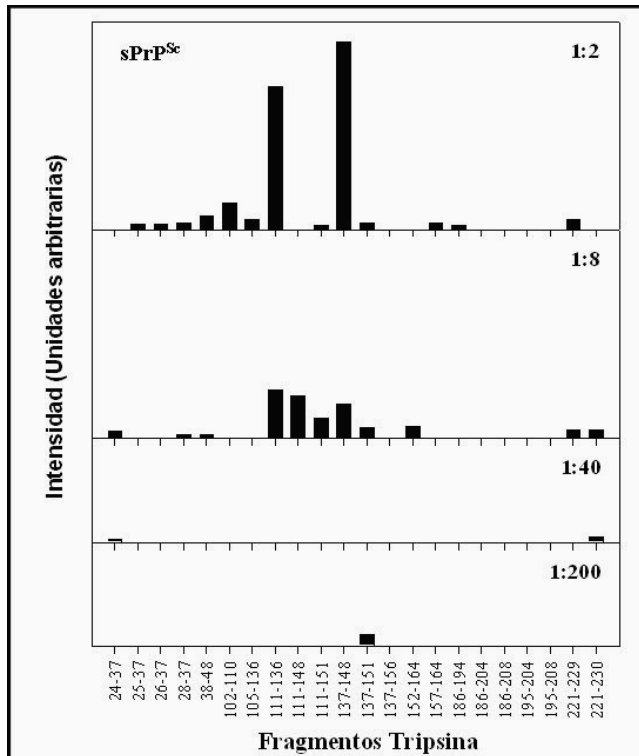


Figura 27: Fragmentos tripticos obtenidos por proteólisis parcial de sPrP^{Sc}. Las muestras fueron tratadas con diferente proporción E:S de tripsina a 37 °C durante 1 hora. Los fragmentos tripticos se identificaron por LC-MS como se describe en el texto. Las barras representan el área relativa de los picos en cromatogramas de “total ion current” (TIC), respetando la escala entre los distintos paneles. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. Se ha indicado la proporción E:S en el ángulo superior derecho de cada panel.

Es importante resaltar que cuando realizamos un análisis mediante espectrometría de masas, la detección de un fragmento determinado no depende exclusivamente de la abundancia con la que se genera el corte a nivel de los residuos que lo delimitan, sino también de la “detectabilidad” intrínseca del péptido formado. Así, por ejemplo, péptidos

de bajo peso molecular (< 800 Da) no activarían la ionización en experimentos de MS-MS; otros podrían sufrir pérdidas sustanciales durante el procesamiento de la muestra; etc. En el caso de la PrP^{Sc}, la glicosilación, el GPI y la presencia de un puente disulfuro intracatenario restringen particularmente la capacidad para detectar e identificar determinados péptidos bajo estas condiciones experimentales. No obstante, y sin obviar estas premisas, resulta prácticamente inmediata la detección, incluso a concentraciones relativamente bajas del enzima, de los fragmentos 137-151, 25-37 y 221-230 (Figura 27). En adelante, a medida que se incrementa la concentración de tripsina aumenta considerablemente el número de fragmentos detectados, entre los que se incluyen el 111-136, 137-148, 152-164 y 157-164. A concentraciones aún superiores de tripsina, algunos fragmentos sufren un cambio relativamente brusco de intensidad, lo que sugiere una fragmentación interna de ciertos residuos que previamente se hallaban intactos. En este sentido, los péptidos 111-136 y 137-148, que no contienen internamente ningún residuo K o R, experimentan un incremento continuo y paulatino en intensidad según aumenta la proporción de tripsina. Sin embargo, los fragmentos 111-148, 111-151 y 152-164 exhiben un comportamiento bimodal, con intensidades relativas máximas a concentraciones intermedias de tripsina.

Un análisis similar de la rPrP^{Sc} reflejó un patrón general de corte muy similar al obtenido para la sPrP^{Sc}, aunque con mucho menor rendimiento de fragmentos peptídicos (Figura 28). Por el contrario, tomando como control la SHaPrP(90-231) recombinante somos capaces de identificar todos estos puntos de corte incluso a las más bajas proporciones tripsina:sustrato testadas (1:400). Esta sensibilidad diferencial a tripsina sugiere profundas diferencias conformacionales entre ambas especies moleculares.

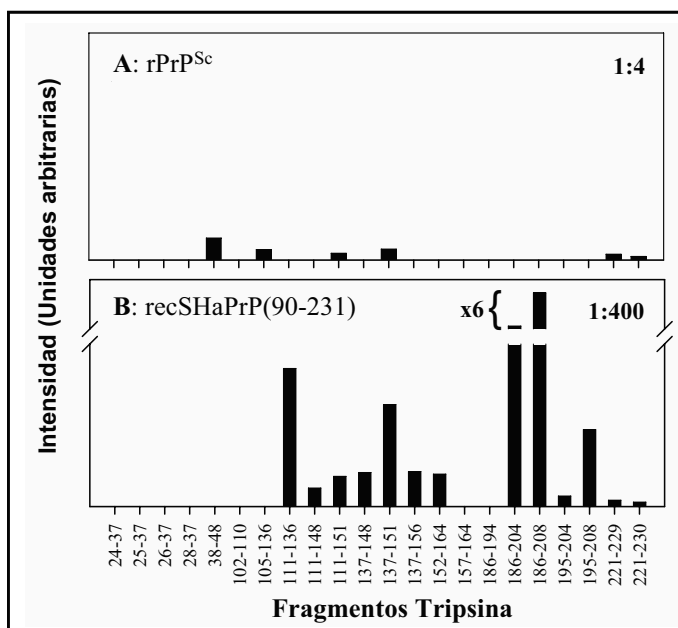


Figura 28: Fragmentos trípticos de rPrP^{Sc} y SHaPrP(90-231) recombinante. Las muestras fueron tratadas con diferente proporción E:S de tripsina a 37 °C durante 1 hora. Los fragmentos trípticos se identificaron por LC-MS como se describe en el texto. **A:** rPrP^{Sc}; **B:** SHaPrP(90-231) recombinante. Las barras representan el área relativa de los picos en cromatogramas de “total ion current” (TIC). La correspondencia de escala entre ambos paneles y la proporción E:S ha sido indicada convenientemente.

Las figuras 29, 30 y 31, y la tabla 1 muestran ejemplos de los datos obtenidos en el análisis espectrométrico.

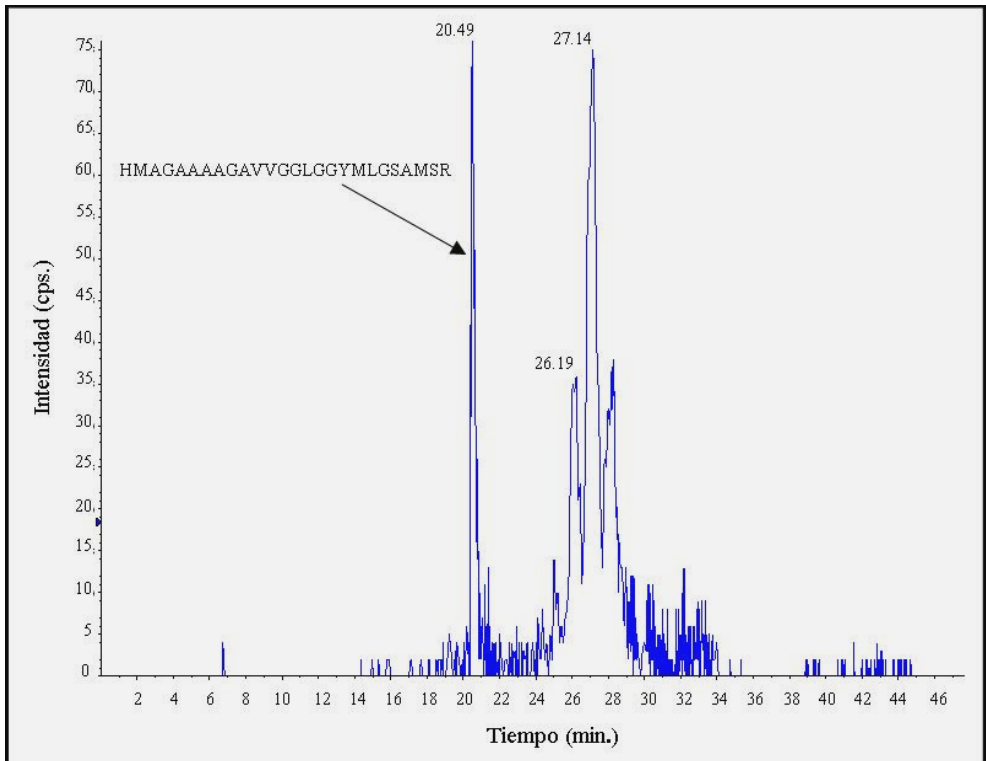


Figura 29: *eXtracted Ion Chromatogram* (XIC). Cromatograma representativo del péptido $[111-136]^{3+}$ en una muestra de sPrP^{Sc} sujeta a digestión parcial con tripsina (proporción E:S=1:8). El trazo se corresponde con una señal de TOF de m/z 788.328 a 788.442. Masa monoisotópica teórica del péptido $[111-136]^{3+} = 788.3854$.

La siguiente figura refleja el resultado de la fragmentación MS-MS del péptido tríptico [111-136].

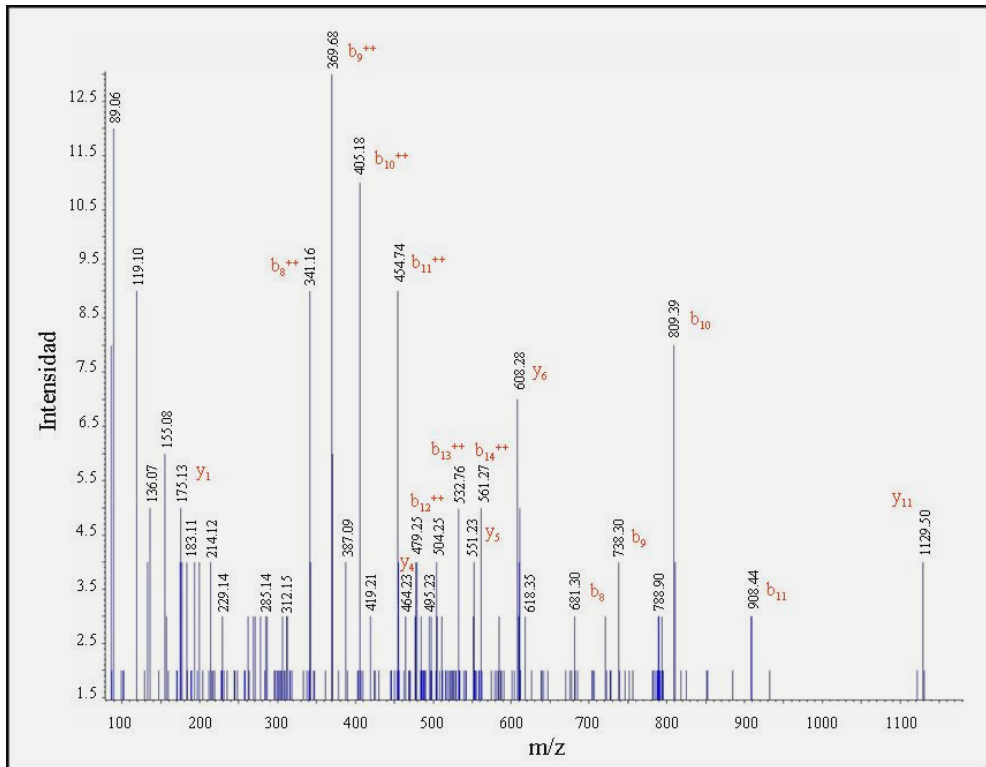


Figura 30: Espectro de fragmentación MS-MS. Este espectro representativo se corresponde con la fragmentación de un ión de m/z 788.4, obtenido tras digestión parcial con tripsina de una muestra de sPrP^{Sc}, y confirma que su identidad se corresponde con el péptido tríptico [111-136],

HMAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSR.

A continuación se muestra el resultado de la búsqueda posterior en la base de datos de proteínas “Mascot” para este péptido (Tabla 1).

#	a	a++	b	b++	Seq.	y	Y++	y*	y*++	#
1	110.07	55.54	138.07	69.54	H					26
2	241.11	121.06	269.11	135.06	M	2226.08	1113.54	2209.06	1105.03	25
3	312.15	156.58	340.14	170.58	A	2095.04	1048.02	2078.02	1039.51	24
4	369.17	185.09	397.17	199.09	G	2024.01	1012.51	2006.98	1003.99	23
5	440.21	220.61	468.20	234.60	A	1966.98	984.00	1949.96	975.48	22
6	511.24	256.13	539.24	270.12	A	1895.95	948.48	1878.92	939.96	21
7	582.28	291.64	610.28	305.64	A	1824.91	912.96	1807.88	904.45	20
8	653.32	327.16	681.31	341.16	A	1753.87	877.44	1736.85	868.93	19
9	710.34	355.67	738.34	369.67	G	1682.84	841.92	1665.81	833.41	18
10	781.38	391.19	809.37	405.19	A	1625.81	813.41	1608.79	804.90	17
11	880.45	440.73	908.44	454.72	V	1554.78	777.89	1537.75	769.38	16
12	979.51	490.26	1007.51	504.26	V	1455.71	728.36	1438.68	719.84	15
13	1036.54	518.77	1064.53	532.77	G	1356.64	678.82	1339.61	670.31	14
14	1093.56	547.28	1121.55	561.28	G	1299.62	650.31	1282.59	641.80	13
15	1206.64	603.82	1234.64	617.82	L	1242.60	621.80	1225.57	613.29	12
16	1263.66	632.33	1291.66	646.33	G	1129.51	565.26	1112.49	556.75	11
17	1320.68	660.85	1348.68	674.84	G	1072.49	536.75	1055.46	528.24	10
18	1483.75	742.38	1511.74	756.37	Y	1015.47	508.24	998.44	499.73	9
19	1614.79	807.90	1642.78	821.90	M	852.41	426.71	835.38	418.19	8
20	1727.87	864.44	1755.87	878.44	L	721.37	361.19	704.34	352.67	7
21	1784.89	892.95	1812.89	906.95	G	608.28	304.64	591.26	296.13	6
22	1871.93	936.47	1899.92	950.46	S	551.26	276.13	534.23	267.62	5
23	1942.96	971.98	1970.96	985.98	A	464.23	232.62	447.20	224.10	4
24	2074.00	1037.51	2102.00	1051.50	M	393.19	197.10	376.16	188.59	3
25	2161.04	1081.02	2189.03	1095.02	S	262.15	131.58	245.12	123.07	2
26					R	175.12	88.06	158.09	79.55	1

Tabla 1: Asignación de Mascot para el espectro de MS-MS mostrado. Cálculo de la masa monoisotópica neutra del péptido: 2362.13; modificaciones fijas: carbamidometil (C); “score” de los iones: 56; “Expect”: 0.00098; aciertos (rojo): 30/200 iones fragmentados usando los 71 picos más intensos.

La calidad general del ajuste se evaluó a través del error medio cuadrático (RMS), con un margen de error de 32 ppm (Figura 31).

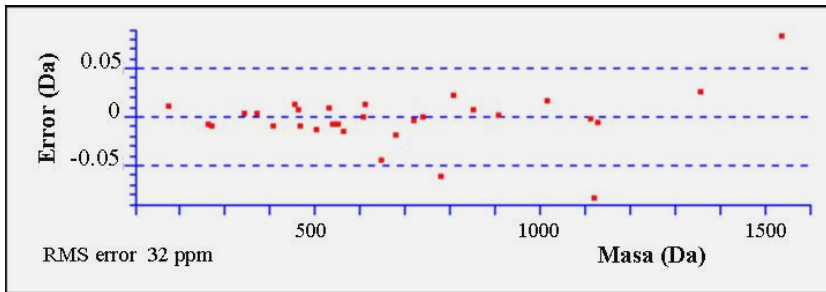


Figura 31: Error medio cuadrático (RMS error). El RMS se calcula como la raíz cuadrada de las desviaciones entre los valores observados y los estimados por la regresión para cada punto (raíz de los residuales al cuadrado para ese punto). Este valor representa la distancia entre sus coordenadas reales y las estimadas por la regresión de mínimos cuadrados. La calidad de la regresión geométrica puede valorarse comparando, para cada punto de control, las coordenadas estimadas por la regresión con las reales. El promedio de los residuales es el error medio cuadrático. El margen de error fue de 32 ppm.

La PrP^{Sc} total purificada de hámsters infectados con la cepa Drowsy muestra una resistencia a la degradación proteolítica característicamente inferior a la observada para la cepa 263K (102;103). Este comportamiento recuerda en cierta medida al observado para la fracción sensible a proteinasa K de la cepa 263K objeto de estudio, e incita a especular con la posibilidad de que tras esta conducta análoga exista una cierta similitud en el grado de polimerización entre ambas especies moleculares, esto es, a nivel de estructura cuaternaria. Por ello, se estudió igualmente el comportamiento de la tPrP^{Sc} de DY cuando se somete a un tratamiento con tripsina (37 °C; 1 h) incrementado gradualmente la proporción de enzima. El resultado de la digestión se analizó mediante Western blot (mAb 3F4). Sin embargo, la respuesta a este tratamiento diverge aparentemente de la observada para la fracción sPrP^{Sc} de 263K, exhibiendo resistencia a tripsina a concentraciones que degradarían por completo la fracción sensible (Figura 32). A pesar de que se hace ostensible cierta degradación parcial a concentraciones relativamente elevadas de tripsina, un incremento indefinido de la proporción E:S no induce la destrucción total de la PrP^{Sc} de DY, antes bien, superado cierto umbral de concentración del enzima se observa un curioso efecto “inhibidor”, probablemente asociado a una autólisis, a juzgar por el despunte en la

intensidad de la señal específica de PrP asociada al anticuerpo monoclonal 3F4 (Figura 32). Posiblemente, el comportamiento de la tPrP^{Sc} de DY, que podría considerarse intermedio entre la fracción sensible y la resistente de 263K, se deba a un doble efecto provocado por la contribución diferencial a la resistencia final que aportan las distintas subpoblaciones de polímeros que conforman la tPrP^{Sc}, al que habría que sumar el derivado de las propias diferencias de conformación que pudieran existir entre las especies moleculares de ambas cepas.

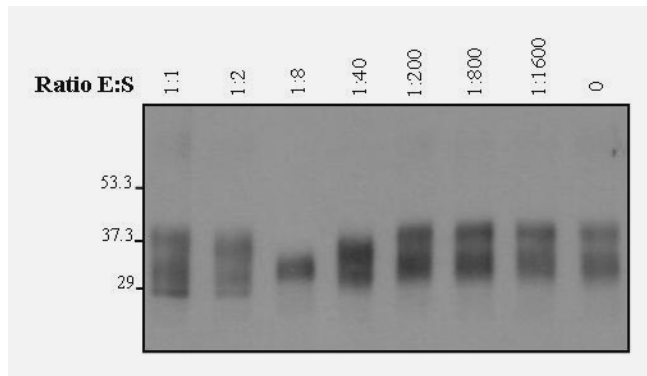


Figura 32: Digestión triptica de la tPrP^{Sc} de DY. Western blot (3F4) mostrando el resultado de la digestión de PrP^{Sc} total extraída de la cepa DY con diferentes proporciones de tripsina (37 °C; 1 h).

El análisis mediante proteólisis parcial de sPrP^{Sc} (cepa 263K) no sólo ha contribuido a la propia caracterización de esta fracción, además, los datos obtenidos han aportado una valiosa información estructural sobre la PrP^{Sc} en forma de puntos de corte. No obstante, este estudio se ha complementado y contrastado aplicando técnicas de proteólisis parcial y espectrometría de masas a la propia PrP^{Sc} total purificada.

Proteólisis parcial de PrP^{Sc} con PK

Anteriormente se ha mencionado que la proteólisis parcial permite cortar con relativa facilidad en aquellos residuos localizados en las zonas más expuestas y flexibles de la estructura proteica, como lazos y hélices- α . Por el contrario, aquellos que forman parte de una estructura secundaria en hoja- β resultan muy resistentes a la proteólisis. Estudios previos realizados sobre la PrP^{Sc} de la cepa Drowsy lograron establecer un mapa

proteolítico de los puntos de corte para PK como el descrito por Bessen y Marsh (102). Al menos, se consiguieron identificar tres posiciones del extremo amino-terminal, Gly-92, Gln-98 y Lys-101, detectándose un claro predominio del punto de corte en la posición 92. En la cepa 263K, el tratamiento con PK determinó los puntos de corte en las posiciones Gly-82, Gly-86 y Gly-90 como los más abundantes del extremo amino-terminal (168).

En este caso, la actividad catalítica de la PK y la subsiguiente reacción de corte con NTCB generó una mezcla de fragmentos truncados amino-terminalmente que habrían de ser analizados por medio de un MALDI-TOF para llevar a cabo la identificación de los puntos de corte para PK en la PrP^{Sc} de las cepas 263K y DY. La elevada sensibilidad de esta técnica permite detectar numerosos puntos de corte N-terminales. Para ambas cepas, se utilizaron tres concentraciones diferentes de PK: 1 µg/ml, 5 µg/ml, y 10 µg/ml de PK que se corresponden con proporciones PK/PrP de ~1/800, ~1/160, y ~1/80, respectivamente.

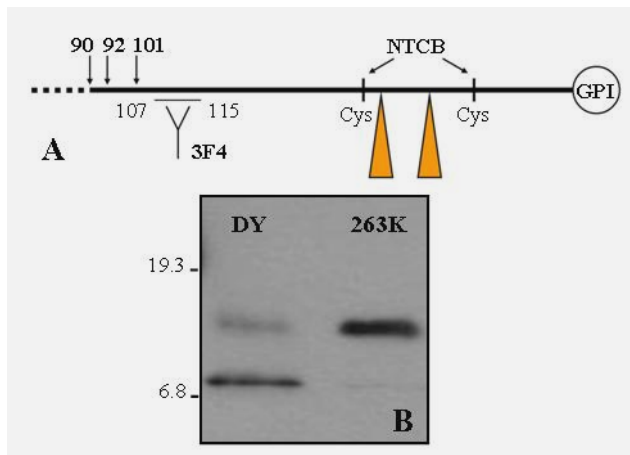


Figura 33: Reacción de corte con NTCB. **A:** Diagrama esquemático de la molécula de PrP^{Sc} mostrando la posición de los puntos de corte para el NTCB (cys-179 y 214); lugares de glicosilación (181-NIT-183; 197-NFT-199); GPI (Ser-231); epítopo del mAb 3F4 (~107-115); y principales puntos de corte para la PK (90, 92, 101). **B:** Fragmentos N-terminales truncados obtenidos tras digestión de ~5 µg de PrP^{Sc}, de las cepas 263K y DY, con 5 µg/ml de PK y posterior tratamiento con NTCB. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE (gel 15%), y la PrP fue detectada mediante WB con el mAb 3F4 (cortesía de Gustavo Sajnani).

El corte de la molécula de PrP^{Sc} con NTCB en la posición 178 permite la identificación inequívoca de cada fragmento como un único péptido cuya secuencia abarca desde la posición “x” a la 178, siendo “x” el residuo del extremo amino-terminal (ver esquema de la molécula de PrP^{Sc}, Figura 33A). De este modo, el posterior análisis espectrométrico de las muestras permite asignar un péptido concreto a un determinado pico candidato del espectro de masas obtenido en función de su peso molecular. En adelante, para una mayor claridad y simplificación del texto, solo se indicará la posición “x” correspondiente al punto de corte con PK de cada fragmento formado.

Nuestros resultados revelan una gran similitud en la colección de péptidos obtenidos para ambas cepas. En el caso de la cepa 263K, los puntos de corte más abundantes detectados a nivel del extremo N-terminal se corresponden con las posiciones 58, 70, 74, 78, 82, 86, 90 y 92, a los que debemos añadir aquellos otros situados en posiciones más internas de la molécula como los 117, 119, 139 y 142 (Figura 34). Para Drowsy obtuvimos principalmente la misma compilación, a excepción del punto de corte en la posición 101, solo detectado en esta cepa (Figura 35). Estos resultados sugieren que las dos cepas albergan prácticamente los mismos puntos de corte para la PK, siendo la intensidad de ciertos picos la primordial diferencia entre ambas. El análisis mediante Western blot de los fragmentos generados por el tratamiento con PK y NTCB de ambas cepas, revela la abundancia de cortes generados alrededor de la posición 90. Sin embargo, en DY existe un predominio de puntos de corte entorno a la posición 101 (Figura 33B). La susceptibilidad diferencial observada en estas regiones afecta a la proporción de los principales puntos de corte y permite distinguir entre ambas cepas de hámster.

A pesar de que el análisis mediante técnica de MALDI proporciona datos de tipo cualitativo, o a lo sumo semi-cuantitativo, y considerando que la concentración de PrP^{Sc} usada fue similar para ambas cepas, se puede apreciar una diferencia significativa entre 263K y DY cuando se comparan las intensidades de muchos de los picos N-terminales (del 58 al 101) con respecto a los más “internos” (desde 117 a 142). Nuevamente en ambas cepas, y con este mismo método basado en la reacción PK + NTCB, se lograron detectar otros picos que también conciernen a puntos de corte más “internos” en las posiciones 131, 133, 134 y 154 (Figuras 34 y 35). Tanto los puntos de corte que afectan al extremo amino-terminal, como aquellos otros más “internos” vieron incrementada su abundancia con el

aumento en la concentración de PK. Al contrario que en 263K, en la cepa Drowsy resulta muy evidente el incremento en la intensidad de los picos más “internos”, mientras que se mantiene para los puntos de corte de la zona amino-terminal. La gran susceptibilidad de DY a la acción de la PK podría explicar estos resultados. La tendencia de los puntos de corte “internos” a aumentar en paralelo a la concentración de PK es especialmente llamativa para las posiciones 117 y 119. Esto también es aplicable para los residuos 135 y 139 cuando aumentamos la concentración de PK a 50 $\mu\text{g/ml}$, que se corresponde con una proporción PK/PrP de 1/16 (datos no mostrados). Los datos muestran claramente una zona N-terminal más flexible y expuesta a la acción de la PK que la región de la proteína que se extiende entre los residuos 117-142. No obstante, la presencia de los picos que se corresponden con las posiciones 117, 119 y 139, incluso con las menores proporciones PK/PrP, nos indica que además de la cola amino terminal flexible, existen al menos otras dos áreas susceptibles a PK que no habían sido descritas hasta ahora, las que abarcan los residuos 117-119, 131-142 y la región próxima a 151.

Habitualmente, para cada punto de corte de PK identificado encontramos dos productos de reacción, uno que se corresponde al corte con NTCB, y otro que se genera como consecuencia de la condensación de la guanidina con un grupo carboxilo del péptido en este mismo corte, derivándose un péptido modificado (aducto) con un peso molecular que supera en 41 daltons al de la especie no alterada. Este mismo hecho había sido descrito previamente por Tang *y col.* (169). Resulta interesante que el aumento de la concentración de PK no generó nuevos puntos de corte, incluso después de un tratamiento con 50 $\mu\text{g/ml}$ de PK. Para la presencia de estas áreas protegidas de la PK entre otras zonas susceptibles podría encontrarse una explicación basada en diferencias a nivel de la estructura terciaria o cuaternaria, e incluso mediante un compendio de ambas.

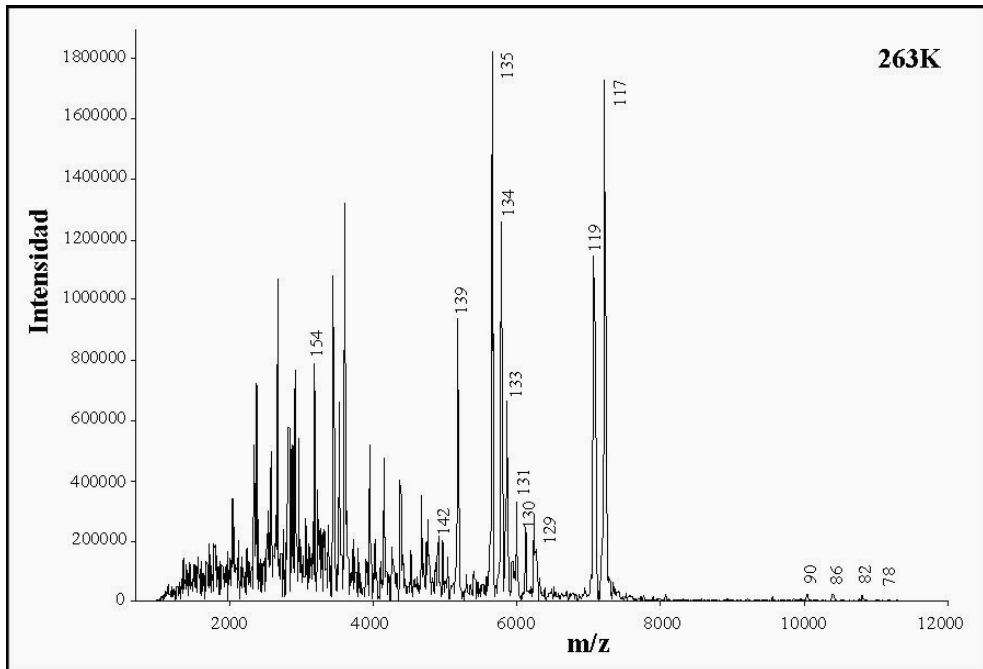


Figura 34: Análisis por MALDI-TOF de PrP^{Sc} de 263K digerida con PK. Espectro mostrando los fragmentos de digestión de la PrP^{Sc} (0.1% β -OG) de 263K formados tras el tratamiento con 5 μ g/ml de PK (37 °C; 1 h), y la subsiguiente reacción de corte con NTCB. Los péptidos se eluyeron con *Clin-Prot*[®] (Bruker Daltonics); se usó una matriz de ácido sinapínico; y se analizó en modo lineal. La identificación de los picos se realizó con ayuda de los programas informáticos *m/z* y *Gpmaw*. Sólo se indican los picos correspondientes a péptidos generados por un único corte con PK (x-178). Los picos no identificados pueden corresponder a impurezas proteicas presentes en la muestra, puntos de corte múltiples, etc.

En relación con el efecto detergente sobre la susceptibilidad al corte con PK, se analizó el resultado de reemplazar un 1% de sakosyl por un 0.1% de β -OG, como detergente empleado para resuspender la PrP^{Sc}. Como se deriva de la proporción de moléculas que aparecen en el sobrenadante después de una centrifugación a 40,000 rpm (g_{av} 56,806), el uso de uno u otro detergente afecta a la estructura cuaternaria de la PrP^{Sc}. En consonancia con nuestros resultados previos, las suspensiones preparadas en 1% de sarkosyl contienen una cantidad que supera el ~35% de PrP soluble. Sin embargo, aquellas preparadas en 0,1% de β -OG exhiben una cantidad ínfima de moléculas en el sobrenadante después de la centrifugación (Figura 23). El análisis por MALDI-TOF de los péptidos

generados tras el corte con PK muestra que en ambos casos se detectan los mismos puntos de corte. Este hecho sugiere que el patrón de corte con PK se halla principalmente relacionado con la estructura secundaria-terciaria, mientras que la estructura cuaternaria modularía la intensidad del corte sin aportar otros puntos nuevos.

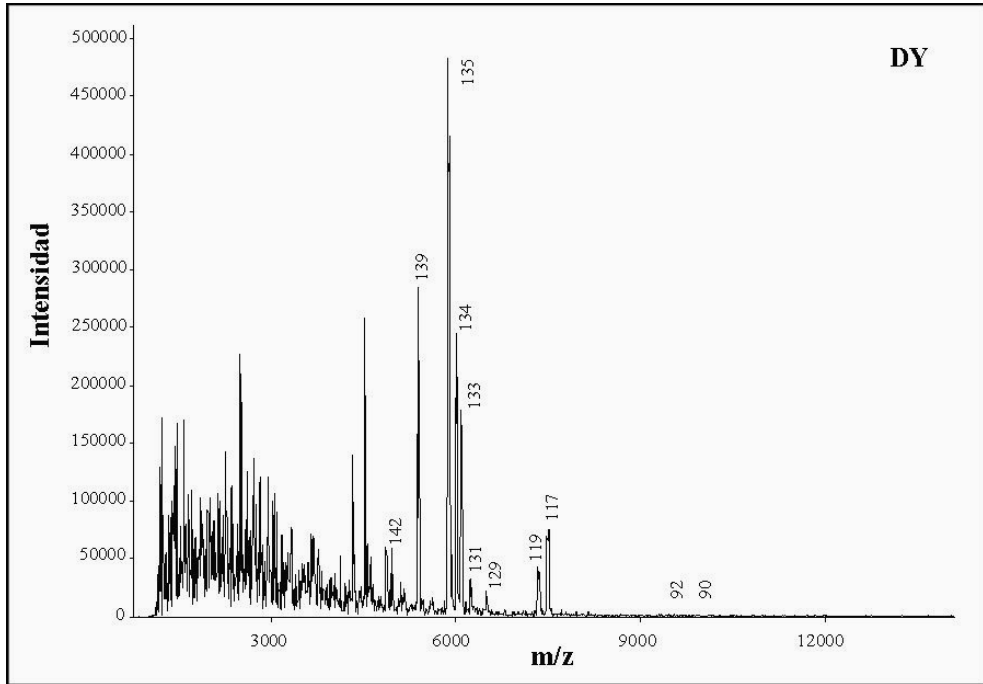


Figura 35: Análisis por MALDI-TOF de PrP^{Sc} de DY digerida con PK. Espectro mostrando los fragmentos de digestión de la PrP^{Sc} (0.1% β -OG) de DY formados tras el tratamiento con 5 μ g/ml de PK (37 °C; 1 h), y la subsiguiente reacción de corte con NTCB. Los péptidos se eluyeron con Zip-Tip[®] (Millipore); se usó una matriz de ácido sinapínico; y se analizó en modo lineal. La identificación de los picos se realizó con ayuda de los programas informáticos *m/z* y *Gpmaw*. Sólo se indican los picos correspondientes a péptidos generados por un único corte con PK (x-178).

Cabe destacar que el propio fundamento del análisis por MALDI-TOF conlleva una serie de desventajas técnicas intrínsecas que afectan a la detección de ciertos analitos (ionización, respuesta no lineal, etc); entre ellos, los fragmentos de mayor peso molecular ($m/z > 10.000$). Este hecho puede repercutir en que determinados puntos de corte - como el 90, 92, etc, - no sean detectados con la misma facilidad, por lo que la intensidad de la señal

observada no representaría fielmente su abundancia real en solución. No obstante, este análisis se repitió varias veces, observándose siempre una gran reproducibilidad desde el punto de vista cualitativo entre los distintos espectros obtenidos.

Proteólisis parcial de sPrP^{Sc} con PK

Una comparación entre sPrP^{Sc} y tPrP^{Sc} a partir de los datos obtenidos mediante digestión parcial con PK, podría revelar las similitudes o diferencias estructurales habidas entre ambas poblaciones. Esta vez una cantidad equivalente de sPrP^{Sc} se sometió a proteólisis limitada con PK (1 µg/ml; 37 °C). Los productos de digestión se analizaron a distintos tiempos por MALDI-TOF. Para simplificar el análisis espectrométrico, los péptidos generados tras la digestión con PK se trataron con NTCB.

El análisis por MALDI-TOF revela la presencia de puntos de corte en las posiciones 117, 119, 135 y 139 (Figura 36B y C). La intensidad de los picos va en aumento a medida que avanza la reacción. El hecho de que puntos de corte se correspondan precisamente con zonas de susceptibilidad a PK descritas en el apartado anterior, pone de manifiesto un comportamiento similar, aunque no idéntico, entre sPrP^{Sc} y tPrP^{Sc} frente a la proteólisis. Las diferencias surgen de las notables variaciones encontradas a nivel del perfil espectrométrico, en relación a la proporción de determinados picos. Así, los 117 y 119 son relativamente menos abundantes. Al aumentar la concentración de PK a 50 µg/ml, tampoco se aprecian nuevos puntos de corte respecto de los observados para tPrP^{Sc}. Sin embargo, dejan de detectarse los péptidos correspondientes a un corte en las posiciones 117 y 119, y si se aprecia el corte en la posición 142 (datos no mostrados).

La relevancia en términos cuantitativos de los sitios de corte “internos” observados por MALDI-TOF puede apreciarse mediante WB (Figura 36A). Efectivamente, con el anticuerpo C-terminal R1 se detectan los distintos fragmentos de PrP generados tras la digestión con PK, una vez deglicosilados con PNGasa F (“overnight”; 37 °C). De este modo, además de la banda intensa correspondiente al punto de corte en la posición 90 y alrededores, resultan evidentes otras cinco bandas de menor peso molecular. Debe tenerse en cuenta que la digestión se realiza cuando la proteína se encuentra en estado nativo, por lo que se espera una mayor intensidad de las bandas correspondientes con cortes en zonas más

expuestas de la molécula. Aunque resulta imposible establecer con certeza la identidad de cada una de las bandas observadas, su peso molecular aparente sugiere que la banda de ~16 kDa puede corresponderse con los fragmentos 117-178 y 119-178. Estos resultados parecen corroborar las zonas de susceptibilidad a PK observadas por MALDI-TOF, más allá de aquellas que afectan al extremo N-terminal y que ya habían sido descritas con anterioridad en la literatura.

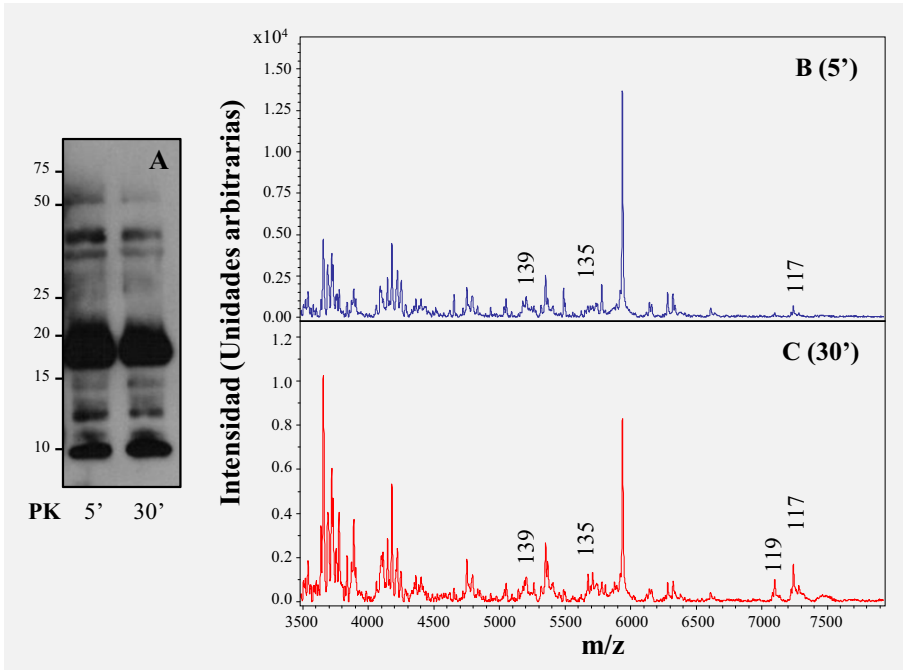


Figura 36: Cinética de la reacción de digestión de sPrP^{Sc} con PK. La sPrP^{Sc} fue digerida parcialmente a distintos tiempos con PK (1 µg/ml; 37 °C), y la reacción se detuvo con 1-2 mM Pefabloc. **A:** Western blot mostrando el resultado de esta digestión a los 5 y 30 min. Las muestras se deglicosilaron con PNGasa F (“overnight”; 37 °C), se resolvieron en SDS-PAGE (16%) y la PrP se detectó con anticuerpo C-terminal R1. **B y C:** Espectros de MALDI-TOF para los mismos productos de digestión a los 5 y 30 min, respectivamente. En este caso, las muestras no fueron deglicosiladas sino tratadas con NTCB. Sólo se indican los picos correspondientes a péptidos generados por un único corte con PK (x-178).

La recopilación de todos los puntos de corte hallados hasta el momento, tanto con la complejidad de la fracción sensible a PK en respuesta al tratamiento con tripsina, como

de la propia tPrP^{Sc} extraída de las cepas 263K y Drowsy frente a PK, nos permite construir un mapa de susceptibilidad de la molécula a la proteólisis bajo condiciones limitantes (Figura 37).

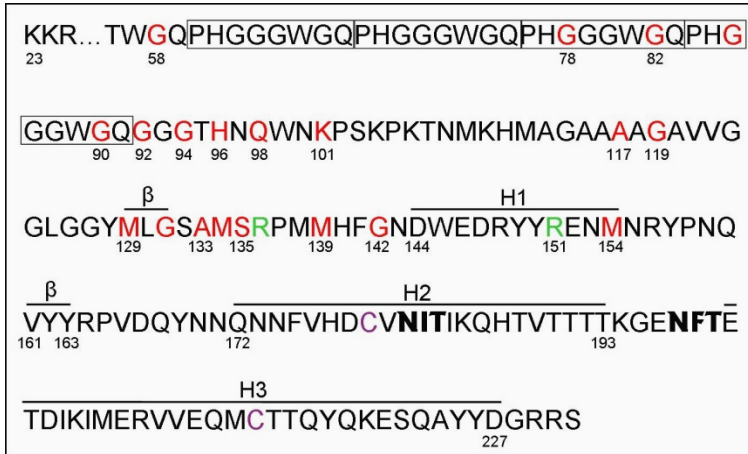


Figura 37: Mapa de susceptibilidad a la proteólisis de la molécula de PrP^{Sc} bajo condiciones limitantes. En color rojo se indican los puntos de corte detectados para PK; en verde, los puntos de corte obtenidos mediante digestión parcial de sPrP^{Sc} con tripsina. Así mismo, se han destacado los octapéptidos repetidos de la región N-terminal, sitios de glicosilación y otros elementos de estructura secundaria característicos de la forma PrP^C (zonas en hoja- β y hélices- α H1, H2 y H3).

Inmunorreactividad frente a anticuerpos conformacionales específicos de amiloide

A menudo, se ha propuesto que la PrP^{Sc} se estructura para formar agregados de tipo amiloide (170). Un nuevo indicio a favor de esta premisa se obtiene del análisis de inmunorreactividad frente a anticuerpos genéricos que reconocen específicamente epitopos conformacionales en estructuras de tipo oligomérico y amiloidogénico, como el anti-oligómeros A11 (171); o de tipo polimérico-fibrilar o amiloide, como el anti-fibras WO1 (172). Por ello, la PrP^{Sc} purificada de cerebros de hámster infectados con 263K y DY se expuso a estos anticuerpos, y se efectuó un análisis mediante la técnica de dot blot. La PrP^{Sc} fue reconocida por los dos anticuerpos en ambas cepas cuando la proteína se encuentra en estado nativo (Figura 38). Sin embargo, la desnaturalización de la PrP^{Sc} (100 °C en Tc; 10

min), y el consecuente desmoronamiento de la estructura induce la pérdida de afinidad del anticuerpo. Estos resultados revelan la presencia de este tipo de epitopos conformacionales y sugieren una naturaleza amiloide para la PrP^{Sc}.

El resto de especies de PrP testadas, tales como, sPrP^{Sc}, rPrP^{Sc}, PrP27-30, el fragmento PrP106-126 fibrilado y la proteína β -amiloide 1-40 también mostraron inmunorreactividad frente a los anticuerpos anti-oligómeros A11 y anti-fibras WO1 (datos no mostrados).

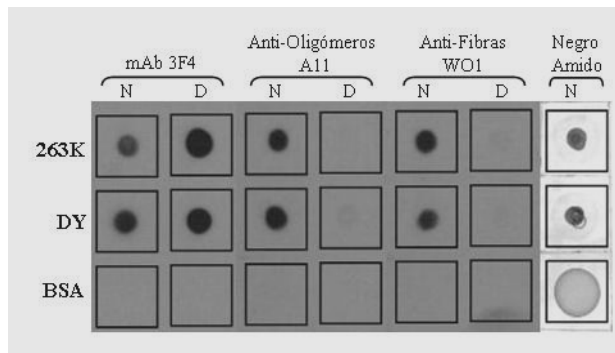


Figura 38: Dot blot mostrando la inmunorreactividad de la PrP^{Sc} frente a los anticuerpos Anti-Oligómeros (A11) y Anti-Fibras (W01). Cada muestra fue testada en estado nativo (N) y desnaturalizado (D). El mAb 3F4 sirve de control positivo para la PrP; la BSA como control negativo de los anticuerpos A11 y el WO1; y la tinción con Negro Amido como control de carga de proteína.

Microscopía electrónica

TEM

PrP27-30. Mediante tinción negativa se observan unas estructuras a modo de fibras de ~5 nm de anchura (Figura 39A y B), cuyo aspecto general y dimensiones coinciden esencialmente con las preparaciones de “rods” típicas (38). A menudo, varias de estas fibras parecen entrecruzarse entre sí para formar los *rods*; y ocasionalmente se aglutinan alcanzando una estructura cuaternaria adicional que se asemeja a una especie de “superhélice” (Figura 39C y D).

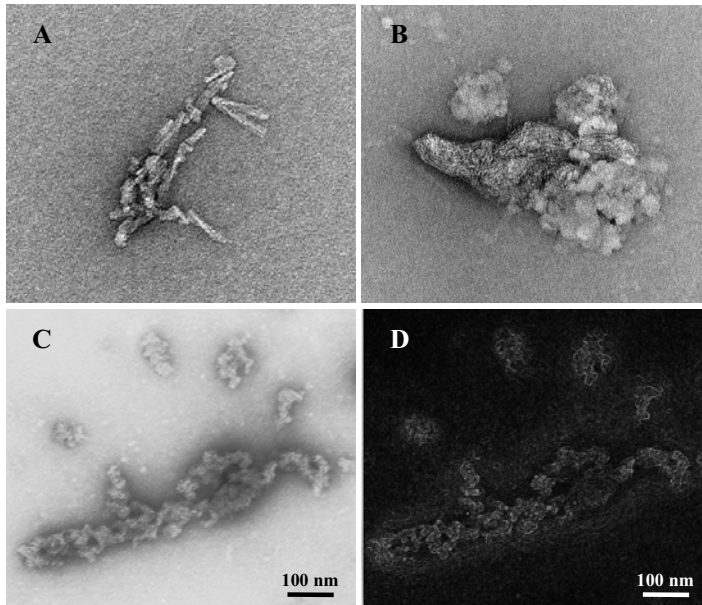


Figura 39: Imagen de PrP27-30 mediante TEM. Tinción negativa de una suspensión de PrP27-30 preparada en T8.5 y 1% sarkosyl (A y B); o directamente en H₂O, donde varias fibras parecen entrecruzarse para formar una “superhélice” (C y D). D: “Edge enhancement” de C.

PrP^{Sc}. El análisis con TEM muestra que parte de la matriz observada en preparaciones de tPrP^{Sc} (Figura 40C y D) coincide con el aspecto general de las muestras de sPrP^{Sc} (Figura 40A y B). Sin embargo, sólo en tPrP^{Sc} se aprecian fibras concentradas en grandes agregados de apariencia informe, similares a los *rods* de PrP27-30. Conviene resaltar que el procesamiento previo de estas muestras no incluye el tratamiento con PK (38). Presumiblemente, el material que constituye la sPrP^{Sc} posea la misma naturaleza que las grandes fibras, aunque con un tamaño promedio de los agregados menor. También se ha observado que la densidad de estos agregados es visiblemente menor en las muestras de sPrP^{Sc} respecto de las de tPrP^{Sc} (Figura 40). Curiosamente, las imágenes de sPrP^{Sc} son muy similares a las obtenidas por Wille *y col.* con un material PrP27-30 sensible a PK (173). Las fibras de PrP^{Sc} aparecen recubiertas de unas pequeñas estructuras circulares atribuibles precisamente a los restos de tubulina y ferritina que cosedimentan durante el proceso de purificación (nótese la menor presencia de estas impurezas en muestras tratadas con PK).

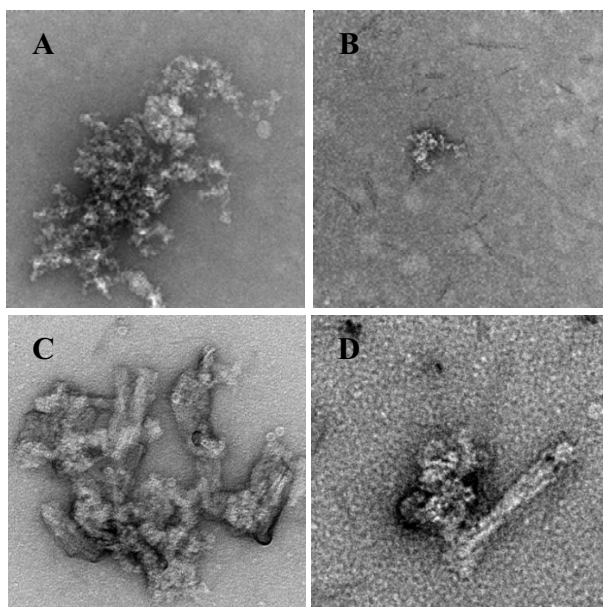


Figura 40: Tinción negativa de PrP^{Sc} (TEM). Las muestras fueron resuspendidas en T8.5 con 1% sarkosyl. **A y B:** sPrP^{Sc}; **C y D:** tPrP^{Sc}.

Crio-TEM

La gran ventaja de esta técnica con respecto a la TEM radica en que no requiere un procesamiento complejo anterior a la visualización de las muestras, circunstancia que eventualmente pudiera inducir la formación de artefactos y/o afectar directamente a las estructuras objeto del análisis alterando su conformación nativa. El fundamento de la crio-TEM, basado únicamente en la ultracongelación instantánea de la propia muestra en solución, nos permite realizar un análisis directo de las distintas estructuras en un estado mucho más “cercano” al fisiológico.



Figura 41: Equipo de crio-microscopía electrónica. Universidad Técnica de Eindhoven. **A:** Robot de vitrificación “Vitrobot™ Mark III” (FEI, Eindhoven, Países Bajos). **B:** Microscopio electrónico de transmisión “Titan Krios™” (FEI, Eindhoven, Países Bajos).

PrP^{Sc} . En lo que se refiere a la estructura y diversidad de los componentes observados, las muestras de $sPrP^{Sc}$ y $tPrP^{Sc}$ exhiben un aspecto similar cuando se analizan mediante crio-TEM (Figura 42). En ambas preparaciones encontramos básicamente fibras discretas de tipo amiloide con un ancho de ~ 4 nm, compatibles con los agregados amiloides de ~ 5 nm observados por TEM, ya que resulta frecuente sobreestimar los valores de anchura mediante tinción negativa por efecto del sombreado metálico; y pequeñas partículas alargadas de aspecto granular, que igualmente poseen ~ 4 nm de ancho y una longitud variable. No obstante, en el material sensible se aprecia un menor grado de compactación, menor número de fibras amiloides y mayor proporción de pequeñas partículas de ~ 4 nm. En cualquier caso, las dimensiones (4 nm) de ambos componentes sugieren un modelo de fibra única, donde la unidad básica de apilamiento a lo largo de la fibra es un monómero de PrP^{Sc} .

Característicamente, con independencia del tipo de muestra de PrP analizada y de la técnica de microscopía electrónica utilizada, no resulta infrecuente localizar estructuras helicoidales a modo de “apilamientos de monedas”. Según Holger Wille (comunicación personal), estas estructuras se corresponderían con impurezas de naturaleza lipídica presentes en la muestra.

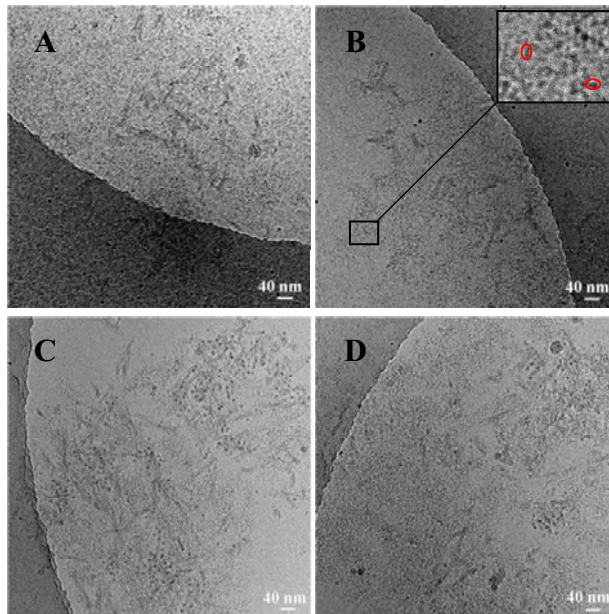


Figura 42: Imágenes de Crio-TEM para PrP^{Sc}. Las muestras fueron preparadas en T8.5 y 1% de sarkosyl. **A y B:** sPrP^{Sc}. **C y D:** tPrP^{Sc}. En ambas se observa la presencia de fibras y material particulado (ver detalle en rojo en B), si bien, este último predomina en muestras de sPrP^{Sc} y viceversa.

El hecho de que la anchura característica del material particulado sea precisamente de ~ 4 nm sugiere que este se corresponde realmente con pequeñas “fibrillas” de PrP^{Sc}. Empíricamente, encontramos otra evidencia en este sentido cuando tras aplicar una extensa sonicación sobre una muestra tPrP^{Sc}, se observa una inmediata disminución de la densidad de fibras y un claro incremento del número de estas partículas (Figura 43).

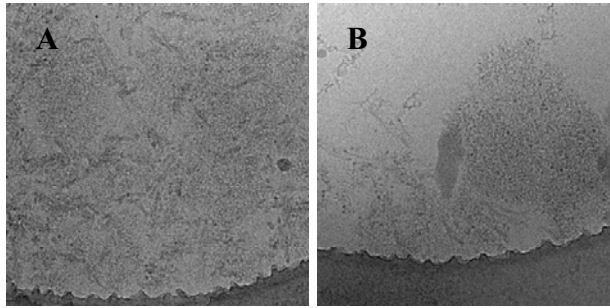


Figura 43: Efecto de la sonicación sobre los agregados de PrP^{Sc}. Imágenes de crio-TEM de PrP^{Sc} en T8.5 y 2% sarkoryl. **A:** Antes de sonicar. **B:** Después de sonicar ampliamente se observa un incremento considerable de material particulado en decremento de los agregados fibrilares.

En una primera aproximación aplicando técnicas de tomografía se ha observado como 2-3 fibras se entrelazan helicoidalmente.

PrP27-30. Aplicando crio-TEM no se aprecia la enorme densidad de fibras - o *rods* - observadas en muestras de PrP27-30 mediante tinción negativa (no mostrado). A consecuencia del necesario proceso de deshidratación que sufren las muestras antes de ser analizadas por TEM podría producirse un efecto artefactual de concentración de las fibras *in situ* cuando se analizan mediante esta técnica. De hecho, este mismo efecto explicaría las diferencias de densidad fibrilar observadas entre las imágenes de TEM y crio-TEM para las propias muestras de PrP^{Sc}.

Durante la realización de estos estudios de microscopía electrónica, la presencia de PrP en las distintas muestras fue corroborada en todo momento por la unión específica que se establece con el anticuerpo anti-PrP R2 ligado a partículas de oro.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Existe un interés creciente por la PrP^{Sc} sensible a PK, una fracción un tanto ensombrecida por el concepto “clásico” de PrP^{Sc}. Probablemente, el planteamiento crítico con el que se han abordado toda una serie de trabajos de investigación, ha contribuido a levantar cierta expectación por la sPrP^{Sc}. En efecto, a pesar de que la acumulación de agregados proteicos localizados en el sistema nervioso central es una característica común de las enfermedades neurodegenerativas, los estudios neuropatológicos no son concluyentes a la hora de determinar si estos son causa o efecto de la patogénesis. Además, existen evidencias que restan protagonismo a los grandes agregados en el proceso de neurodegeneración; sirvan los estudios que muestran una pobre correlación entre la cantidad de depósitos amiloides y la severidad de los signos clínicos. En este sentido, serían los oligómeros solubles los que, conservando la estructura básica, mantendrían un papel predominante en el desarrollo de la patología. En el ámbito de los priones, estudios recientes realizados en humanos (ECJ) afirman que esta fracción representa frecuentemente la inmensa mayoría de la PrP^{Sc} total, llegando incluso a constituir el ~90% (133); paralelamente en ovejas, se han descrito diferentes casos de “*scrapie* atípico”, como el Nor98 o los “*Nor98-like*”, donde también predomina una PrP^{Sc} poco resistente a proteínasa K (174-176). Al mismo tiempo, la sPrP^{Sc} se erige en firme candidata a ofrecer una posible explicación para aquellos resultados experimentales enigmáticos que tradicionalmente han sido difíciles de acomodar dentro del conocimiento actual del paradigma priónico. Al respecto, destacan los experimentos de transmisión donde la patología y/o la disfunción clínica se desarrolla con ausencia de acumulación de “PrP resistente a PK” (128); o aquellos en los que se observa una dificultad inherente para propagar ciertos priones, como en los causantes de algunas de las formas familiares de la enfermedad, donde la transmisibilidad es baja o nula y no existe acumulación de PrP resistente a proteasa (177). Esta última circunstancia también se manifiesta en varios casos de lesión neurodegenerativa espontánea exhibida en ratones transgénicos (178). Tampoco son infrecuentes las “infecciones subclínicas” - aparte de los denominados “priones silentes” - donde, sin apenas sintomatología perceptible, se aprecia una abundante acumulación de PrP^{Sc}, tal y como sucede al inocular priones de hámster en ratón (118). Más aún, un estudio de Shaked *y col.* concluye que la infectividad del prion no está necesariamente asociada a la PrP resistente a

proteasa e insoluble en detergente (131). Todas estas situaciones sugieren que la PrP “clásica” no es siempre la causa principal de la transmisibilidad y la neuropatología (disfunción neuronal, neurodegeneración, etc) en las EETs.

La propia existencia de sPrP^{Sc} encierra en sí misma evidentes implicaciones prácticas, ya que las técnicas analíticas vigentes en la actualidad se ven limitadas por su dependencia de la proteinasa K a la hora de detectar la presencia de PrP^{Sc}. En este sentido, tanto en el caso de transfusiones y trasplantes en humanos, como en la producción de animales para consumo, existe la posibilidad potencial de que determinados individuos afectados de EET y elevado porcentaje de sPrP^{Sc} escapen a los correspondientes controles sanitarios, convirtiéndose en un asunto de gran alcance en salud pública. Esto último redundaría en la necesidad urgente de desarrollar test prácticos y ultrasensibles capaces de detectar cualquier subpoblación de PrP^{Sc} en estadios preclínicos e *in vivo* - en fluidos corporales como la sangre o la orina - para ser aplicados de un modo viable en humanos y animales, y prevenir así la diseminación de este tipo de afecciones.

En esta tesis se propone un sencillo método para aislar la fracción de PrP^{Sc} sensible a PK de la cepa 263K en hámster. Probablemente la ventaja de este método reside en la idea de partir de un material previamente purificado. Resulta innegable que nuestra definición de sPrP^{Sc} es fundamentalmente operacional, ya que se han optimizado las condiciones de centrifugación al punto de conseguir una combinación específica de fuerza centrífuga, tiempo y temperatura que permita aislar una fracción de PrP^{Sc} completamente susceptible a la degradación bajo condiciones estándar, aunque igualmente arbitrarias, definidas por el tratamiento con 50 µg/ml PK a 37 °C durante 1 hora (124). En consecuencia, resulta evidente que una modificación de los parámetros de centrifugación nos permitiría obtener una fracción alternativa que podría definirse igualmente como “sensible” modificando las condiciones de digestión con PK. En sintonía con el trabajo llevado a cabo por Tzaban *y col.* (124), nuestros resultados confirman que los polímeros más grandes de PrP^{Sc} exhiben mayor resistencia a PK que los oligómeros pequeños, sugiriendo una fuerte relación de dependencia entre la capacidad de resistencia a PK y la estructura cuaternaria de la PrP^{Sc}, y estableciéndose una correlación positiva entre la susceptibilidad al enzima y el estado de agregación de la proteína. Al mismo tiempo, y

tanto si el material infeccioso procede directamente de un extracto cerebral o ha sido previamente purificado siguiendo un procedimiento estándar basado en ultracentrifugación en presencia de detergentes, estos resultados nos ofrecen una visión de la PrP^{Sc} compatible con una colección de oligómeros de distinto tamaño y de distribución más o menos continua.

El rendimiento en porcentaje de PrP^{Sc} soluble - no necesariamente “sensible” a proteasa - obtenido bajo condiciones determinadas a partir de una suspensión de PrP^{Sc} purificada podría verse afectado por la variabilidad intermuestral en función de la especie molecular y/o cepa considerada; estadio de la enfermedad; órgano o fluido analizado; proceso de purificación empleado; condiciones de resuspensión y conservación de la muestra (sonicación, detergente, T^a); etc. En la medida de lo posible, la mayor parte de estos factores se mantuvieron constantes para poder valorar individualmente el efecto del detergente. Lógicamente, se observó que un aumento paralelo de la concentración y eficacia del detergente empleado en la resuspensión produce una mayor disgregación de la PrP^{Sc} total hacia formas menos agregadas y solubles. Sin embargo, este hecho no implica necesariamente una perturbación del grado de polimerización inicial de la muestra, antes bien, podría deberse a una disociación de las subpoblaciones de PrP^{Sc} de menor tamaño. De un modo hipotético, este supuesto introduciría un matiz diferenciador entre “estado de agregación”, probablemente relacionado con fuerzas de tipo hidrofóbico que mantienen unidas moléculas independientes de PrP^{Sc}; y “grado de polimerización”, relacionado con el crecimiento estructurado de la fibra de PrP^{Sc}. Por lo tanto, la acción del detergente podría ceñirse a la dispersión por desunión de las fracciones más ligeras y no a la generación *de novo* de material soluble por rotura de subunidades que originalmente poseen un mayor tamaño. En este sentido, se observa un comportamiento diferencial entre la PrP^{Sc} de las cepas 263K y DY (Figura 23), ya que si bien en principio ambas suspensiones sedimentan completamente cuando se resuspenden en 0.1% de β -OG y se someten posteriormente a centrifugación; cuando sendas muestras son resuspendidas en 1% de sarkosyl, el porcentaje de moléculas de PrP en el sobrenadante DY parece claramente superior, sugiriendo una mayor proporción de sPrP^{Sc} de partida en esta cepa. Así, la primera observación denotaría cierta similitud en el estado de agregación de la PrP de una y otra cepa. Sin embargo, la segunda sugiere diferencias que afectan al grado de polimerización original entre ambas. A

mi juicio, esta facilidad acrecentada para disgregar la PrP^{Sc} de DY, respecto de la cepa 263K, junto a su conocida susceptibilidad a la digestión con enzimas proteolíticas, y por qué no, su menor capacidad infecciosa, son indicios que apuntan en una misma dirección; de manera que un único y sutil evento que perturbase la conformación de la molécula de PrP^{Sc} podría afectar seriamente al crecimiento, compactación y estabilidad termodinámica del agregado en formación, confiriéndole en definitiva una serie de propiedades y capacidades más o menos divergentes en cada caso que podrían explicar las diferencias encontradas entre ambas cepas.

La capacidad de resistencia a la digestión con PK se relaciona directamente con la accesibilidad del enzima a determinadas regiones más o menos expuestas del sustrato y a la flexibilidad de las mismas, por lo que parece lógico razonar que precisamente los polímeros de PrP^{Sc} más grandes e insolubles exhiban una mayor protección sobre ciertas subunidades de PrP. Como quiera que no exista un modelo estructural definitivo para la PrP^{Sc}, a priori no resulta sencillo ofrecer una visión de cómo se alcanza dicho grado de protección. Al contrario que la PrP27-30, obtenida por tratamiento proteolítico de la PrP^{Sc} en presencia de detergente, y organizada en “rods” de dimensiones medibles (1;38), no se han aportado nuevos datos experimentales acerca de la organización o del aspecto de los oligómeros de PrP^{Sc}. La visión más parsimoniosa auguraría que la PrP^{Sc} y la PrP27-30 comparten características estructurales básicas, como el modo de apilarse las subunidades de PrP (84), y que sería el corte con PK de la muy lábil cola amino-terminal desestructurada, lo que permitiría su empaquetamiento posterior. Esta posibilidad sería compatible con el modelo replicativo de la PrP^{Sc} basado en la nucleación-polimerización. En este modelo, los dominios en lámina- β de una subunidad de PrP, sea cual sea su organización concreta - hélices- β , simples láminas- β en paralelo, etc - (84;85), ejercerían como molde o “andamio” para la siguiente subunidad de PrP (39;179). Una posibilidad alternativa sería que la PrP^{Sc} y la PrP27-30 difieran en lo que se refiere a su estructura cuaternaria, y que el apilamiento regular propuesto para PrP27-30 se forme íntegramente *de novo* a través de un reajuste completo de las subunidades que constituyen el agregado de PrP^{Sc}; en cuyo caso, los oligómeros de PrP^{Sc} podrían estar formados por agregados amorfos. No obstante, según esto último resulta muy difícil imaginar como una subunidad PrP^{Sc} rica en lámina- β podría perturbar a una molécula de PrP^C forzándola a adoptar la conformación de la PrP^{Sc}. En

cualquier caso, bien como estructuras bien ordenadas o como agregados informes, resulta evidente que los grandes polímeros de PrP^{Sc} disfrutaban de una mayor protección frente a la digestión con PK.

Por otro lado, los resultados obtenidos sugieren que la inmunoreactividad dependiente de conformación mostrada por la PrP^{Sc} es una característica que también mantiene una estrecha relación de dependencia con el tamaño del agregado. Efectivamente, a diferencia de la SHaPrP(90-231) recombinante, la fracción de sPrP^{Sc} exhibió un aumento de la inmunoreactividad tras el tratamiento desnaturizante con hidrocloreuro de guanidinio (Figura 18), si bien, este fue siempre significativamente menor que el observado para la fracción constituida por polímeros de mayor tamaño, designada como rPrP^{Sc}. Una vez más, cabe esperar que el nivel de agregación alcanzado por los grandes polímeros dificulte en mayor medida la accesibilidad, en este caso, del correspondiente anticuerpo por su epitopo. Estos resultados concuerdan con los aportados previamente por Tzaban *y col.* (124), donde se describe un descenso paulatino de la inmunoreactividad dependiente de desnaturización de las fracciones más ligeras en homogenados celulares infectados con *scrapie* sujetos a fraccionamiento en gradiente de sacarosa. En este mismo estudio, el fraccionamiento aplicado a homogenados de cerebro de hámster infectados sirvió para detectar la presencia de fracciones de PrP oligomérica sensibles a la proteólisis con PK en condiciones estándar. Este hallazgo transgredía la capacidad de resistencia a proteasa predicha para la PrP^{Sc}, una propiedad bioquímica “esencial” que tradicionalmente se ha asociado a dicha isoforma. En contra de lo previsto para la PrP celular, este estudio demuestra que esas mismas fracciones de PrP, oligoméricas y sensibles a PK, son además sedimentables por enzima de las 100,000g; por lo que, de algún modo las fracciones de PrP^{Sc} de menor tamaño mantienen esta otra característica bioquímica basada en propiedades de sedimentación, y frecuentemente utilizada para distinguir entre PrP^{Sc} y PrP^C. A grandes rasgos, el fraccionamiento por sedimentación en gradiente de sacarosa de sPrP^{Sc} y rPrP^{Sc} reveló perfiles de distribución por tamaños prácticamente complementarios. Así, mientras que en el material “sensible” abundan las fracciones de PrP más ligeras; en el “resistente” predominan las más densas. Así pues, se puede establecer una correlación positiva entre la capacidad de resistencia a proteinasa K y el tamaño del agregado de PrP^{Sc}.

Los ensayos realizados mediante la técnica de PMCA confirmaron que la sPrP^{Sc} resulta eficaz para promover el proceso de conversión de PrP^C en PrP^{Sc} *in vitro*. Del fraccionamiento de sPrP^{Sc} a través de sedimentación en gradiente de sacarosa se obtuvieron una serie de fracciones de PrP^{Sc} constituidas por oligómeros de menor tamaño relativo que incluyen un porcentaje significativo de agregados de PrP de muy bajo peso molecular estimado, pese a lo cual, todas ellas resultaron tan efectivas como las compuestas por grandes polímeros para convertir PrP^C en PrP^{Sc} mediante PMCA. Así mismo, las sucesivas diluciones de estas mismas muestras fueron igualmente competentes en PMCA (Figura 24). Conviene destacar que la técnica de PMCA permite detectar exclusivamente PrP^{Sc} resistente a PK sintetizada *de novo*, toda vez que existe un tratamiento ulterior con este enzima que antecede a su visualización por Western blot. Quizás, esto último podría representar una desventaja para la sPrP^{Sc} presente en las fracciones 0 y (1+2) sometidas a amplificación, puesto que el proceso de conversión debe progresar hasta la generación de PrP^{Sc} resistente a PK. En el futuro, sería interesante determinar cuál es la proporción de sPrP^{Sc}/rPrP^{Sc} generada por PMCA para las distintas fracciones usadas. Dada la enorme sensibilidad de esta técnica, una buena estima de la eficacia relativa de las diferentes fracciones testadas requeriría la aplicación de un ensayo mediante PMCA “cuantitativa”.

Sin duda, este resultado de actividad conversora *in vitro* apoya fuertemente la idea de que la sPrP^{Sc} posee realmente naturaleza de PrP^{Sc} “clásica”; lejos de corresponderse con un porcentaje de PrP^C que hubiera podido cosedimentar durante el proceso de purificación; o con putativas especies intermediarias desviadas de la ruta molecular que conduce a la biogénesis de PrP^{Sc} “completa” a partir de PrP celular (104). Un estudio reciente, realizado sobre PrP^{Sc} 27-30 previamente disgregada, muestra que las partículas más infecciosas *in vivo* se corresponden con oligómeros relativamente pequeños, con una masa equivalente a 14-28 moléculas de PrP. La capacidad de conversión *in vitro* también alcanza su eficiencia máxima en el mismo rango de tamaños. Ambas propiedades se ven sustancialmente reducidas en las grandes fibras y están virtualmente ausentes en oligómeros de ≤ 5 moléculas de PrP (139). Con las debidas consideraciones, una extrapolación directa de los datos obtenidos para la PrP^{Sc} con aquellos otros derivados de la calibración del sistema con marcadores de peso molecular, sugiere que el material presente en la “fracción de carga” (fracción 0, Figura 21) se corresponde con agregados de PrP de muy bajo peso molecular

de tipo oligomérico, al extremo de que podrían estar formados por menos de 12 subunidades de PrP. Sorprendentemente, los datos derivados de los ensayos con PMCA reflejaron que esta fracción de oligómeros de muy bajo peso molecular posee actividad conversora, resultando igualmente competente para iniciar el proceso priónico de replicación. Quizás por ser la más ligera, es también esta “fracción 0” la más interesante de todas. A mi juicio, su alta solubilidad y el pequeño tamaño de sus agregados, junto a la capacidad conversora, la sitúan como un material idóneo para ahondar en el estudio de la estructura y naturaleza del prion.

Conceptualmente, la característica fundamental de una partícula priónica es sin duda su capacidad infecciosa. En un estudio previo, Riesner *y col.* estimaron que el ~30% de la infectividad estaba asociada al sobrenadante en muestras de PrP²⁷⁻³⁰ (166). Los estudios encaminados a determinar el grado de infectividad de la sPrP^{Sc} *in vivo* mostraron la elevada eficacia de esta fracción aislada de la cepa 263K para infectar a hámsteres sirios. Al mismo tiempo, y atendiendo al tiempo de supervivencia (TS) promedio, la fracción de PrP^{Sc} sensible a PK extraída de la cepa 263K resultó ser aparentemente más eficaz que la fracción de rPrP^{Sc} a la hora de inducir la muerte de estos ejemplares. La persistencia de este resultado se puso de manifiesto a través de las tres vías de inoculación practicadas, llegándose a medir incluso un TS medio por debajo de los 90 dpi cuando la sPrP^{Sc} fue inoculada por la vía ic-d. Las diferencias entre ambas fracciones son significativas estadísticamente cuando son inoculadas por las vías ic-l o ic-d. No obstante, estas diferencias se minimizan por la vía de inoculación ip. Además, la dispersión de los datos es menor cuando se inocula la fracción sPrP^{Sc} por cualquiera de las tres vías practicadas. En términos generales, pero con alta reproducibilidad en algunos casos, la diferencia entre ambas fracciones se sitúa en torno a una semana a favor de la sPrP^{Sc}. Esto podría representar que la infectividad del material sensible fuese incluso hasta 10 veces superior a la del resistente (167). En cualquier caso, estos resultados están en consonancia con los datos aportados por Silveira *y col.*, en relación al tamaño de las partículas más infecciosas (139). Por otro lado, la desviación obtenida a través de la ruta ic-l sugiere que esta modalidad de inoculación de acceso al cerebelo a través del foramen post-glenoide, genera un grado de dispersión mayor que la vía ic-d de acceso directo al cerebro a través del frontal. Esta diferencia podría deberse al efecto que produce el propio inóculo sobre

distintas regiones del encéfalo; o simplemente a que el acceso a través de esta vía específica de inoculación (ic-l) supone una dificultad práctica añadida que podría generar cierta variabilidad.

Atendiendo a los tiempos de supervivencia (dpi) observados en los ensayos de infectividad con material purificado, no se aprecia una pérdida de infectividad asociada al propio proceso de purificación. Cuando se inoculan hámsteres con cantidades equivalentes de PrP, la infectividad de un inóculo preparado a partir de sPrP^{Sc} o tPrP^{Sc} es igual o mayor que la de un inóculo preparado directamente con un homogenado de cerebro infectado al 10%. Esto sugiere que durante la purificación no se deshecha ningún factor que, junto a la PrP^{Sc}, pudiera ser corresponsable de la infectividad; ni se altera brusca o irreversiblemente la estructura de la propia PrP^{Sc}.

No menos interesante resulta la capacidad de la fracción de sPrP^{Sc} de 263K para infectar hámsteres a través de la vía ip. Esta circunstancia diverge abiertamente con la ineficacia manifestada por la PrP^{Sc} total de la cepa DY para infectar hámsteres a través de esta vía. En este aspecto, una supuesta similitud entre DY y sPrP^{Sc} en cuanto a la escasa resistencia a proteasa y al estado de agregación, donde predominasen las formas oligoméricas, no sería suficiente para justificar la baja infectividad observada con DY. A simple vista, los resultados de infectividad para sPrP^{Sc} y los obtenidos de Silveira *y col.* (139) parecen contradecir igualmente los descritos por Safar *y col.* para ocho cepas de hámster, donde aquellas con mayor porcentaje de PrP^{Sc} sensible a PK se caracterizan por presentar periodos de incubación más largos (104). Esta interesante correlación entre el porcentaje de PrP^{Sc} sensible a PK y una característica biológica como el PI puede ser un hecho constatable cuando se analizan cepas distintas, pero no necesariamente si se trata de un efecto intracepa. En términos conformacionales, parece lógico pensar que un mismo suceso pudiera favorecer la aparición de un agregado de PrP^{Sc} de crecimiento lento, escasa resistencia a proteasas y baja infectividad; sin embargo, para una misma cepa los pequeños oligómeros podrían seguir siendo entidades con una dinámica de crecimiento mayor de cara al proceso de replicación.

A falta de un estudio histopatológico, cabe señalar que las diferencias bioquímicas y en TS encontradas entre sPrP^{Sc} y rPrP^{Sc} no implican necesariamente el aislamiento de dos cepas distintas. Cuando se inoculan en hámster, ambas fracciones de 263K provocan la manifestación de los mismos signos clínicos e inducen la formación de tPrP^{Sc}, es decir, no se estabilizan como independientes en pases sucesivos; aspectos, sobre este último, muy a tener en cuenta antes de atribuir identidad de cepa a un determinado inóculo.

La susceptibilidad de la sPrP^{Sc} a una degradación virtualmente completa con tripsina abre la posibilidad de usar la proteólisis parcial como herramienta para abordar un estudio de tipo estructural. Esta aproximación se ha venido utilizando satisfactoriamente para obtener información estructural en una amplia variedad de proteínas cuyas propiedades intrínsecas dificultan el uso de otras técnicas (31-33). Los residuos de lisina y arginina accesibles, expuestos al solvente y que no participan en interacciones iónicas fuertes (flexibles), se cortan fácilmente con tripsina. Los resultados descritos en el apartado anterior constituyen un ejemplo de la aplicabilidad de esta estrategia a la PrP^{Sc}. De este modo, una comparación del rendimiento de los productos de digestión específicos obtenidos de la sPrP^{Sc} y la PrP recombinante, previamente sometidas a concentraciones crecientes de tripsina, permite concluir que los residuos R136, R151, K220 y R229 son particularmente susceptibles de ser cortados en la sPrP^{Sc} (Figuras 27 y 28B). Otras posiciones, como K110, R148, R156, R164, K185 y K194 pueden ser también potencialmente cortadas, pero requieren una mayor cantidad de tripsina, por lo que no se puede excluir la posibilidad de que se generen a partir de puntos de corte secundarios. Por el contrario, tomando como control la SHaPrP(90-231) recombinante es posible identificar todos estos puntos de corte, incluso a las más bajas concentraciones de tripsina testadas (proporción tripsina:sustrato de 1:400). Esta sensibilidad diferencial a tripsina prueba las profundas diferencias conformacionales entre ambas especies. Un análisis similar de la rPrP^{Sc} reflejó un patrón general de corte muy similar al obtenido para la sPrP^{Sc}, aunque con mucho menor rendimiento de fragmentos peptídicos (Figura 28A). En un modelo reciente de PrP27-30 de ratón basado en un núcleo β -helicoidal con giro a la izquierda (84), el residuo R150, equivalente al R151 en hámster, está localizado en un lazo que sobresale desde el centro del núcleo β -helicoidal, lo que estaría en plena armonía con la accesibilidad predicha para este residuo. Los residuos K219 y R228, equivalentes a la K220 y la R229 en

hámster, están localizados en la α -hélice carboxi-terminal, lo que permite igualmente una buena accesibilidad al evitar el obstáculo que suponen los hidratos de carbono unidos a la PrP^{Sc} en la región carboxi-terminal. Sin embargo, la posición R135, equivalente a la R136 en hámster, se sitúa en pleno ensamblaje β -helicoidal, una localización que teóricamente no facilitaría el acceso al enzima. Conviene recordar que un análisis exhaustivo y con amplia cobertura del patrón de corte esperado para la PrP^{Sc} se ve dificultado por la formación de productos de digestión que se encuentran glicosilados, imposibilitando su interpretación e identificación con los métodos utilizados.

El comportamiento observado para la tPrP^{Sc} de DY cuando se somete a digestión con concentraciones gradualmente crecientes de tripsina podría considerarse intermedio entre el observado para la fracción sensible y la resistente de 263K. Quizás, la mayor susceptibilidad a proteasas de DY, probablemente debida a diferencias de conformación en la estructura de esta especie molecular, se esté de algún modo compensando con la contribución diferencial a la resistencia final que aportan las distintas subpoblaciones de polímeros de diferente tamaño que conforman la tPrP^{Sc} en esta cepa.

Paralelamente, este trabajo proporciona una nueva serie de datos experimentales que contribuyen a matizar y constreñir la estructura de la PrP^{Sc}, por lo que han de servir para ajustar el diseño de futuros modelos de PrP^{Sc} cada vez más exactos y certeros. Combinando la proteólisis parcial con proteinasa K, el tratamiento con NTCB, y el análisis mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF), se ha obtenido información estructural de la mitad N-terminal de la isoforma infecciosa. Además de los descritos previamente en la literatura, encontramos nuevos puntos de susceptibilidad a PK, alguno de los cuales afectan a áreas más internalizadas de la molécula de PrP^{Sc}. Al mismo tiempo, estos resultados sugieren que la digestión limitada con PK de la PrP^{Sc} nativa de 263K y Drowsy seguida del tratamiento con NTCB genera los mismos péptidos en ambas cepas, si bien, estos difieren en cuanto a sus proporciones relativas. Precisamente, la cuantificación de los péptidos N-terminales permite discriminar entre ambas cepas, proporcionando una herramienta útil para el diagnóstico diferencial.

Considerando estos datos y los descritos anteriormente para sPrP^{Sc}, en la molécula de PrP^{Sc} se pueden discernir cuatro regiones susceptibles a proteínasa K que discurren entre las posiciones 23-101, 117-119, 131-142 y 151-154 (Figuras 34 y 35). El fundamento que justifica el uso combinado del tratamiento con NTCB y la proteólisis parcial no es otro que el tratar de identificar el mayor número de péptidos posible generados por delante de la posición Cys-179, toda vez que más allá aparecen dos sitios de glicosilación en la molécula que imposibilitan el posterior análisis espectrométrico. Igualmente, la inadecuada relación señal-ruido característica del análisis por MALDI-TOF en modo lineal por debajo de un rango de m/z de 2.000, limita nuestra capacidad para detectar posibles péptidos generados por cortes más allá de la posición 162, aproximadamente. No obstante, conviene recordar que los residuos 136 y 151 resultaban particularmente susceptibles a la proteólisis parcial con tripsina, como se vio en el análisis previo realizado con la fracción de PrP^{Sc} sensible a PK (Figura 27).

El análisis dependiente de la concentración de PK y la proteólisis limitada después de desnaturalización parcial de la PrP^{Sc} confirmó que sólo los puntos de corte mencionados del extremo N-terminal de la proteína son susceptibles a PK (Sajani *et al.*, en imprenta).

Aunque generalmente se considera que la PK es una proteasa de acción inespecífica, previamente se ha descrito que posee una cierta preferencia para cortar por el lado C-terminal del enlace peptídico después de residuos aromáticos o hidrofóbicos. El único residuo aromático en la región 57-101 es el triptófano, presente en las posiciones 57, 65, 73, 81, 89 y 99; mientras que en la región 117-154 encontramos Tyr-128, Phe-141, Trp-145, Tyr-149 y Tyr-150. La omnipresente identificación de fragmentos cortados en las posiciones 117, 119 o 135 implica un corte después de alanina o metionina. Este hecho arguye en favor de que ciertos residuos susceptibles no fueron cortados por la PK a pesar de estar expuestos a la acción del enzima.

Un análisis espectrométrico complementario de las muestras mediante nanoLC-ESI-Q-q-TOF sirvió para confirmar los resultados obtenidos por MALDI-TOF. Esta técnica permitió identificar puntos de corte adicionales de la zona N-terminal y confirmó algunos de los más internos, como los 117, 119, 131, 135 y 139 (Sajani *et al.*, en imprenta).

Estos resultados se ajustan convenientemente a los trabajos previos que describen la presencia de núcleos adicionales de PrP^{Sc} resistente a PK en diferentes muestras. Kocisko *y col.*, tras deglicosilar la PrP de hámster sirio tratada previamente con PK y utilizando un anticuerpo que reconoce un epítipo de la región 217-232, revelaron la presencia significativa de al menos tres fragmentos carboxi-terminales adicionales; sin contar el clásico fragmento que comienza en la posición ~90 (168). Uno de esos fragmentos, con un tamaño de 16 kDa y supuestamente extendiéndose desde las proximidades de residuo 115 hasta la región 217-232, realmente podría corresponderse con uno de nuestros puntos de corte detectados en 117-119. La abundancia de este fragmento resistente a PK se incrementa tras una desnaturalización parcial de la SHaPrP^{Sc}. Dos fragmentos adicionales, detectados únicamente con este anticuerpo que reconoce un epítipo de la zona 143-156, son sugestivos de cortes en esta región. Otro fragmento C-terminal de 7 kDa se describió en la SHaPrP^{Sc} de las cepas Drowsy y Hyper (180). Nuestro grupo ha logrado reproducir y extender los hallazgos de Kocisko *y col.* al corroborar claramente por WB la presencia de cinco bandas por debajo de la clásica banda de PrP deglicosilada; además, la intensidad de estas bandas se correlaciona positivamente con la concentración de proteasa utilizada (Sajani *y col.*, en imprenta).

En muestras de ECJ, Zou *y col.* detallan dos familias de fragmentos resistentes a PK con el extremo N-terminal en las posiciones 162, 167 y 154,156, respectivamente (181). El análisis con electroforesis bidimensional sugiere que esos fragmentos suponen una fracción considerable de la cantidad total de fragmentos resistentes a PK, aproximadamente el 24% (182). Mientras, Zanusso *y col.* describen dos familias adicionales de fragmentos resistentes a PK de 16-17 kDa y 17,5-18 kDa en muestras de ECJ (183). Estas especies, reconocidas por anticuerpos específicos del extremo carboxi-terminal, se corresponderían con cortes cercanos a las posiciones 135 y 141, respectivamente.

El análisis por MALDI-TOF de los productos generados durante la proteólisis parcial de la fracción de sPrP^{Sc} con PK puso de manifiesto los mismos puntos de corte observados con tPrP^{Sc} (117, 119, 135, 139...142). Globalmente, el hecho de que en esta fracción no aparezcan nuevas zonas de susceptibilidad a PK sugiere que sPrP^{Sc} y tPrP^{Sc} poseen una arquitectura estructural similar; donde sPrP^{Sc} no sería una subpoblación distinta,

sino una población de tPrP^{Sc} dentro del continuo de agregados con diferente tamaño, sensibilidad a proteasas y solubilidad que la conforman. No obstante, los perfiles espectrométricos muestran que ambas poblaciones difieren en cuanto a la proporción de estos puntos de corte. Por ejemplo, la abundancia relativa de los picos correspondientes a los cortes 117 y 119 es menor en sPrP^{Sc}. Probablemente, esto sea el resultado de una cinética de reacción ligeramente distinta, reflejo de sutiles diferencias en el estado de agregación. Anteriormente se ha discutido que la sensibilidad a proteasas mostrada por la sPrP^{Sc} se correlaciona con dicho estado de agregación. A su vez, esta enorme sensibilidad explicaría que aparezcan cortes de un modo casi instantáneo incluso a bajas concentraciones del enzima. En principio, según avanza la digestión, o al incrementar la concentración del enzima, aumenta la intensidad de los picos correspondientes a los puntos de corte indicados. En adelante, parece observarse un doble efecto sobre la proteína; así, se destruyen los núcleos resistentes generados inicialmente (cortes en 117 y 119), y se favorece la formación de cortes en posiciones más internas, dentro de las regiones parcialmente accesibles de la PrP^{Sc}, como sucede en 142.

Cuando se analizan los productos de la digestión parcial de sPrP^{Sc} con PK mediante Western blot con el anticuerpo R1, se aprecian cinco bandas por debajo de la correspondiente al corte a la altura de la posición ~90 (Figura 36A). A priori, estos resultados son compatibles con las zonas de susceptibilidad a PK observadas por MALDI-TOF (Figuras 36B y C). Cuantitativamente, la presencia de estas bandas pone de manifiesto la importancia de los puntos de corte “internos” mencionados.

En una aproximación similar a la aquí descrita, Bocharova *y col.* identificaron los tramos 138/141, 152/153, y 162 como regiones susceptibles a PK en fibras amiloides de PrP recombinante (182). En estas fibras, la región contenida entre los residuos 89-138 es totalmente susceptible a la proteólisis, en contraste con la PrP^{Sc} donde no se han encontrado puntos de corte entre los residuos 120 y 130. No obstante, la relación estructural entre PrP^{Sc} y las fibras amiloides de PrP recombinante permanece aún sin establecer con precisión. Ha de ser tenida en cuenta la ausencia de infectividad específica observada en las fibras amiloides de PrP recombinante; probablemente, entre ambos tipos moleculares existan

diferencias estructurales significativas que justifiquen la alta capacidad infecciosa de la PrP^{Sc}.

Dilucidar las fundamentales diferencias entre cepas es uno de los grandes retos en la investigación sobre priones. El hecho de que dos cepas diferentes contengan los puntos de corte para la PK exactamente en las mismas posiciones sugiere una estructura terciaria muy similar en ambas, al menos en lo que respecta a la mitad N-terminal de la proteína.

Frecuentemente se ha descrito una diferencia de 1-2 kDa detectada en SDS-PAGE entre 263K y Drowsy después del correspondiente tratamiento con PK (105). La cuantificación del truncamiento desigual en el extremo N-terminal revela un predominio del corte en la posición 90 para 263K y en la posición 101 para DY. La diferencia de ~1,1 kDa entre esas dos posiciones podría explicar la migración diferencial en gel tantas veces descrita en la literatura. El Western blot revelado con el anticuerpo N-terminal 3F4 de la PrP^{Sc} tratada con PK y NTCB apoya esta conclusión (Figura 33). Esta diferencia de ~1,1 kDa entre ambas cepas, en lugar de los 2 kDa, concuerda con los hallazgos aportados originalmente por Bessen *y col.* (184). A pesar de las similitudes entre 263K y DY, la diferente proporción relativa observada para determinados péptidos y los resultados de Western blot (mAb 3F4), sugieren que podrían existir sutiles diferencias estructurales a nivel de los segmentos 70-101 y 117-119 de la proteína; lo que puede servir de gran ayuda para el diagnóstico diferencial.

Con anterioridad, se ha descrito que la sustitución de un detergente por otro durante la resuspensión parece afectar considerablemente a la estructura cuaternaria de la PrP^{Sc}. Este efecto, observado al reemplazar un 1% de sarkosyl por un 0.1% de β -OG, queda reflejado en la proporción de moléculas detectadas en el sobrenadante tras una centrifugación a 40.000 rpm (g_{av} 56806g). Los datos confirmaron que el porcentaje de moléculas en el sobrenadante de las suspensiones preparadas en 1% sarkosyl supera ampliamente al observado en las muestras que contienen 0.1% de β -OG (Figura 23). No obstante, cuando se examina el efecto del detergente sobre la digestión de PrP^{Sc} con PK y se analizan por MALDI-TOF los péptidos generados, se detectan exactamente los mismos puntos de corte en ambos casos. Esto refuerza la noción de que el patrón de corte de la PK

se dicta principalmente a nivel de la estructura secundaria/terciaria, mientras que la estructura cuaternaria modula la intensidad del corte detectado, sin que esto parezca afectar a la generación de nuevos cortes en otros lugares. En otras palabras, una mayor dispersión de la PrP^{Sc} hacia formas más solubles u oligoméricas favorece las interacciones E:S, y por lo tanto, la frecuencia con la que se producen los cortes, aunque los impedimentos de carácter conformacional reprimirían la formación de cortes en nuevas posiciones.

Los datos experimentales expuestos se ajustan fielmente con una arquitectura para PrP^{Sc} conforme a una serie alternante de tramos en lámina- β conectados por lazos y giros. Precisamente, los puntos de corte detectados mediante proteólisis parcial se alojarían en estas zonas más expuestas y flexibles de la molécula de PrP^{Sc}. Estos resultados no contradicen la propuesta de “cola desestructurada” tantas veces sugerida para el extremo N-terminal de la molécula. Mediante estudios de NMR en estado sólido se ha establecido recientemente un diseño estructural similar para los priones Het-s (185), Sup35p (186) y Ure2p (187) en sus formas fibrilares, así como para las estructuras amiloides de A β 1-40 (188), A β 1-42 (189), β -microglobulina (190), y sinucleína (191). Desgraciadamente, estas técnicas no son aplicables a la PrP^{Sc}, ya que requieren el uso de material marcado isotópicamente. Además, estudios basados en crio-TEM sugieren una organización estructural similar para la forma amiloide del dominio SH (192). Nótese que, en aquellos casos en los que los estudios de proteólisis parcial preceden al subsiguiente análisis basado en el uso de técnicas de NMR, se obtuvo una gran concordancia en los resultados, dentro de los límites que permite la baja resolución de la primera aproximación (193). Entre los recientes modelos teóricos propuestos para PrP^{Sc}, el sugerido por Govaerts y col. (83;84) también encaja, en términos generales, con un diseño estructural semejante, con la particularidad de que las cortas láminas- β forman una hélice- β que se expande desde el residuo 89 hasta el 174 (numeración de ratón), interrumpidas por dos lazos entre las posiciones K₁₀₀-P₁₀₄, y E₁₄₅-R₁₆₃. Aunque nuestros datos son realmente compatibles con una hélice- β interrumpida por lazos, los puntos de corte en 117, 119, 135, 139, 142 y en la región 90-101 no parecen compatibles con la localización de esos residuos en medio de una lámina- β como se asigna en este modelo (84). Sin embargo, no resultaría difícil imaginar una versión modificada del modelo en la que la localización de los lazos se reemplazase de acuerdo con las regiones susceptibles y resistentes determinadas en este estudio. En

cualquier caso, estas nuevas restricciones no resultan fáciles de acomodar en una conformación β -helicoidal como la sugerida.

Wasmer y *col.*, con la ayuda de técnicas robustas y avanzadas de NMR en estado sólido, han determinado que la estructura fibrilar de la forma propagativa de Het-s es un solenoide irregular de dos pisos apilables, con hebras cortas de cuatro hojas- β por piso conectadas por giros y lazos (194). Algunos residuos cargados, difícilmente compatibles con una conformación en hoja- β , son simplemente excluidos de las láminas y situados en pequeños segmentos conectores a modo de lazo; no obstante, resulta posible concebir que la PrP^{Sc} también pueda exhibir un plegamiento más o menos flexible del estrictamente necesario para conformar una auténtica hélice- β .

Los estudios de FTIR indican que el contenido en hoja- β de la PrP^{Sc} ronda el 40% (30;31). Considerando que los tres tramos relativamente resistentes a PK definidos en nuestro estudio se correspondan con regiones organizadas en una estructura secundaria en hoja- β , y asumiendo cierta incerteza en la determinación precisa de los bordes de tales regiones, tan solo ~24 residuos entrarían a formar parte de una conformación en hoja- β , lo que representa aproximadamente un 10%. Este porcentaje, manifiestamente inferior al esperado, sugiere que deben existir otras regiones de la proteína que adopten dicha conformación beta. Al respecto, aunque no se dispone de datos más allá de la posición 154, Zou y *col.* han descrito núcleos resistentes a PK que comienzan en las posiciones 162 y 167 en ECJ (181). Además, el fragmento de 7 kDa observado en ShaPrP^{Sc} sugiere una alternancia de tramos beta y lazos en la región C-terminal de la PrP^{Sc}. No puede asegurarse con certeza que estos datos sean extrapolables a la PrP^{Sc} de hámster sirio, por lo que las hélices- α carboxi-terminales podrían conservarse total o parcialmente.

En síntesis, este estudio proporciona una serie nueva de restricciones estructurales para PrP^{Sc} determinadas de forma experimental; probablemente insuficientes para abordar el diseño de un nuevo modelo estructural de PrP^{Sc} completo, pero que podrían ser una herramienta útil para validar o testar otros modelos establecidos. En este sentido, nuestros datos son completamente incompatibles con el “modelo espiral” propuesto por DeMarco y Daggett (85), derivado de simulaciones *in silico* y basado en un continuo de hojas- β

asociadas lateralmente; ya que en esta propuesta los puntos de corte detectados en nuestros estudios se situarían en el medio de láminas en hoja- β .

Realmente, buena parte de los planteamientos disertados hasta el momento son compatibles con la idea de que la PrP^{Sc} se estructura en agregados de tipo fibrilar. El análisis de inmunorreactividad con anticuerpos específicos de conformación que reconocen estructuras típicamente fibrilares o amiloides, como el anti-oligómeros A11 (195) y el anti-fibras WO1 (196), mostró que estos anticuerpos reconocen a la PrP^{Sc} de las cepas 263K y DY cuando la proteína se encuentra en estado nativo. Sin embargo, la desnaturalización de la PrP^{Sc}, y el consecuente desmoronamiento de la estructura, induce la pérdida de afinidad de ambos anticuerpos. Estos resultados suponen otra prueba a favor de la naturaleza fibrilar de la PrP^{Sc}.

El resto de especies de PrP testadas - sPrP^{Sc}; rPrP^{Sc}; PrP 27-30 y fragmento PrP 106-126 - también reaccionaron positivamente con estos anticuerpos (datos no mostrados). Esto sugiere que de algún modo en todas ellas se conserva la disposición molecular necesaria para mantener su tendencia a formar fibras.

La aplicación de las técnicas de microscopía electrónica al estudio de la PrP^{Sc} purificada reveló la presencia de estructuras de aspecto fibrilar. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente para distintas muestras de PrP^{Sc} en relación al perfil de distribución por tamaños obtenido y a la inmunorreactividad exhibida por estas muestras en términos de dependencia a la desnaturalización, o incluso frente a anticuerpos conformacionales. Efectivamente, el predominio de fracciones de bajo peso molecular observado tras el fraccionamiento mediante centrifugación en gradiente de sacarosa de la sPrP^{Sc}, coincide con la abundancia de pequeño material particulado en imágenes de criotEM; si bien, en ambas aproximaciones se detecta, aunque en menor medida, la presencia de material de mayor tamaño o densidad. Precisamente, cuando se analizan muestras de tPrP^{Sc} se invierte esta situación observándose un incremento en el tamaño y la densidad de los agregados. Igualmente, se advierten indicios de compatibilidad entre las imágenes de microscopía electrónica y los resultados obtenidos mediante inmunoensayo dependiente de conformación (CDI). Las imágenes de tinción negativa en muestras PrP^{Sc} o PrP27-30

constatan un nivel de complejidad estructural añadido que se alcanza cuando varias fibras se entrelazan entre si, llegando incluso a formar densos enrollamientos supramoleculares helicoidales o “super-hélices” (Figura 39). Posiblemente, este nivel superior de agregación se relaciona con interacciones de carácter hidrofóbico que se establecen en presencia de un medio acuoso, máxime si este carece de detergentes. Siendo así, no resulta extraño pensar que este estado “nativo” de agregación pueda afectar a la accesibilidad de un determinado anticuerpo por su epitopo. Siguiendo esta línea argumental y aplicando este mismo razonamiento cuando se trata de la accesibilidad de un enzima por su punto de corte, se comprende fácilmente que la disminución de este efecto de aglutinación de fibras pueda incidir en la susceptibilidad a la degradación de la propia fracción de sPrP^{Sc}.

En el apartado de resultados se estableció una correspondencia de identidad entre el material particulado y pequeñas estructuras fibrilares o “fibrillas” en base a una coincidencia entre el ancho de las partículas y el de las fibras (~4 nm), y a un incremento en el número de estas partículas cuando una muestra de tPrP^{Sc} rica en fibras se somete a una sonicación extensa (Figura 43). Este efecto de ruptura o disgregación de las grandes fibras hacia formas más pequeñas provocado por la sonicación ha sido ampliamente descrito, sin ir más lejos, forma parte del fundamento que se aplica en los ensayos de PMCA (122). Por otro lado, y a pesar de que las pequeñas partículas no se tiñen con Rojo Congo, su reconocimiento por parte del anticuerpo específico anti-fibras es otro indicio a favor de la naturaleza fibrilar de este material, lo que sugiere además que dicho reconocimiento no requiere que las fibras sean demasiado largas.

La solubilidad de la fracción de sPrP^{Sc} la hace particularmente interesante para estudios de tomografía. Aunque con baja resolución, en este tipo de análisis se obtiene una reconstrucción estructural a partir de un mapa de densidad obtenido a partir de las imágenes realizadas desde distintos ángulos. De forma preliminar, se ha detectado la presencia de fibrillas entrelazadas en muestras de sPrP^{Sc}.

Por lo que respecta a las dimensiones de las fibras, los resultados descritos en este trabajo utilizando crio-TEM muestran claramente que la fibra básica de PrP^{Sc} tiene una anchura de 4 nm. Estas dimensiones son compatibles con un modelo de fibra única, donde

el elemento estructural básico de apilamiento a lo largo de la fibra sea un monómero de PrP^{Sc}. Resultado completamente incompatible con la sección del trímero en el modelo propuesto por Govaerts *y col.* (84). Cabe destacar que los ~5 nm de anchura observados mediante TEM serían perfectamente compatibles con los ~4 nm vistos por crio-TEM, toda vez que al realizar una tinción negativa los valores de anchura se sobreestiman por efecto del sombreado metálico.

Otro aspecto destacable en referencia al análisis de las distintas estructuras observadas mediante microscopía electrónica se deriva del estudio de los “*rods*”. No se puede descartar categóricamente que este tipo de organización responda simplemente a la generación de un producto artefactual como resultado del método empleado para obtención de fibras de PrP27-30 (38); o incluso que se forme como consecuencia de un efecto de concentración de las mismas durante el proceso de deshidratación que sufren las muestras previo a la obtención de imágenes por TEM.

En resumen, se ha desarrollado un sencillo método para aislar una fracción de PrP^{Sc} sensible a proteinasa K. El examen de sus propiedades bioquímicas y biológicas nos revela un material formado por una serie de fracciones ligeras de oligómeros de PrP^{Sc}, con mayor solubilidad relativa y menor inmunoreactividad dependiente de conformación para el mAb 3F4 que la PrP^{Sc} resistente a proteasas, y que posee actividad conversora *in vitro* por PMCA y alta capacidad infecciosa *in vivo*. Además, esta fracción es susceptible a la digestión catalizada por otros enzimas proteolíticos, como la tripsina. Felizmente, este material ha resultado apto para el estudio de aspectos fundamentales de la bioquímica de la PrP^{Sc}. Además, el tamaño y la solubilidad de sus agregados y su aparente naturaleza fibrilar la convierten en una fracción de PrP^{Sc} particularmente interesante para estudios de tomografía.

De otro lado, y sin obviar las principales restricciones contempladas en la bibliografía, una recapitulación de los datos experimentales obtenidos directamente del análisis estructural de la tPrP^{Sc} aquí descritos, y su adecuación a los modelos estructurales propuestos, sugiere una estructura para PrP^{Sc} basada en una sucesión alternante de lámina-β/giro-lazo/lámina-β, que probablemente se ensamblan formando más de un piso. A su vez,

esta propuesta estructural contempla la posibilidad de que el diseño arquitectural de PrP^{Sc} se disponga en un entramado molecular basado en algún tipo de “beta solenoide” conectado por lazos.

Eventualmente, las nuevas restricciones estructurales obtenidas experimentalmente mediante un análisis más extenso en las líneas de investigación iniciadas, o derivadas del uso de otras técnicas en estudios adicionales, podrán ser confrontadas en su momento con los modelos vigentes. Entre estas nuevas aproximaciones se pueden incluir experimentos de cinética de degradación de tPrP^{Sc} o sPrP^{Sc} mediante proteólisis parcial con diferentes enzimas, estudios de entrecruzamiento químico (91), estudios de marcaje superficial con intercambio de deuterio en ratones “GPI-*less*”, y microscopía electrónica (TEM, crio-TEM y tomografía); algunos de cuales se hallan actualmente en curso. Quizás, en el futuro todos los datos obtenidos de forma experimental converjan en un modelo estructural definitivo de PrP^{Sc}.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Se ha logrado aislar una fracción soluble de PrP^{Sc} sensible a proteinasa K.
- Existe una correlación positiva entre la capacidad de resistencia a proteasa y el estado de agregación de la PrP^{Sc}.
- La sPrP^{Sc} se encuadra en un rango de oligómeros de pequeño tamaño relativo dentro de la distribución continua de agregados que conforman la PrP^{Sc}.
- El estado de agregación afecta a la solubilidad de la PrP^{Sc}.
- La sPrP^{Sc} también muestra susceptibilidad a tripsina, particularmente a nivel de las posiciones R136, R151, K220 y R229.
- La sPrP^{Sc} ostenta menor dependencia a la desnaturalización que la rPrP^{Sc} o la tPrP^{Sc}.
- La sPrP^{Sc} posee actividad conversora mediante PMCA.
- La sPrP^{Sc} es infecciosa.
- Los puntos de corte detectados tras proteólisis parcial de sPrP^{Sc} con PK reflejan similitud estructural con tPrP^{Sc}.
- La propia existencia de sPrP^{Sc} implica que la detección de PrPres no debiera ser el único marcador válido para la confirmación de una EET (posibilidad de falsos negativos en determinadas cepas).
- La PrP^{Sc} se caracteriza por una alternancia de tramos susceptibles y resistentes a PK.
- La PrP^{Sc} presenta susceptibilidad a PK en las áreas 23-101, 117-119, 131-142 y entorno a la posición 154.
- La digestión parcial de la PrP^{Sc} nativa de 263K y DY con PK genera los mismos puntos de corte en ambas cepas, aunque en diferente proporción relativa (herramienta para el diagnóstico diferencial).
- La estructura secundaria/terciaria de la molécula de PrP^{Sc} no parece verse afectada por el efecto del detergente, aunque si la cuaternaria (% de sPrP^{Sc}).
- La PrP^{Sc} exhibe una arquitectura de tipo amiloide o fibrilar en análisis de microscopía electrónica y en ensayos de inmunoreactividad frente a anticuerpos conformacionales.
- Los datos de microscopía electrónica comportan una visión coherente con los estudios bioquímicos previos para sPrP^{Sc} en términos de estructura cuaternaria y sugieren que el elemento estructural básico de apilamiento a lo largo de la fibra es un monómero de PrP^{Sc} (4 nm).

PERSPECTIVAS FUTURAS

PERSPECTIVAS FUTURAS

Los conocimientos adquiridos y las técnicas aplicadas durante esta etapa doctoral pueden servir para abrir o ampliar una serie de posibles líneas de investigación a desarrollar en el futuro.

- Estudios estructurales adicionales basados en la proteólisis parcial: cinética más amplia de degradación de sPrP^{Sc}, e incluso extensiva al uso de otras enzimas.
- Fraccionamiento y caracterización de las distintas subfracciones que conforman la sPrP^{Sc}: la obtención de fracciones más homogéneas en tamaño podrían resultar de gran utilidad en estudios de carácter estructural.
- Caracterización de la PrP^{Sc} de distintas cepas o “subcepas” en función de su: resistencia a proteasas; perfil de distribución por tamaños; inmunorreactividad dependiente de conformación (CDI); porcentaje de sPrP^{Sc}; perfil de los fragmentos generados por digestión, utilizando una batería de enzimas y anticuerpos que permita cubrir un amplio espectro de la molécula;etc.
- Estudios de tomografía con la “fracción 0” de sPrP^{Sc}.
- Desarrollo de métodos analíticos de detección de PrP^{Sc} no basados en el empleo de PK.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 13363-13383.
2. Williams, E. S. and Young, S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wildl. Dis.* **16**, 89-98.
3. Wells, G. A., Scott, A. C., Johnson, C. T., Gunning, R. F., Hancock, R. D., Jeffrey, M., Dawson, M., and Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* **121**, 419-420.
4. Marsh, R. F. and Hadlow, W. J. (1992). Transmissible mink encephalopathy. *Rev. Sci. Tech.* **11**, 539-550.
5. Pearson, G. R., Wyatt, J. M., Gruffydd-Jones, T. J., Hope, J., Chong, A., Higgins, R. J., Scott, A. C., and Wells, G. A. (1992). Feline spongiform encephalopathy: fibril and PrP studies. *Vet. Rec.* **131**, 307-310.
6. Collinge, J. (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 519-550.
7. Gajdusek, D. C. (1963). Kuru. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **57**, 151-169.
8. Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J., and Alpers, M. (1966). Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* **209**, 794-796.
9. Mead, S., Stumpf, M. P., Whitfield, J., Beck, J. A., Poulter, M., Campbell, T., Uphill, J. B., Goldstein, D., Alpers, M., Fisher, E. M., and Collinge, J. (2003). Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. *Science* **300**, 640-643.
10. Bons, N., Mestre-Frances, N., Belli, P., Cathala, F., Gajdusek, D. C., and Brown, P. (1999). Natural and experimental oral infection of nonhuman primates by bovine spongiform encephalopathy agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 4046-4051.

11. Lasmezas, C. I., Deslys, J. P., Demaimay, R., Adjou, K. T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J., and Hauw, J. J. (1996). BSE transmission to macaques. *Nature* **381**, 743-744.
12. Cochius, J. I., Hyman, N., and Esiri, M. M. (1992). Creutzfeldt-Jakob disease in a recipient of human pituitary-derived gonadotrophin: a second case. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **55**, 1094-1095.
13. Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Ghani, A. C., Woolhouse, M. E., Watt, C. J., and Anderson, R. M. (1997). The epidemiology of BSE in cattle herds in Great Britain. I. Epidemiological processes, demography of cattle and approaches to control by culling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **352**, 781-801.
14. Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J., and Hill, A. F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* **383**, 685-690.
15. Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J., and Lantos, P. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**, 448-50, 526.
16. Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., and Bostock, C. J. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**, 498-501.
17. Collinge, J. (1999). Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **354**, 317-323.
18. Collinge, J., Whitfield, J., McKintosh, E., Beck, J., Mead, S., Thomas, D. J., and Alpers, M. P. (2006). Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet* **367**, 2068-2074.
19. Wroe, S. J., Pal, S., Siddique, D., Hyare, H., Macfarlane, R., Joiner, S., Linehan, J. M., Brandner, S., Wadsworth, J. D., Hewitt, P., and Collinge, J. (2006). Clinical

-
- presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet* **368**, 2061-2067.
20. Collinge, J. (1997). Human prion diseases and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1699-1705.
 21. Colchester, A. C. and Colchester, N. T. (2005). The origin of bovine spongiform encephalopathy: the human prion disease hypothesis. *Lancet* **366**, 856-861.
 22. Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A., and Clarke, M. C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**, 764-766.
 23. Alper, T., Haig, D. A., and Clarke, M. C. (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **22**, 278-284.
 24. Griffith, J. S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature* **215**, 1043-1044.
 25. Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-144.
 26. Bolton, D. C., McKinley, M. P., and Prusiner, S. B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**, 1309-1311.
 27. Gabizon, R., McKinley, M. P., Groth, D., and Prusiner, S. B. (1988). Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 6617-6621.
 28. Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E., and . (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**, 735-746.
 29. Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J. M., and . (1985). Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* **315**, 331-333.

-
30. Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., and . (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 10962-10966.
 31. Caughey, B. W., Dong, A., Bhat, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F., and Caughey, W. S. (1991). Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* **30**, 7672-7680.
 32. Bolton, D. C., McKinley, M. P., and Prusiner, S. B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**, 1309-1311.
 33. Rubenstein, R., Kasczak, R. J., Merz, P. A., Papini, M. C., Carp, R. I., Robakis, N. K., and Wisniewski, H. M. (1986). Detection of scrapie-associated fibril (SAF) proteins using anti-SAF antibody in non-purified tissue preparations. *J. Gen. Virol.* **67 (Pt 4)**, 671-681.
 34. Rubenstein, R., Merz, P. A., Kasczak, R. J., Carp, R. I., Scalici, C. L., Fama, C. L., and Wisniewski, H. M. (1987). Detection of scrapie-associated fibrils (SAF) and SAF proteins from scrapie-affected sheep. *J. Infect. Dis.* **156**, 36-42.
 35. Somerville, R. A., Merz, P. A., and Carp, R. I. (1986). Partial copurification of scrapie-associated fibrils and scrapie infectivity. *Intervirology* **25**, 48-55.
 36. Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Bolton, D. C., Bendheim, P. E., Groth, D. F., and Glenner, G. G. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* **35**, 349-358.
 37. McKinley, M. P., Braunfeld, M. B., Bellinger, C. G., and Prusiner, S. B. (1986). Molecular characteristics of prion rods purified from scrapie-infected hamster brains. *J. Infect. Dis.* **154**, 110-120.

-
38. McKinley, M. P., Meyer, R. K., Kenaga, L., Rahbar, F., Cotter, R., Serban, A., and Prusiner, S. B. (1991). Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis. *J. Virol.* **65**, 1340-1351.
 39. Come, J. H., Fraser, P. E., and Lansbury, P. T., Jr. (1993). A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 5959-5963.
 40. Legname, G., Baskakov, I. V., Nguyen, H. O., Riesner, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (2004). Synthetic mammalian prions. *Science* **305**, 673-676.
 41. Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D. F., McKinley, M. P., Prusiner, S. B., and Weissmann, C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**, 417-428.
 42. Mahal, S. P., Asante, E. A., Antoniou, M., and Collinge, J. (2001). Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene* **268**, 105-114.
 43. Lehmann, S. (2002). Metal ions and prion diseases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 187-192.
 44. Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., and Kretzschmar, H. (1997). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**, 684-687.
 45. Garnett, A. P. and Viles, J. H. (2003). Copper binding to the octarepeats of the prion protein. Affinity, specificity, folding, and cooperativity: insights from circular dichroism. *J. Biol. Chem.* **278**, 6795-6802.
 46. Jones, C. E., Klewpatinond, M., Abdelraheim, S. R., Brown, D. R., and Viles, J. H. (2005). Probing copper²⁺ binding to the prion protein using diamagnetic

-
- nickel²⁺ and ¹H NMR: the unstructured N terminus facilitates the coordination of six copper²⁺ ions at physiological concentrations. *J. Mol. Biol.* **346**, 1393-1407.
47. Waggoner, D. J., Drisaldi, B., Bartnikas, T. B., Casareno, R. L., Prohaska, J. R., Gitlin, J. D., and Harris, D. A. (2000). Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J. Biol. Chem.* **275**, 7455-7458.
 48. Hutter, G., Heppner, F. L., and Aguzzi, A. (2003). No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo. *Biol. Chem.* **384**, 1279-1285.
 49. Wegner, C., Romer, A., Schmalzbauer, R., Lorenz, H., Windl, O., and Kretzschmar, H. A. (2002). Mutant prion protein acquires resistance to protease in mouse neuroblastoma cells. *J. Gen. Virol.* **83**, 1237-1245.
 50. Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O., and Tagliavini, F. (1993). Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* **362**, 543-546.
 51. Endo, T., Groth, D., Prusiner, S. B., and Kobata, A. (1989). Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* **28**, 8380-8388.
 52. Haraguchi, T., Fisher, S., Olofsson, S., Endo, T., Groth, D., Tarentino, A., Borchelt, D. R., Teplow, D., Hood, L., Burlingame, A., and . (1989). Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**, 1-13.
 53. Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K., and Prusiner, S. B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **51**, 229-240.
 54. Kooyman, D. L., Byrne, G. W., and Logan, J. S. (1998). Glycosyl phosphatidylinositol anchor. *Exp. Nephrol.* **6**, 148-151.

-
55. Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., and Wuthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* **382**, 180-182.
 56. Wuthrich, K. and Riek, R. (2001). Three-dimensional structures of prion proteins. *Adv. Protein Chem.* **57**, 55-82.
 57. Knaus, K. J., Morillas, M., Swietnicki, W., Malone, M., Surewicz, W. K., and Yee, V. C. (2001). Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 770-774.
 58. Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez, G. F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G., and Wuthrich, K. (2000). NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 145-150.
 59. Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R., and Wuthrich, K. (1997). NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett.* **413**, 282-288.
 60. Lopez, G. F., Zahn, R., Riek, R., and Wuthrich, K. (2000). NMR structure of the bovine prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 8334-8339.
 61. Donne, D. G., Viles, J. H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Wright, P. E., and Dyson, H. J. (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 13452-13457.
 62. Hornemann, S., Korth, C., Oesch, B., Riek, R., Wider, G., Wuthrich, K., and Glockshuber, R. (1997). Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization. *FEBS Lett.* **413**, 277-281.
 63. Aguzzi, A. and Polymenidou, M. (2004). Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* **116**, 313-327.

-
64. Ford, M. J., Burton, L. J., Morris, R. J., and Hall, S. M. (2002). Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience* **113**, 177-192.
 65. Herms, J., Tings, T., Gall, S., Madlung, A., Giese, A., Siebert, H., Schurmann, P., Windl, O., Brose, N., and Kretzschmar, H. (1999). Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J. Neurosci.* **19**, 8866-8875.
 66. Moser, M., Colello, R. J., Pott, U., and Oesch, B. (1995). Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* **14**, 509-517.
 67. Borchelt, D. R., Scott, M., Taraboulos, A., Stahl, N., and Prusiner, S. B. (1990). Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J. Cell Biol.* **110**, 743-752.
 68. Harris, D. A. (2001). Biosynthesis and cellular processing of the prion protein. *Adv. Protein Chem.* **57**, 203-228.
 69. Pauly, P. C. and Harris, D. A. (1998). Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 33107-33110.
 70. Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M., and Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**, 577-582.
 71. Aguzzi, A. and Heikenwalder, M. (2003). Prion diseases: Cannibals and garbage piles. *Nature* **423**, 127-129.
 72. Mallucci, G. R., Ratte, S., Asante, E. A., Linehan, J., Gowland, I., Jefferys, J. G., and Collinge, J. (2002). Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J.* **21**, 202-210.
 73. Steele, A. D., Emsley, J. G., Ozdinler, P. H., Lindquist, S., and Macklis, J. D. (2006). Prion protein (PrP^c) positively regulates neural precursor proliferation

-
- during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 3416-3421.
74. Hetz, C., Maundrell, K., and Soto, C. (2003). Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? *Trends Mol. Med.* **9**, 237-243.
75. Taylor, J. P., Hardy, J., and Fischbeck, K. H. (2002). Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* **296**, 1991-1995.
76. Spielhauer, C. and Schatzl, H. M. (2001). PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **276**, 44604-44612.
77. Jackson, G. S., Murray, I., Hosszu, L. L., Gibbs, N., Waltho, J. P., Clarke, A. R., and Collinge, J. (2001). Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 8531-8535.
78. Viles, J. H., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Goodin, D. B., Wright, P. E., and Dyson, H. J. (1999). Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 2042-2047.
79. Harris, D. A. (1999). Cellular biology of prion diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 429-444.
80. Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Groth, D. F., Bowman, K. A., Mock, N. I., Cochran, S. P., and Masiarz, F. R. (1981). Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **78**, 6675-6679.
81. Meyer, R. K., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Braunfeld, M. B., Barry, R. A., and Prusiner, S. B. (1986). Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**, 2310-2314.
82. Wille, H. and Prusiner, S. B. (1999). Ultrastructural studies on scrapie prion protein crystals obtained from reverse micellar solutions. *Biophys. J.* **76**, 1048-1062.

-
83. Wille, H., Michelitsch, M. D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F. E., Agard, D. A., and Prusiner, S. B. (2002). Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 3563-3568.
 84. Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B., and Cohen, F. E. (2004). Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 8342-8347.
 85. DeMarco, M. L. and Daggett, V. (2004). From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 2293-2298.
 86. Armen, R. S., DeMarco, M. L., Alonso, D. O., and Daggett, V. (2004). Pauling and Corey's alpha-pleated sheet structure may define the prefibrillar amyloidogenic intermediate in amyloid disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 11622-11627.
 87. Langedijk, J. P., Fuentes, G., Boshuizen, R., and Bonvin, A. M. (2006). Two-rung model of a left-handed beta-helix for prions explains species barrier and strain variation in transmissible spongiform encephalopathies. *J. Mol. Biol.* **360**, 907-920.
 88. DeMarco, M. L., Silveira, J., Caughey, B., and Daggett, V. (2006). Structural properties of prion protein protofibrils and fibrils: an experimental assessment of atomic models. *Biochemistry* **45**, 15573-15582.
 89. Carulla, N., Caddy, G. L., Hall, D. R., Zurdo, J., Gairi, M., Feliz, M., Giralt, E., Robinson, C. V., and Dobson, C. M. (2005). Molecular recycling within amyloid fibrils. *Nature* **436**, 554-558.
 90. Sawaya, M. R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M. I., Sievers, S. A., Apostol, M. I., Thompson, M. J., Balbirnie, M., Wiltzius, J. J., McFarlane, H. T.,

-
- Madsen, A. O., Riekel, C., and Eisenberg, D. (2007). Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* **447**, 453-457.
91. Onisko, B., Fernandez, E. G., Freire, M. L., Schwarz, A., Baier, M., Camina, F., Garcia, J. R., Rodriguez-Segade, V. S., and Requena, J. R. (2005). Probing PrPSc structure using chemical cross-linking and mass spectrometry: evidence of the proximity of Gly90 amino termini in the PrP 27-30 aggregate. *Biochemistry* **44**, 10100-10109.
92. Anderson, M., Bocharova, O. V., Makarava, N., Breydo, L., Salnikov, V. V., and Baskakov, I. V. (2006). Polymorphism and ultrastructural organization of prion protein amyloid fibrils: an insight from high resolution atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* **358**, 580-596.
93. Tattum, M. H., Cohen-Krausz, S., Thumanu, K., Wharton, C. W., Khalili-Shirazi, A., Jackson, G. S., Orlova, E. V., Collinge, J., Clarke, A. R., and Saibil, H. R. (2006). Elongated oligomers assemble into mammalian PrP amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* **357**, 975-985.
94. Cobb, N. J., Sonnichsen, F. D., McHaourab, H., and Surewicz, W. K. (2007). Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register beta-structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 18946-18951.
95. Apetri, A. C., Vanik, D. L., and Surewicz, W. K. (2005). Polymorphism at residue 129 modulates the conformational conversion of the D178N variant of human prion protein 90-231. *Biochemistry* **44**, 15880-15888.
96. Wasmer, C., Lange, A., Van Melckebeke, H., Siemer, A. B., Riek, R., and Meier, B. H. (2008). Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science* **319**, 1523-1526.
97. Weissmann, C. (1991). A 'unified theory' of prion propagation. *Nature* **352**, 679-683.

-
98. Cohen, F. E. and Prusiner, S. B. (1998). Pathologic conformations of prion proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 793-819.
 99. Caughey, B., Kocisko, D. A., Raymond, G. J., and Lansbury, P. T., Jr. (1995). Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem. Biol.* **2**, 807-817.
 100. Bruce, M. E. and Fraser, H. (1991). Scrapie strain variation and its implications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **172**, 125-138.
 101. Bruce, M. E. (1993). Scrapie strain variation and mutation. *Br. Med. Bull.* **49**, 822-838.
 102. Bessen, R. A. and Marsh, R. F. (1994). Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J. Virol.* **68**, 7859-7868.
 103. Bessen, R. A. and Marsh, R. F. (1992). Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J. Virol.* **66**, 2096-2101.
 104. Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (1998). Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat. Med.* **4**, 1157-1165.
 105. Caughey, B., Raymond, G. J., and Bessen, R. A. (1998). Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 32230-32235.
 106. Thomzig, A., Spasov, S., Friedrich, M., Naumann, D., and Beekes, M. (2004). Discriminating scrapie and bovine spongiform encephalopathy isolates by infrared spectroscopy of pathological prion protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 33847-33854.

-
107. Tanaka, M., Chien, P., Naber, N., Cooke, R., and Weissman, J. S. (2004). Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature* **428**, 323-328.
 108. Tanaka, M., Chien, P., Yonekura, K., and Weissman, J. S. (2005). Mechanism of cross-species prion transmission: an infectious conformation compatible with two highly divergent yeast prion proteins. *Cell* **121**, 49-62.
 109. Bruce, M. E. (2003). TSE strain variation. *Br. Med. Bull.* **66**, 99-108.
 110. Bruce, M., Chree, A., McConnell, I., Foster, J., Pearson, G., and Fraser, H. (1994). Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **343**, 405-411.
 111. Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Miranda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D., Carlson, G. A., and . (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* **63**, 673-686.
 112. Collinge, J., Palmer, M. S., and Dryden, A. J. (1991). Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **337**, 1441-1442.
 113. Palmer, M. S., Dryden, A. J., Hughes, J. T., and Collinge, J. (1991). Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* **352**, 340-342.
 114. Collinge, J., Palmer, M. S., Sidle, K. C., Hill, A. F., Gowland, I., Meads, J., Asante, E., Bradley, R., Doey, L. J., and Lantos, P. L. (1995). Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. *Nature* **378**, 779-783.
 115. Collinge, J. and Clarke, A. R. (2007). A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science* **318**, 930-936.

-
116. Jones, E. M. and Surewicz, W. K. (2005). Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids. *Cell* **121**, 63-72.
117. Espinosa, J. C., Andreoletti, O., Castilla, J., Herva, M. E., Morales, M., Alamillo, E., San Segundo, F. D., Lacroux, C., Lugan, S., Salguero, F. J., Langeveld, J., and Torres, J. M. (2007). Sheep-passaged bovine spongiform encephalopathy agent exhibits altered pathobiological properties in bovine-PrP transgenic mice. *J. Virol.* **81**, 835-843.
118. Hill, A. F., Joiner, S., Linehan, J., Desbruslais, M., Lantos, P. L., and Collinge, J. (2000). Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 10248-10253.
119. Race, R. and Chesebro, B. (1998). Scrapie infectivity found in resistant species. *Nature* **392**, 770.
120. Race, R., Raines, A., Raymond, G. J., Caughey, B., and Chesebro, B. (2001). Long-term subclinical carrier state precedes scrapie replication and adaptation in a resistant species: analogies to bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *J. Virol.* **75**, 10106-10112.
121. Race, R., Meade-White, K., Raines, A., Raymond, G. J., Caughey, B., and Chesebro, B. (2002). Subclinical scrapie infection in a resistant species: persistence, replication, and adaptation of infectivity during four passages. *J. Infect. Dis.* **186 Suppl 2**, S166-S170.
122. Saborio, G. P., Permanne, B., and Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* **411**, 810-813.
123. Soto, C., Saborio, G. P., and Anderes, L. (2002). Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends Neurosci.* **25**, 390-394.

-
124. Tzaban, S., Friedlander, G., Schonberger, O., Horonchik, L., Yedidia, Y., Shaked, G., Gabizon, R., and Taraboulos, A. (2002). Protease-sensitive scrapie prion protein in aggregates of heterogeneous sizes. *Biochemistry* **41**, 12868-12875.
 125. Prusiner, S. B., Garfin, D. E., Cochran, S. P., McKinley, M. P., Groth, D. F., Hadlow, W. J., Race, R. E., and Eklund, C. M. (1980). Experimental scrapie in the mouse: electrophoretic and sedimentation properties of the partially purified agent. *J. Neurochem.* **35**, 574-582.
 126. Prusiner, S. B., Groth, D. F., Bildstein, C., Masiarz, F. R., McKinley, M. P., and Cochran, S. P. (1980). Electrophoretic properties of the scrapie agent in agarose gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **77**, 2984-2988.
 127. Bellinger-Kawahara, C. G., Kempner, E., Groth, D., Gabizon, R., and Prusiner, S. B. (1988). Scrapie prion liposomes and rods exhibit target sizes of 55,000 Da. *Virology* **164**, 537-541.
 128. Lasmezas, C. I., Deslys, J. P., Robain, O., Jaegly, A., Beringue, V., Peyrin, J. M., Fournier, J. G., Hauw, J. J., Rossier, J., and Dormont, D. (1997). Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* **275**, 402-405.
 129. Serban, D., Taraboulos, A., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1990). Rapid detection of Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prion proteins. *Neurology* **40**, 110-117.
 130. Huang, Z., Prusiner, S. B., and Cohen, F. E. (1995). Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Fold. Des* **1**, 13-19.
 131. Shaked, G. M., Friedlander, G., Meiner, Z., Taraboulos, A., and Gabizon, R. (1999). Protease-resistant and detergent-insoluble prion protein is not necessarily associated with prion infectivity. *J. Biol. Chem.* **274**, 17981-17986.

-
132. Chiesa, R., Piccardo, P., Quaglio, E., Drisaldi, B., Si-Hoe, S. L., Takao, M., Ghetti, B., and Harris, D. A. (2003). Molecular distinction between pathogenic and infectious properties of the prion protein. *J. Virol.* **77**, 7611-7622.
133. Safar, J. G., Geschwind, M. D., Deering, C., Didorenko, S., Sattavat, M., Sanchez, H., Serban, A., Vey, M., Baron, H., Giles, K., Miller, B. L., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (2005). Diagnosis of human prion disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 3501-3506.
134. Hartley, D. M., Walsh, D. M., Ye, C. P., Diehl, T., Vasquez, S., Vassilev, P. M., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1999). Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J. Neurosci.* **19**, 8876-8884.
135. Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M., and Stefani, M. (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* **416**, 507-511.
136. Kaye, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., and Glabe, C. G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* **300**, 486-489.
137. Caughey, B. and Lansbury, P. T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 267-298.
138. Wille, H., Zhang, G. F., Baldwin, M. A., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (1996). Separation of scrapie prion infectivity from PrP amyloid polymers. *J. Mol. Biol.* **259**, 608-621.
139. Silveira, J. R., Raymond, G. J., Hughson, A. G., Race, R. E., Sim, V. L., Hayes, S. F., and Caughey, B. (2005). The most infectious prion protein particles. *Nature* **437**, 257-261.

-
140. Hubbard, S. J. (1998). The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1382**, 191-206.
 141. Fontana, A., Fassina, G., Vita, C., Dalzoppo, D., Zamai, M., and Zambonin, M. (1986). Correlation between sites of limited proteolysis and segmental mobility in thermolysin. *Biochemistry* **25**, 1847-1851.
 142. Fontana, A., Polverino, d. L., De, F., V, Scaramella, E., and Zambonin, M. (1997). Probing the partly folded states of proteins by limited proteolysis. *Fold. Des* **2**, R17-R26.
 143. Fontana, A., Zambonin, M., Polverino, d. L., De, F., V, Clementi, A., and Scaramella, E. (1997). Probing the conformational state of apomyoglobin by limited proteolysis. *J. Mol. Biol.* **266**, 223-230.
 144. Fontana, A., de Laureto, P. P., Spolaore, B., Frare, E., Picotti, P., and Zambonin, M. (2004). Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim. Pol.* **51**, 299-321.
 145. Jacobson, G. R., Schaffer, M. H., Stark, G. R., and Vanaman, T. C. (1973). Specific chemical cleavage in high yield at the amino peptide bonds of cysteine and cystine residues. *J. Biol. Chem.* **248**, 6583-6591.
 146. Bahler, M., Benfenati, F., Valtorta, F., Czernik, A. J., and Greengard, P. (1989). Characterization of synapsin I fragments produced by cysteine-specific cleavage: a study of their interactions with F-actin. *J. Cell Biol.* **108**, 1841-1849.
 147. Kimberlin, R. H. and Walker, C. A. (1978). Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture. *J. Gen. Virol.* **39**, 487-496.
 148. Bessen, R. A. and Marsh, R. F. (1992). Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *J. Gen. Virol.* **73 (Pt 2)**, 329-334.

-
149. Kaye, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., and Glabe, C. G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* **300**, 486-489.
 150. O'Nuallain, B. and Wetzel, R. (2002). Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 1485-1490.
 151. Williamson, R. A., Peretz, D., Pinilla, C., Ball, H., Bastidas, R. B., Rozenshteyn, R., Houghten, R. A., Prusiner, S. B., and Burton, D. R. (1998). Mapping the prion protein using recombinant antibodies. *J. Virol.* **72**, 9413-9418.
 152. Nakamura, K., Tanaka, T., Kuwahara, A., and Takeo, K. (1985). Microassay for proteins on nitrocellulose filter using protein dye-staining procedure. *Anal. Biochem.* **148**, 311-319.
 153. Bolton, D. C., Bendheim, P. E., Marmorstein, A. D., and Potempa, A. (1987). Isolation and structural studies of the intact scrapie agent protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **258**, 579-590.
 154. Caughey, B., Raymond, G. J., Priola, S. A., Kocisko, D. A., Race, R. E., Bessen, R. A., Lansbury, P. T., Jr., and Chesebro, B. (1999). Methods for studying prion protein (PrP) metabolism and the formation of protease-resistant PrP in cell culture and cell-free systems. An update. *Mol. Biotechnol.* **13**, 45-55.
 155. Diring, H., Beekes, M., Ozel, M., Simon, D., Queck, I., Cardone, F., Pocchiari, M., and Ironside, J. W. (1997). Highly infectious purified preparations of disease-specific amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleic acids of viral size. *Intervirology* **40**, 238-246.
 156. Nakamura, K., Tanaka, T., Kuwahara, A., and Takeo, K. (1985). Microassay for proteins on nitrocellulose filter using protein dye-staining procedure. *Anal. Biochem.* **148**, 311-319.

-
157. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
 158. Serban, D., Taraboulos, A., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1990). Rapid detection of Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prion proteins. *Neurology* **40**, 110-117.
 159. Saa, P., Castilla, J., and Soto, C. (2005). Cyclic amplification of protein misfolding and aggregation. *Methods Mol. Biol.* **299**, 53-65.
 160. Kaye, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., and Glabe, C. G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* **300**, 486-489.
 161. O'Nuallain, B. and Wetzel, R. (2002). Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 1485-1490.
 162. Bolton, D. C., Bendheim, P. E., Marmorstein, A. D., and Potempska, A. (1987). Isolation and structural studies of the intact scrapie agent protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **258**, 579-590.
 163. Diringer, H., Beekes, M., Ozel, M., Simon, D., Queck, I., Cardone, F., Pocchiari, M., and Ironside, J. W. (1997). Highly infectious purified preparations of disease-specific amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleic acids of viral size. *Intervirology* **40**, 238-246.
 164. Nakamura, K., Tanaka, T., Kuwahara, A., and Takeo, K. (1985). Microassay for proteins on nitrocellulose filter using protein dye-staining procedure. *Anal. Biochem.* **148**, 311-319.
 165. Beekes, M., Baldauf, E., Cassens, S., Diringer, H., Keyes, P., Scott, A. C., Wells, G. A., Brown, P., Gibbs, C. J., Jr., and Gajdusek, D. C. (1995). Western blot mapping of disease-specific amyloid in various animal species and humans with

-
- transmissible spongiform encephalopathies using a high-yield purification method. *J. Gen. Virol.* **76 (Pt 10)**, 2567-2576.
166. Riesner, D., Kellings, K., Post, K., Wille, H., Serban, H., Groth, D., Baldwin, M. A., and Prusiner, S. B. (1996). Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high alpha-helical content and lacking scrapie infectivity. *J. Virol.* **70**, 1714-1722.
167. Prusiner, S. B., Cochran, S. P., Groth, D. F., Downey, D. E., Bowman, K. A., and Martinez, H. M. (1982). Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann. Neurol.* **11**, 353-358.
168. Kocisko, D. A., Lansbury, P. T., Jr., and Caughey, B. (1996). Partial unfolding and refolding of scrapie-associated prion protein: evidence for a critical 16-kDa C-terminal domain. *Biochemistry* **35**, 13434-13442.
169. Tang, H. Y. and Speicher, D. W. (2004). Identification of alternative products and optimization of 2-nitro-5-thiocyanatobenzoic acid cyanylation and cleavage at cysteine residues. *Anal. Biochem.* **334**, 48-61.
170. Nguyen, J. T., Inouye, H., Baldwin, M. A., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., and Kirschner, D. A. (1995). X-ray diffraction of scrapie prion rods and PrP peptides. *J. Mol. Biol.* **252**, 412-422.
171. Kaye, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., and Glabe, C. G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* **300**, 486-489.
172. O'Nuallain, B. and Wetzel, R. (2002). Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 1485-1490.
173. Wille, H., Zhang, G. F., Baldwin, M. A., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (1996). Separation of scrapie prion infectivity from PrP amyloid polymers. *J. Mol. Biol.* **259**, 608-621.

-
174. Everest, S. J., Thorne, L., Barnicle, D. A., Edwards, J. C., Elliott, H., Jackman, R., and Hope, J. (2006). Atypical prion protein in sheep brain collected during the British scrapie-surveillance programme. *J. Gen. Virol.* **87**, 471-477.
175. Thackray, A. M., Hopkins, L., and Bujdoso, R. (2007). Proteinase K-sensitive disease-associated ovine prion protein revealed by conformation-dependent immunoassay. *Biochem. J.* **401**, 475-483.
176. Benestad, S. L., Arsac, J. N., Goldmann, W., and Noremark, M. (2008). Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet. Res.* **39**, 19.
177. Brown, P., Gibbs, C. J., Jr., Rodgers-Johnson, P., Asher, D. M., Sulima, M. P., Bacote, A., Goldfarb, L. G., and Gajdusek, D. C. (1994). Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann. Neurol.* **35**, 513-529.
178. Hegde, R. S., Mastrianni, J. A., Scott, M. R., DeFea, K. A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., and Lingappa, V. R. (1998). A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* **279**, 827-834.
179. Caughey, B. (2003). Prion protein conversions: insight into mechanisms, TSE transmission barriers and strains. *Br. Med. Bull.* **66**, 109-120.
180. Bartz, J. C., Bessen, R. A., McKenzie, D., Marsh, R. F., and Aiken, J. M. (2000). Adaptation and selection of prion protein strain conformations following interspecies transmission of transmissible mink encephalopathy. *J. Virol.* **74**, 5542-5547.
181. Zou, W. Q., Capellari, S., Parchi, P., Sy, M. S., Gambetti, P., and Chen, S. G. (2003). Identification of novel proteinase K-resistant C-terminal fragments of PrP in Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Biol. Chem.* **278**, 40429-40436.

-
182. Bocharova, O. V., Breydo, L., Salnikov, V. V., Gill, A. C., and Baskakov, I. V. (2005). Synthetic prions generated in vitro are similar to a newly identified subpopulation of PrPSc from sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Protein Sci.* **14**, 1222-1232.
183. Zanusso, G., Farinazzo, A., Prelli, F., Fiorini, M., Gelati, M., Ferrari, S., Righetti, P. G., Rizzuto, N., Frangione, B., and Monaco, S. (2004). Identification of distinct N-terminal truncated forms of prion protein in different Creutzfeldt-Jakob disease subtypes. *J. Biol. Chem.* **279**, 38936-38942.
184. Bessen, R. A., Kocisko, D. A., Raymond, G. J., Nandan, S., Lansbury, P. T., and Caughey, B. (1995). Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* **375**, 698-700.
185. Ritter, C., Maddelein, M. L., Siemer, A. B., Luhrs, T., Ernst, M., Meier, B. H., Saupe, S. J., and Riek, R. (2005). Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion. *Nature* **435**, 844-848.
186. Shewmaker, F., Wickner, R. B., and Tycko, R. (2006). Amyloid of the prion domain of Sup35p has an in-register parallel beta-sheet structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 19754-19759.
187. Chan, J. C., Oyler, N. A., Yau, W. M., and Tycko, R. (2005). Parallel beta-sheets and polar zippers in amyloid fibrils formed by residues 10-39 of the yeast prion protein Ure2p. *Biochemistry* **44**, 10669-10680.
188. Petkova, A. T., Ishii, Y., Balbach, J. J., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Delaglio, F., and Tycko, R. (2002). A structural model for Alzheimer's beta - amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 16742-16747.
189. Luhrs, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Dobeli, H., Schubert, D., and Riek, R. (2005). 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 17342-17347.

-
190. Iwata, K., Fujiwara, T., Matsuki, Y., Akutsu, H., Takahashi, S., Naiki, H., and Goto, Y. (2006). 3D structure of amyloid protofilaments of beta2-microglobulin fragment probed by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 18119-18124.
191. Heise, H., Hoyer, W., Becker, S., Andronesi, O. C., Riedel, D., and Baldus, M. (2005). Molecular-level secondary structure, polymorphism, and dynamics of full-length alpha-synuclein fibrils studied by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 15871-15876.
192. Jimenez, J. L., Guijarro, J. I., Orlova, E., Zurdo, J., Dobson, C. M., Sunde, M., and Saibil, H. R. (1999). Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *EMBO J.* **18**, 815-821.
193. Del Mar, C., Greenbaum, E. A., Mayne, L., Englander, S. W., and Woods, V. L., Jr. (2005). Structure and properties of alpha-synuclein and other amyloids determined at the amino acid level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 15477-15482.
194. Wasmer, C., Lange, A., Van Melckebeke, H., Siemer, A. B., Riek, R., and Meier, B. H. (2008). Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science* **319**, 1523-1526.
195. Kaye, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., and Glabe, C. G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* **300**, 486-489.
196. O'Nuallain, B. and Wetzel, R. (2002). Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 1485-1490.

ANEXO I: Publicaciones derivadas

Isolation and Characterization of a Proteinase K-Sensitive PrP^{Sc} Fraction[†]

Miguel A. Pastrana,[‡] Gustavo Sajnani,[‡] Bruce Onisko,[§] Joaquín Castilla,^{||} Rodrigo Morales,^{||} Claudio Soto,^{||} and Jesús R. Requena^{*‡}

Prion Research Unit, Department of Medicine, School of Medicine, University of Santiago de Compostela, Rue de S. Francisco s/n, Santiago de Compostela, Galiza, Spain 15782, Western Regional Research Center, United States Department of Agriculture, Room 3124, 800 Buchanan Street, Albany, California 94710, and Department of Neurology, University of Texas Medical Branch, 301 University Boulevard, Galveston, Texas 77555

Received July 31, 2006; Revised Manuscript Received October 13, 2006

ABSTRACT: Recent studies have shown that a sizable fraction of PrP^{Sc} present in prion-infected tissues is, contrary to previous conceptions, sensitive to digestion by proteinase K (PK). This finding has important implications in the context of diagnosis of prion disease, as PK has been extensively used in attempts to distinguish between PrP^{Sc} and PrP^C. Even more importantly, PK-sensitive PrP^{Sc} (sPrP^{Sc}) might be essential to understand the process of conversion and aggregation of PrP^C leading to infectivity. We have isolated a fraction of sPrP^{Sc}. This material was obtained by differential centrifugation at an intermediate speed of Syrian hamster PrP^{Sc} obtained through a conventional procedure based on ultracentrifugation in the presence of detergents. PK-sensitive PrP^{Sc} is completely degraded under standard conditions (50 μg/mL of proteinase K at 37 °C for 1 h) and can also be digested with trypsin. Centrifugation in a sucrose gradient showed sPrP^{Sc} to correspond to the lower molecular weight fractions of the continuous range of oligomers that constitute PrP^{Sc}. PK-sensitive PrP^{Sc} has the ability to convert PrP^C into protease-resistant PrP^{Sc}, as assessed by the protein misfolding cyclic amplification assay (PMCA). Limited proteolysis of sPrP^{Sc} using trypsin allows for identification of regions that are particularly susceptible to digestion, i.e., are partially exposed and flexible; we have identified as such the regions around residues K110, R136, R151, K220, and R229. PK-sensitive PrP^{Sc} isolates should prove useful for structural studies to help understand fundamental issues of the molecular biology of PrP^{Sc} and in the quest to design tests to detect preclinical prion disease.

Since prions were defined as “proteinaceous infectious particles” and characterized as infectious agents composed almost exclusively of protein (1), substantial and diverse evidence has accumulated lending support to a stronger definition, according to which prions would be, in fact, infectious proteins (2–5). The prion protein, PrP,¹ is capable of adopting two basic conformations. Under the PrP^C form, it is a monomeric, glycosylated, α-helix-rich protein attached to cell membranes through a GPI anchor (2); in contrast, PrP^{Sc} appears as a β-sheet-rich, polymeric, insoluble molecule. PrP^{Sc} catalyzes the transformation of PrP^C into more PrP^{Sc} through a poorly characterized molecular mechanism (2, 3, 6). The structure of PrP^{Sc} is yet unknown, although several models have been proposed (7–9). These and future models need to conform to experimental constraints, such as those derived from electron micrographs of two-dimensional crystals of PrP^{Sc} (7, 10) or chemical cross-linking studies (11).

Traditionally, in the absence of definitive conformation-specific antibodies, and without structural data, PrP^{Sc} has been defined operationally by means of two physicochemical

characteristics that distinguish it from PrP^C: its resistance to proteinase K and its insolubility in detergents (2, 12). Thus, treatment of a sample with 50 μg/mL PK for 1 h at 37 °C completely destroys PrP^C; in contrast, PrP^{Sc} is partially resistant to this treatment, resulting in cleavage of the amino terminal portion of this molecule, leaving a PK-resistant core termed PrP 27–30, 60–70 residues shorter than PrP^{Sc}. In the presence of detergent, PrP 27–30 forms characteristic rod-shaped structures readily visible by transmission electron microscopy (13). The amino terminal stretch of PrP^C spanning from the amino terminus to about position 121 is highly disordered, as surmised from NMR studies of recombinant PrP in solution, and it has been proposed that part of that stretch, up to the PK-cut position, is also disordered in PrP^{Sc}.

With regard to the second operational method to define PrP^{Sc}, insolubility in detergent, high-speed centrifugation under “standard conditions” (100000g for 1 h at 4 °C) allows pelleting PrP^{Sc}, leaving PrP^C in the supernatant (12). Resistance to PK and insolubility under “standard conditions”, the two operational characteristics that define “*bona fide*” PrP^{Sc} (12), have been traditionally assumed to go hand in hand. Unexpectedly, more recent studies have revealed a more complex picture. Safar et al. first described the existence of a PK-sensitive fraction of PrP^{Sc} (14). These authors showed that denaturation with chaotropes enhances the immunoreactivity of PrP^{Sc} toward certain antibodies, a result of the uncovering of partially buried epitopes, which are equally available in native vs denatured PrP^C (14).

[†] This work was supported by research grants from the Spanish Ministry of Science and Technology (EET 2001-4861 to JRR) and the National Institutes of Health (NS049173 to CS).

* Corresponding author. Phone: +34-981-559904. Fax: +34-981-559904. E-mail: requenaj@usc.es.

[‡] University of Santiago de Compostela.

[§] United States Department of Agriculture.

^{||} University of Texas Medical Branch.

Intriguingly, pretreatment of samples with PK considerably weakens the denaturation-dependent immunoreactivity enhancement effect, indicating the existence of a subset of PrP^{Sc} molecules that are completely degraded by PK and that were termed, in accordance, PK-sensitive PrP^{Sc} (sPrP^{Sc}). Subsequent studies by Tzaban et al. showed that, when brain and cell homogenates from scrapie-infected animals and cultures were subjected to sucrose gradients, PrP distributed in a continuum of aggregation sizes. Although PrP^{Sc} is present in the more dense fractions, corresponding to larger polymers, and was PK-resistant, PrP^{Sc} recovered from intermediate fractions, corresponding to smaller oligomers, was not (12). In contrast, homogenates from control brains or cell cultures only contained PrP in the very light fractions, corresponding to monomeric or at the most, dimeric PrP (12). These results suggest that PrP^{Sc} is a heterogeneous collection of oligomers of different sizes and that resistance to PK is dependent, at least in part, on its quaternary structure.

More recent studies highlight the importance of sPrP^{Sc}; in a recent study, as much as 80% of PrP^{Sc} in the brains of individuals who had died as a consequence of Creutzfeldt–Jakob disease (CJD) was estimated to be sPrP^{Sc} (15). Because many methods rely on the use of PK to distinguish between PrP^{Sc} and PrP^C (2), a considerable underestimation of the amount of PrP^{Sc} present in samples might be expected. This would be of particular importance in the quest to develop analytical methods to detect minute amounts of PrP^{Sc} in biological fluids such as blood, which could constitute the basis of a preclinical prion test. Beyond this practical consideration, sPrP^{Sc} might hold important clues on the structure of PrP^{Sc} and the process that leads to its generation and propagation.

We reasoned that, starting from a sample of PrP^{Sc} isolated through standard procedures that rely on ultracentrifugation in the presence of detergent, it would be possible to isolate a lighter fraction of smaller PrP^{Sc} oligomers that would remain in the supernatant at lower centrifugal forces. On the basis of Tzaban's results, we also reasoned that such smaller oligomers of PrP^{Sc} would be more sensitive to the effect of PK. Thus, by operationally adjusting our experimental conditions, one would possibly be able to obtain a fraction of sPrP^{Sc}. We describe here the isolation of such a fraction and its further characterization and introduce its possible use for structural studies.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Isolation of PrP^{Sc}. PrP^{Sc} was isolated from brains of terminally ill Syrian hamsters infected with the 263K strain of scrapie, using a slightly modified version of the procedure of Diringier et al. (16). This procedure involves low-speed centrifugation of a 10% brain homogenate in 10% sarkosyl to remove cell debris and centrifugation of the supernatant

at high speed (g_{av} 149008g) through a sucrose cushion. The pellet is resuspended in 0.1% of Z-3,14 detergent (*N*-tetradecyl-*N,N*-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulphonate, Boehringer Mannheim, Germany) and subjected to three additional cycles of pelleting at 149008g through sucrose cushions, followed by resuspension, first in this detergent, and later in deionized water at pH 8.5. Our modifications of the method consisted of inclusion of a cocktail of protease inhibitors (Complete, Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) at a final concentration of 1X in all buffers used throughout the procedure up to the penultimate pellet, P145c, as defined in the mentioned study (16), which was resuspended, as described, in 20 mM Tris/HCl, pH 8.5 buffer (T8.5) not supplemented with the protease inhibitor cocktail. Also, treatment with PK of this fraction was omitted. The final pellet was resuspended in T8.5 containing 1% sarkosyl and no protease inhibitors at concentrations between 1 and 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ by application of three to four 1 s pulses at an amplitude of 50% with a 4710 series probe ultrasonics homogenizer (Cole Parmer, Chicago, IL). The stock suspension thus prepared was frozen until further use; its purity was assessed by SDS-PAGE with Coomassie blue staining and MALDI and estimated to be approximately 80–85%. Several methods, all based on the same principle (pelleting in the presence of detergents) with minor variations in the number of centrifugation steps, centrifugation times, composition of buffers, etc., have been described to isolate PrP^{Sc} (17,18). Of note is that, when a control brain homogenate is subjected to the same procedure, no PrP is found in the pellets (Figure S1 in the Supporting Information and ref 17). Concentration of PrP^{Sc} was estimated by comparison of serial dilutions of this material with serial dilutions of a recombinant Syrian hamster, SHaPrP (90–231), standard, a generous gift of Giuseppe Legname, UCSF, on dot blots stained with Amido Black (19).

Isolation of sPrP^{Sc}. sPrP^{Sc} was isolated from total PrP^{Sc} by ultracentrifugation at an intermediate speed. A 50–150 μL portion of the PrP^{Sc} stock suspension (see above) was homogenized by application of three to four sonication pulses of 1 s each, as described above, and spun in a TLX ultracentrifuge (Beckman, Fullerton, CA) using a TLA-120-1 rotor at 40 000 rpm (g_{av} 56806g) for 2 h at 20 °C. The supernatant, corresponding to sPrP^{Sc} (see below), was collected, and the pellet was resuspended by brief sonication in a volume of T8.5 containing 1% sarkosyl equivalent to that of the supernatant. Fractions of supernatant and pellet were treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PK at 37 °C for 1 h; the reaction was terminated with 2 M Pefabloc (Fluka, St. Louis, MO) and a fraction subjected to SDS-PAGE (20) and either stained with Coomassie blue or transferred to a PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA) and analyzed by Western blotting using mAbs 3F4 (Dako, Glostrup, Denmark) or 6H4 (Prionics, Zurich, Switzerland) at 1:5000 and 1:2000 dilutions, respectively.

Conformation-Dependent Immunoreactivity. To measure the dependence of the immunoreactivity of sPrP^{Sc} and rPrP^{Sc} on protein denaturation, we used the dot blot procedure described by Serban et al. (21). Samples were diluted with deionized water to an approximate concentration of 12.5 ng/ μL , and 2 μL of each sample was spotted on a dry nitrocellulose membrane. The dots were thoroughly air-dried. The membranes were then washed extensively with PBS

¹ Abbreviations: CB, conversion buffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 4 mM EDTA, complete 1X in PBS); CJD, Creutzfeldt–Jakob disease; GPI, glycosylinositol phospholipid; PBS, phosphate buffered saline; NBH, normal brain homogenate; PMCA, protein misfolding cyclic amplification; PK, proteinase K; PrP, prion protein; PrP^C, cellular prion protein isoform; PrP^{Sc}, scrapie prion protein isoform; sPrP^{Sc}, PK-sensitive PrP^{Sc}; rPrP^{Sc}, PK-resistant PrP^{Sc}; TIC, total ion current; TNS, 10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% sarkosyl buffer; TSEs, transmissible spongiform encephalopathies; T8.5, 20mM Tris/HCl, pH 8.5 buffer; XIC, extracted ion chromatogram.

containing 0.3% Tween-20 and incubated for 10 min at room temperature in PBS with or without 4 M guanidinium hydrochloride; after thorough washing in PBS containing 0.3% Tween-20, the membrane was probed with mAb 3F4. Signal intensities were quantitated using the LabWorks 3.0 image analysis software (UVP, Cambridge, U.K.). Conformation dependence was calculated for each sample (N) as

$$Y(N) = I_{(N,0M)} / I_{(N,4M)}$$

where $I_{(N,0M)} / I_{(N,4M)}$ are, respectively, blot signal intensities of a given sample with and without 4 M guanidine hydrochloride treatment.

Velocity Sedimentation in Sucrose Gradients. Samples of sPrP^{Sc} or rPrP^{Sc}, ~2.5 μ g, were diluted in 1.2 mL of 10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 1% sarkosyl (TNS) and loaded on top of 10–60% sucrose step gradients (12). Gradients were formed in polyallomer (11 \times 34 mm) tubes from 600 μ L of each of the following sucrose concentrations: 10, 15, 20, 25, 30, and 60% in water. The gradients were spun for 1 h at 4 $^{\circ}$ C at 50 000 rpm (g_{av} 200620g) in a MLS-50 rotor in a Biosafe Optima MAX ultracentrifuge (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Twelve 300 μ L fractions, following the load volume, were collected starting from the top of the tube; fraction 12 included the pellet.

PMCA. Different fractions obtained from the sucrose gradient sedimentation experiment were diluted with a minimal amount of conversion buffer (CB), consisting of PBS containing 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 4 mM EDTA, and Complete 1X to obtain samples of a similar PrP concentration, as determined by Western blot. These samples were serially diluted in NBH (10% normal brain homogenate) prepared in CB from 1/20 to 1/320 (final volume 100 μ L). From each final dilution, 18 μ L aliquots were immediately withdrawn and frozen at -80° C (control samples); the remaining 82 μ L portions were subjected to PMCA amplification (22–24) in 0.2 mL PCR polypropylene tubes (Fisher Scientific, Hampton, NH). Tubes were inserted in an adaptor and placed on the plate holder of a microsonicator (Misonix Model 3000, Farmingdale, NY); the plate was then placed in the water bath of the sonicator and incubated without shaking. The sonicator was programmed to perform incubation cycles of 30 min at 37 $^{\circ}$ C followed by a 20 s pulse of sonication at 60–80% potency for 48 h. Amplified and control samples were incubated with 50 μ g/mL of PK for 60 min at 37 $^{\circ}$ C; the digestion reaction was stopped by addition of Laemmli electrophoresis buffer and boiling. Samples were subjected to SDS-PAGE and Western blotting, as described above. In parallel experiments, sPrP^{Sc} was treated with PK or buffer for 60 min at 37 $^{\circ}$ C and then diluted in CB as appropriate and subjected to PMCA.

Limited Proteolysis. sPrP^{Sc} (~3.5 μ g) was treated with trypsin (Promega, Madison, WI) in T8.5 (final volume 10 μ L) at 37 $^{\circ}$ C for 1 h at the indicated enzyme/substrate ratios (figure legends). SHAPrP (90–231), kept at -70° C in 6M guanidine hydrochloride, was freshly refolded in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, extensively dialyzed against the same buffer, and treated with trypsin in a similar way. Reactions were stopped with Complete (Roche) and reaction mixtures analyzed by Western blot. Alternatively, samples were denatured by addition of solid guanidine hydrochloride to a final concentration of 6 M, acidified with 10%

trifluoroacetic anhydride, and adsorbed to C-18 ZipTips (Millipore). Peptides were eluted according to the manufacturer's instructions and dried by centrifugal evaporation (SpeedVac, Savant, Farmingdale, NY). For analysis by nanospray LC/MS/MS, samples were redissolved in 40 μ L of 6 M guanidine hydrochloride.

Nanospray LC/MS/MS. NanoLC–ESI–MS–MS was done with an Applied Biosystems (ABI/MDS Sciex, Toronto, Canada) model QStar Pulsar equipped with a Proxeon Biosystems (Odense, Denmark) nanoelectrospray source. Redissolved trypsin digests (20 μ L) were loaded automatically onto a C-18 trap cartridge, and after washing, the trapped peptides were chromatographed on a reversed-phase column (Vydac 238EV5.07515, 75 μ m \times 150 mm; Hesperia, CA) fitted at the effluent end with a coated spray tip (FS360-50-5-CE, New Objective Inc., Woburn, MA). An LC Packings nanoflow LC system (Dionex, Sunnyvale, CA) with an autosampler, column switching device, loading pump, and nanoflow solvent delivery system was used to elute the column. Elution solvents were A (0.5% acetic acid in water) and B (80% acetonitrile, 0.5% acetic acid). Samples were eluted at 250 nL/min with the following gradient profile: 8% B at 0 min to 80% B in a 15 min linear gradient (held at 80% B for 5 min then back to 8% B for 10 min). The QStar Pulsar was externally calibrated daily and operated above a resolution of 7000. The acquisition cycle time of 6 s consisted of a single 1 s MS “survey” scan followed by a 5 s MS/MS scan. Ions between m/z 400 and 1000 of charge states between +2 and +5 having intensities greater than 40 counts in the survey scan were selected for fragmentation. The dynamic exclusion window was set to always exclude previously fragmented masses. A collision energy optimized for charge state and m/z was automatically selected by the Analyst QS 1.1 software after adjusting parameters to obtain satisfactory fragmentation of the Glu fibrinogen peptide (+2) and ACTH (+3 and +4). Nitrogen was used for the collision gas, and the pressure in the collision cell ranged from 3×10^{-6} to 6×10^{-6} Torr. The externally calibrated TOF–MS survey scans were processed with the “LCMS Reconstruct” tool in the Analyst software. The output is a list of peptide molecular weights calculated by deconvolution of multiple charge states and then identification of the monoisotopic 12 C species.

RESULTS

Isolation of an sPrP^{Sc} Fraction. Centrifugation of a PrP^{Sc} suspension at an intermediate centrifugal force, as described in the Experimental Procedures, generated pellets and supernatants with divergent resistance to PK. Supernatants, typically making up 35–55% of the total starting PrP^{Sc} material, were much less resistant than pellets. By fine-tuning the centrifugal force and length of centrifugation, we were able to obtain a supernatant PrP^{Sc} fraction that was completely hydrolyzed by the standard treatment with PK at 50 μ g/mL for 1 h at 37 $^{\circ}$ C (sPrP^{Sc}), as judged by Western blot using antibody 3F4 and Coomassie staining (Figure 1). Under the same conditions, an equivalent amount of the pellet produced the characteristic PK-resistant core (PrP 27–30) with an increased electrophoretic mobility, a consequence of the trimming of 65–70 amino terminal residues. We thereafter term this pellet fraction “rPrP^{Sc}”. Treatment of sPrP^{Sc} with lower concentrations of PK showed that this

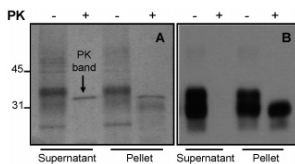


FIGURE 1: Isolation of a PK-sensitive PrP^{Sc} fraction: PrP^{Sc} was subjected to intermediate speed ultracentrifugation, as described in the Experimental Procedures, and supernatant and pellet fractions thus obtained subjected to PK treatment under standard conditions (50 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C, 1 h) and analyzed by SDS-PAGE. A: Coomassie blue stain; B: Western Blot using mAb 3F4.

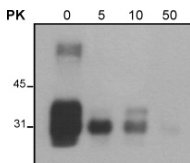


FIGURE 2: Partial PK resistance of sPrP^{Sc}. sPrP^{Sc} was treated with increasing concentrations of PK (μ g/mL) at 37 $^{\circ}$ C for 1 h and analyzed by Western blot using mAb 3F4.

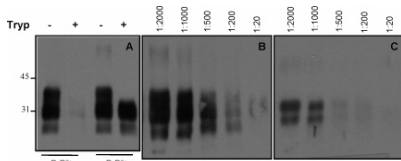


FIGURE 3: Susceptibility of sPrP^{Sc} to trypsin digestion. Samples of sPrP^{Sc} and rPrP^{Sc} were treated with trypsin for 1 h at 37 $^{\circ}$ C and analyzed by Western blot. A: Equal amounts of sPrP^{Sc} and rPrP^{Sc} treated with a 1:60 enzyme/substrate ratio (mAb 3F4). B: Limited digestion of sPrP^{Sc} with increasing trypsin/substrate ratios (mAb 3F4). C: Limited digestion of sPrP^{Sc} (mAb 6H4).

material exhibits, as expected, some resistance to degradation by this enzyme (Figure 2).

We next studied susceptibility of sPrP^{Sc} to trypsin. Treatment of sPrP^{Sc} with trypsin at 37 $^{\circ}$ C for 1 h, at enzyme/substrate ratios in the range 1:20–1:60 (there was some variability with different substrate and trypsin batches) resulted in a virtually complete disappearance of the protein, as assessed by Western blot using antibody 3F4 (Figure 3A); under similar conditions, an equivalent amount of rPrP^{Sc}, treated with the same ratio of trypsin, yielded a band of approximately the same intensity as that of the untreated sample, albeit migrating slightly faster (Figure 3A). This apparent MW difference of 2000–3000 suggests clipping of rPrP^{Sc} at arginines 37 and 48 in the putatively unstructured tail that, in contrast, is cleaved up to Gly90 by PK and agrees with previously published results relative to total PrP^{Sc} (13). Further experiments showed that decreasing trypsin/substrate ratios can be used to achieve limited proteolysis of sPrP^{Sc} (Figure 3B). Western blots using mAb 6H4 (epitope 144–152) also showed a similar trypsin concentration-dependent signal disappearance (Figure 3C), suggestive of a generalized tryptic cleavage. When freshly refolded, recombinant SHaPrP-(90–231) was subjected to trypsin proteolysis under the same conditions, complete disappearance of the 3F4 signal was

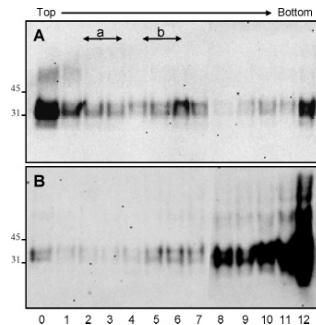


FIGURE 4: Size distribution of sPrP^{Sc} (A) and rPrP^{Sc} (B) in sucrose gradients. Equal amounts of sPrP^{Sc} and rPrP^{Sc} were loaded on the top of a preformed 10–60% step sucrose gradient; the gradient was spun for 1 h at 4 $^{\circ}$ C at g_{av} 200620g, fractions 0–12 collected from the top. Fractions were analyzed by Western blot using mAb 3F4. In parallel experiments under the same conditions, Apoferritin (443k) and Dextran Blue (2000k) emerged in the indicated fractions, a and b, respectively.

seen at an approximate enzyme/substrate ratio of 1:400, indicative of a much lower resistance to trypsin degradation.

Biochemical Characterization of sPrP^{Sc}. When subjected to sucrose gradient centrifugation, sPrP^{Sc} exhibited a distribution throughout the upper fractions, particularly 0–7 with a considerable amount of material present in fractions 0 (load volume) and 1 (Figure 4). Little material tailed in the lower fractions (8–11); some material was also recovered in the pellet fraction. When rPrP^{Sc} was subjected to a similar treatment, its distribution showed, as expected, a pattern complementary to that of sPrP^{Sc} with very little material present in early fractions (0–7) and most of it present in late fractions (8–12) including the pellet (Figure 4). It is known that lipid micelles can interfere with the mobility of proteins in sucrose gradients; therefore, we chose a concentration of 1% sarkosyl in our samples, which is known to prevent micelle formation (25). Furthermore, we conducted control experiments in which we took individual sucrose gradient fractions, dialyzed them against TNS, and reloaded the sample to a freshly prepared gradient. As seen in Figure S2, Supporting Information, such samples migrated to the same position as in the first separation experiment, which confirms these fractions contain oligomers of a defined size.

The molecular weight markers apoferritin (MW 443k) and Dextran Blue (MW 2000k), loaded on a gradient run in parallel under identical conditions, emerged in fractions ~2 and ~5, respectively (Figure 4). Extrapolation of these results would lead to the conclusion that, if an approximate MW of 35k is assigned to each PrP subunit, and assuming that the aggregates are entirely composed of PrP (26), the majority of sPrP^{Sc} aggregates would be composed of aggregates of up to 12–15 PrP subunits, and most rPrP^{Sc} would contain over 60 PrP subunits.

Different fractions obtained from the sucrose gradient centrifugation experiment were assayed for their converting capacity using the PMCA assay (22–24). More specifically, we assayed fractions 0 and (1 + 2) from sPrP^{Sc}, corresponding to very light and heavier fractions of sPrP^{Sc}, and fraction 11 from rPrP^{Sc}. As seen in Figure 5, when equal amounts of

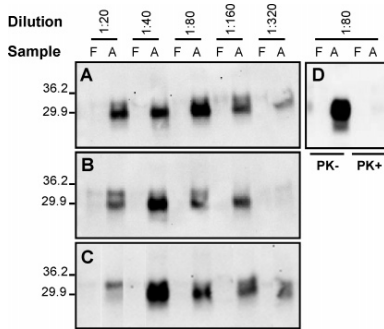


FIGURE 5: Transforming activity of sPrP^{Sc} as shown by PMCA. Equivalent amounts of PrP^{Sc} from different fractions (A, fraction 0 from sPrP^{Sc}; B, combined fractions 1 + 2 from sPrP^{Sc}; C, fraction 11 from rPrP^{Sc}) obtained from the sucrose gradient sedimentation experiment were diluted in NBH and split in two samples, one frozen (F) and the other subjected to amplification by PMCA (A). After treatment with 50 μ g/mL PK, samples were analyzed by Western blot (mAb 3F4). D: Aliquots of a sPrP^{Sc} sample treated with or without PK at 37 °C for 1 h and subjected to PMCA.

PrP present in these fractions were subjected to PMCA, all three exhibited converting activity, surmised from the generation of PK-resistant PrP^{Sc} at the end of the PMCA cycles. In a control experiment, we compared the converting activity of sPrP^{Sc} with or without prior treatment with PK and found that, as expected, PK-induced destruction of sPrP^{Sc} abolished the converting activity (Figure 5D). It is of note that, in these experiments, the detection of PrP^{Sc} was done after PK treatment, which means that, in the case of sPrP^{Sc} present in fractions 0 and (1 + 2), the conversion process progresses to generation of PK-resistant PrP^{Sc}. It remains to be studied what the ratio of sPrP^{Sc}/rPrP^{Sc} produced by PMCA from the different fractions used is. Further dilutions of the samples, subjected to PMCA, were also conversion-competent. Given the high sensitivity of PMCA, it is not possible, from this experiment, to compare the relative efficacy of the different fractions tested, but it is clear that even the material obtained from fraction 0 is highly conversion-competent.

Further biochemical characterization of sPrP^{Sc} was carried out using a version of the dot blot format CDI introduced by Serban et al. (21). As expected, treatment of total PrP^{Sc} blotted on a nitrocellulose membrane with 4 M guanidine, prior to probing with monoclonal antibody 3F4 resulted in a considerable increase in intensity (data not shown), in agreement with published results (21); rPrP^{Sc} behaved also in a similar way, and for sPrP^{Sc}, guanidine treatment produced a significant yet lower enhancement of intensity (Figure 6).

Limited Proteolysis of sPrP^{Sc}. The fact that sPrP^{Sc} can be digested by trypsin (Figure 3) prompted us to explore the possibility that sPrP^{Sc} might be subjected to limited proteolysis experiments using this enzyme. This might allow for probing the susceptibility of individual lysine and arginine residues to cleavage, which in turn can provide some structural information. We digested sPrP^{Sc} using trypsin to substrate ratios ranging from 1:2 to 1:2000 and analyzed the reaction mixtures by nanoLC–MS/MS. In agreement with

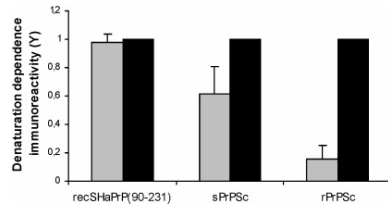


FIGURE 6: Denaturation dependent immunoreactivity of sPrP^{Sc}, rPrP^{Sc}, and recombinant SHAPrP (90–231). Samples were probed by dot blot (mAb 3F4) without (gray bars) or with (black bars) treatment with 4 M guanidinium hydrochloride. Y represents the ratio between signals obtained for a given sample without guanidinium hydrochloride treatment divided by signal obtained with 4 M guanidinium hydrochloride; Y = 1 indicates a complete lack of conformation dependence. Data represent means and standard deviations ($n = 4$). Differences were statistically significant (student's t test) between recSHAPrP (90–231) and sPrP^{Sc} ($p < 0.03$), recSHAPrP (90–231) and rPrP^{Sc} ($p < 0.0001$), and sPrP^{Sc} and rPrP^{Sc} ($p < 0.02$).

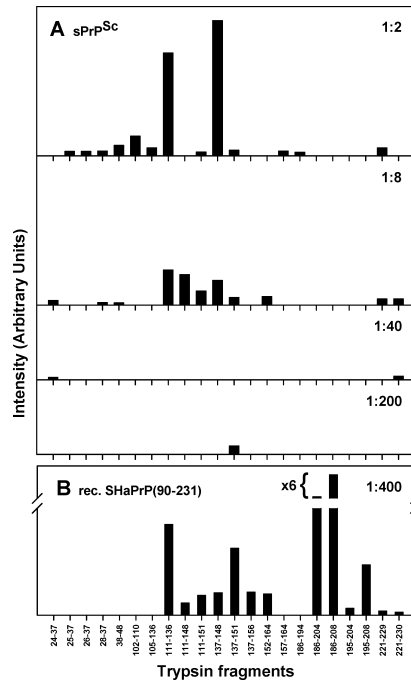


FIGURE 7: Tryptic fragments obtained by limited proteolysis of sPrP^{Sc}. Samples were treated with trypsin for 1 h at 37 °C at the indicated enzyme/substrate ratios. Tryptic fragments were identified by LC–MS, as described in the text. A: sPrP^{Sc}. B: recombinant SHAPrP (90–231). Bars represent relative peak areas in total intensity chromatograms (TIC) with all panels at the same scale, except as otherwise indicated. Data are representative of two independent experiments.

Western blot data (Figure 3), the lower enzyme/substrate ratios resulted in just a few detectable fragments (Figure 7). As expected, higher trypsin/substrate ratios resulted in detection of more fragments with overall higher intensities.

It is noteworthy that detection of a given fragment depends not only on cleavage of residues located at its boundaries but also on the intrinsic "detectability" of the resulting peptide; i.e., low MW peptides (<800) would not trigger MS-MS experiments, and others may suffer substantial losses during sample cleanup, etc. For PrP^{Sc}, glycosylation and the presence of the disulfide bond further limit the number of peptides that could be detected under our particular experimental conditions. With all this in mind, the most readily conspicuous fragments were 137-151, 24-37, and 221-230 (Figure 7 and Figures S3 and S4 in the Supporting Information). At higher concentrations of trypsin, besides these fragments, several others were detected, including 111-136, 137-148, 152-164, and 157-164. At an even higher trypsin concentration, intensity ratios of some fragments changed, indicating further fragmentation at previously intact internal residues. As an example, peptides 111-136 and 137-148, which do not have any intact internal K or R residues, increased steadily as the trypsin concentration increased, whereas fragments 111-148, 111-151, and 152-164 exhibited a bimodal behavior, with maximum relative intensities at intermediate trypsin concentrations.

DISCUSSION

There is a growing interest in PK-sensitive PrP^{Sc}, a previously unnoticed PrP^{Sc} fraction. There are several reasons for this: on one hand, recent studies suggest that, in many instances, sPrP^{Sc} makes up a very sizable fraction of total PrP^{Sc} (15); on the other hand, sPrP^{Sc} might offer explanations for some puzzling experimental results that have been difficult to accommodate within the current prion paradigm, such as reports of disease transmission in the absence of "PK-resistant PrP" (27), or the inherent difficulty to propagate some prions, such as those causing some genetic forms of disease (28). Finally, the existence of sPrP^{Sc} has clear practical implications, as it limits the usefulness of analytical techniques relying on the use of PK to detect PrP^{Sc}. This should be carefully considered in the development of the urgently needed ultrasensitive tests capable of detecting PrP^{Sc} in preclinical disease-suffering subjects and animals. Furthermore, the possibility of missing infected specimens containing a high proportion of sPrP^{Sc} becomes an issue with obvious health implications.

We report here a simple method to isolate a PK-sensitive fraction of PrP^{Sc}. It is evident that our definition of sPrP^{Sc} is operational: we have chosen a specific combination of centrifugal force and centrifugation time that allows for isolation of a fraction of PrP^{Sc} that will, precisely, be completely degraded under the standard, yet arbitrary, conditions defined by treatment by 50 μ g/mL PK at 37 °C for 1 h. However, it is also evident that modifying the parameters of centrifugation allows one to obtain an alternative fraction that would meet the definition of sPrP^{Sc}, were different operational PK-treatment parameters to be chosen. Our results show, in agreement with the work of Tzaban et al. (12), that PK resistance of PrP^{Sc} shows a strong dependence on the quaternary structure of PrP^{Sc}. Indeed, PrP^{Sc} isolated following a standard procedure based on ultracentrifugation in the presence of detergents is a collection of oligomers with a continuum of sizes (Figure 4). Our results confirm that larger PrP^{Sc} polymers exhibit higher PK resistance than smaller ones.

Resistance to digestion by PK is a function of accessibility to the enzyme, and larger oligomers offer the possibility of enhanced protection of certain PrP subunits. Because there is not a definitive model of PrP^{Sc}, it is difficult to envision how such enhanced protection is achieved. In contrast to PrP 27-30, obtained by proteolytic treatment of PrP^{Sc} in the presence of detergent, and organized in rods of measurable dimensions (2, 13), there are no available experimental data on the organization or shape of PrP^{Sc} oligomers. The most parsimonious view would be that PrP^{Sc} and PrP 27-30 share basic structural features, such as the way in which PrP subunits are stacked (7) and that clipping by PK of the very labile, random coil amino termini leads to further packing. Such a possibility is compatible with a mechanism of PrP^{Sc} growth and transmission based on nucleated polymerization. In this model, the β -sheet domains of a PrP subunit, whatever their specific organization might be (β -helices, simple parallel β -sheets, etc.; 7,8), act as templates or scaffolds for the next PrP subunit (6, 29). The alternative possibility is that PrP^{Sc} and PrP 27-30 have unrelated quaternary structures and that PrP 27-30, with its proposed regular stacking, is formed totally *de novo* through a complete rearrangement of the subunits that constitute the PrP^{Sc} aggregate; in that case, PrP^{Sc} oligomers might even be formed by featureless aggregates. However, it is more difficult in that case to envision how one β -sheet rich PrP^{Sc} subunit might influence a PrP^C molecule to adopt a PrP^{Sc} conformation. In any case, it seems obvious that, whether well-structured stacks or random aggregates, the larger PrP^{Sc} oligomers become more protected from PK digestion.

A property of PrP^{Sc} that also shows, in our hands, a significant dependence on size is conformation-dependent immunoreactivity. With regard to this, sPrP^{Sc} exhibited a distinct enhancement of immunoreactivity after guanidine hydrochloride treatment (Figure 6); however, such enhancement was significantly lower than that of rPrP^{Sc}, made up, as discussed, of larger polymers. This is in agreement with Tzaban et al. (12), who showed a decrease in conformational-dependent immunoreactivity in the lighter fractions of brain homogenates subjected to sucrose gradient fractionation.

Our results confirm that sPrP^{Sc} is able to convert PrP^C into PrP^{Sc}. Fractions of PrP^{Sc} comprising oligomers of small relative size were as effective as larger polymers to convert PrP^C into PrP^{Sc} in the PMCA assay. This result strongly suggests that sPrP^{Sc} is indeed *bona fide* PrP^{Sc} and not an off-route molecular species along the pathway that leads from PrP^C to a putative "full-fledged" PrP^{Sc} (14). Studies aimed at determining whether sPrP^{Sc} is infectious and what the kinetics of its accumulation *in vivo* look like are in process. A recent study showed that the most infectious fraction of solubilized PrP 27-30 corresponds to relatively small oligomers comprising 14-28 PrP molecules; smaller and larger aggregates show reduced specific infectivity and, beyond certain given size thresholds, are not infectious at all (30). *In vitro* converting capacity also peaked at the same intermediate size. Even though extreme caution must be exercised when comparing results obtained with PrP^{Sc} and those obtained with MW markers, our data suggest that the material present in our loading fraction (fraction 0, Figure 4) corresponds to oligomers with very low molecular weights; a direct interpolation would suggest that they contain less than 12 PrP subunits. Thus, our data suggest that even

such low molecular weight oligomers are capable of initiating prion replication.

The susceptibility of sPrP^{Sc} to virtually complete degradation by trypsin opens the possibility of using limited proteolysis as a tool to probe its structure. This approach has been successfully used to obtain structural information on a variety of proteins that were not amenable to other techniques (31–33). Lysine and arginine residues that are accessible (solvent-exposed) and do not participate in strong ionic interactions are more easily cleaved by trypsin. The results described in Figure 7 constitute an example of the applicability of this strategy to PrP^{Sc}. Thus, comparison of yields of specific cleavage products obtained from sPrP^{Sc} and recombinant PrP after application of increasing amounts of trypsin allows one to conclude that residues R136, R151, K220, and R229 are particularly susceptible to cleavage in sPrP^{Sc}. Other residues, such as K110, R148, R156, R164, K185, and K194 are partially cleaved as well, but this requires larger amounts of trypsin. In contrast, evidence of cleavage of all these residues in recombinant SHaPrP (90–231) is seen even at the lowest concentration of trypsin tested (trypsin/substrate ratio of 1:400). A similar analysis of the rPrP^{Sc} showed an overall pattern that was very similar to that of sPrP^{Sc}, although with much lower yields of peptide fragments (data not shown). In a recent model of mouse PrP 27–30 based on a left-handed β -helical core (7), residue R150, equivalent to hamster R151, is located in a loop protruding from the central β -helical core, which would be in good agreement with accessibility of this residue; residues K219 and R228, equivalent to hamster K220 and R229, are located in the carboxy-terminal α -helix, again, allowing good accessibility, provided there is no hindrance from carbohydrates attached to PrP^{Sc} in the carboxy-terminal region. However, R135, equivalent to hamster R136, is placed in the middle of the β -helical assembly, a location that theoretically would not facilitate access of trypsin. It should be noted that an exhaustive analysis of cleavage patterns is complicated by the fact that in PrP^{Sc} several of the possible products are glycosylated, which renders them impossible to detect with the methods used. Additional and more extensive studies, including time course experiments, will provide structural information that, together with data obtained with other techniques, such as chemical cross-linking (11) and surface labeling studies, will allow testing of the structural models proposed thus far and the design of new models that can explain the physicochemical data obtained.

To summarize, we have developed an easy method to isolate a PK-sensitive fraction of PrP^{Sc}. A first survey of the biochemical properties of this material, composed by a light fraction of PrP^{Sc} oligomers, shows that it has prion-converting activity and that it is susceptible to digestion by specific proteolytic enzymes, such as trypsin. This material should prove useful to study fundamental aspects of the biochemistry of PrP^{Sc}.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Emilio Nogueira from the Department of Physiology, University of Santiago de Compostela, for outstanding technical advice. We also thank Alejandro Brun

and José A. Rodríguez from the CISA, Madrid, for help with hamster inoculations.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Figures showing the presence of PrP in supernatants and pellets of a healthy hamster brain homogenate subjected to the PrP^{Sc} isolation procedure, consistent location of PrP^{Sc} fractions in sucrose gradient sedimentation, examples of an extracted ion chromatogram (XIC), and an MS/MS spectrum corresponding to a tryptic peptide of sPrP^{Sc}. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES

- Prusiner, S. B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136–144.
- Prusiner, S. B. (1998) Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 13363–23383.
- Soto, C., and Castilla, J. (2004) The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. *Nat. Med. Suppl.* 7, S63–67.
- Legname, G., Baskakov, I. V., Nguyen, H. O., Riesner, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (2004) Synthetic mammalian prions. *Science* 305, 673–676.
- Castilla, J., Saa, P., Hetz, C., and Soto, C. (2005) In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 121, 195–206.
- Caughey, B. (2003) Prion protein conversions: insight into mechanisms. TSE transmission barriers and strains. *Br. Med. Bull.* 66, 109–120.
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B., and Cohen, F. E. (2004) Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 8342–8347.
- DeMarco, M. L., and Daggett, V. (2004) From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 12293–12298.
- Stork, M., Giese, A., Kretzschmar, H. A., and Tavan, P. (2005) Molecular dynamics simulations indicate a possible role of parallel beta-helices in seeded aggregation of poly-Gln. *Biophys. J.* 88, 2442–2451.
- Wille, H., Michelitsch, M. D., Guénebat, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F. E., Agard, D. A., and Prusiner, S. B. (2002) Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 3563–3568.
- Onisko, B., Fernandez, E. G., Freire, M. L., Schwarz, A., Baier, M., Camiña, F., Garcia, J. R., Rodriguez-Segade Villamarin, S., and Requena, J. R. (2005) Probing PrP^{Sc} structure using chemical cross-linking and mass spectrometry: evidence of the proximity of Gly90 amino termini in the PrP 27–30 aggregate. *Biochemistry* 44, 10100–10109.
- Tzaban, S., Friedlander, G., Schonberger, O., Horonchik, L., Yedidia, Y., Shaked, G., Gabizon, R., and Taraboulos, A. (2002) Protease-sensitive scrapie prion protein in aggregates of heterogeneous sizes. *Biochemistry* 41, 12868–12875.
- McKinley, M. P., Meyer, R. K., Kenaga, L., Rahbar, F., Cotter, R., Serban, A., and Prusiner, S. B. (1991) Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis. *J. Virol.* 65, 1340–1351.
- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (1998) Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations. *Nat. Med.* 4, 1157–1165.
- Safar, J. G., Geschwind, M. D., Deering, C., Didorenko, S., Sattav, M., Sanchez, H., Serban, A., Vey, M., Baron, H., Giles, K., Miller, B. L., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (2005) Diagnosis of human prion disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 3501–3506.
- Diringer, H., Beekes, M., Özel, M., Simon, D., Queck, I., Cardone, F., Pocchiari, M., and Ironside, J. W. (1997) Highly infectious purified preparations of disease-specific amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleic acids of viral size. *Interferology* 40, 238–246.
- Bolton, D. C., Bendheim, P. E., Marmorestein, A. D., and Potempska, A. (1987) Isolation and structural studies of the intact scrapie agent protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 258, 579–590.

18. Caughey, B., Raymond, G. J., Priola, S. A., Kocisko, D. A., Race, R. E., Bessen, R. A., Lansbury, P. T., Jr., and Chesebro, B. (1999) Methods for studying prion protein (PrP) metabolism and the formation of protease-resistant PrP in cell culture and cell-free systems, *Mol. Biotechnol.* *13*, 45–55.
19. Beekes, M., Baldauf, E., Cassens, S., Diring, H., Keyes, P., Scott, A. C., Wells, G. A. H., Brown, P., Gibbs, C. J., Jr., and Gajdusek, D. C. (1995) Western blot mapping of disease-specific amyloid in various animal species and humans with transmissible spongiform encephalopathies using a high-yield purification method, *J. Gen. Virol.* *76*, 2567–2576.
20. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* *227*, 680–685.
21. Serban, D., Taraboulos, A., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1990) Rapid detection of Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prion proteins, *Neurology* *40*, 110–117.
22. Saborio, G. P., Permanne, B., and Soto, C. (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding, *Nature* *411*, 810–813.
23. Castilla, J., Saá, P., and Soto, C. (2004) Cyclic Amplification of Prion Protein Misfolding, in: *Techniques in Prion Research* (Lehman, S., and Grassi, J., Eds.), pp 198–213, Birkhouser, Basel.
24. Saá, P., Castilla, J., and Soto, C. (2004). Cyclic Amplification of Prion Protein Misfolding, in *Amyloid Proteins: Methods and Protocol*. (Sigurdsson, E. M., Ed.) pp 53–65, Humana Press, Totowa, NJ.
25. Riesner, D., Kellings, K., Post, K., Wille, H., Serban, A., Groth, D., Baldwin, M. A., and Prusiner, S. B. (1996). Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high α -helical content and lacking scrapie infectivity, *J. Virol.* *70*, 1714–1722.
26. Chiesa, R., Piccardo, P., Quaglio, E., Drisaldi, B., Si-Hoe, S. L., Takao, M., Ghetti, B., and Harris, D. A. (2003) Molecular distinction between pathogenic and infectious properties of the prion protein, *J. Virol.* *77*, 7611–7622.
27. Lasmezas, C. I., Deslys, J. P., Robain, O., Jaegly, A., Beringue, V., Peyrin, J. M., Fournier, J. G., Hauw, J. J., Rossier, J., and Dormont, D. (1997) Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein, *Science* *275*, 402–405.
28. Brown, P., Gibbs, C. J., Rodgers-Johnson, P., Asher, D. M., Sulima, M. P., Bacote, A., Goldfarb, L. G., and Gajdusek, D. C. (1994) Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease, *Ann. Neurol.* *35*, 513–529.
29. Come, J. H., Fraser, P. E., and Lansbury, P. T., Jr. (1993) A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: Importance of seeding, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 5959–5963.
30. Silveira, J. R., Raymond, G. J., Hughson, A. G., Race, R. E., Sim, V. L., Hayes, S. F., and Caughey, B. (2005) The most infectious prion protein particles, *Nature* *437*, 257–261.
31. Hubbard, S. J. (1998) The structural aspects of limited proteolysis of native proteins, *Biochim. Biophys. Acta* *1382*, 191–206.
32. Kheterpal, I., Williams, A., Murphy, C., Bledsoe, B., and Wetzel, R. (2001) Structural features of the A β amyloid fibril elucidated by limited proteolysis, *Biochemistry* *40*, 11757–11767.
33. Neurath, H. (1980) Limited Proteolysis, Protein Folding and Physiological Regulation, in *Protein Folding* (Jaenicke, R., Ed.) pp 501–523, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

BI0615442

Isolation and characterization of a proteinase K sensitive PrP^{Sc} fraction

Miguel A. Pastrana, Gustavo Sajnani, Bruce Onisko, Joaquín Castilla, Rodrigo Morales,
Claudio Soto, Jesús R. Requena

Supplementary Material

Legends to supplementary figures

Fig. S-1: Distribution of PrP in successive fractions of Syrian hamster healthy brain subjected to the same procedure used to isolate PrP^{Sc}. **A:** 10% healthy Syrian hamster brain homogenate was prepared in 10% sarkosyl and subjected to the same procedure used to isolate PrP^{Sc} (see Experimental Procedures and refs. 16,17). H=homogenate; H_{PK}= PK treated homogenate (50 µg/ml, 37°C, 1h); S1-4, supernatants; P1-4, pellets. PrP (PrP^C) is overwhelmingly present in the supernatant after the first low-speed centrifugation to clear cell debris (S1); after high-speed centrifugation, all PrP remains in the supernatant (S2), as opposed to PrP^{Sc} in preps from scrapie-infected brains, and is therefore discarded, not appearing in successive supernatants or pellets. **B:** PrP in final samples obtained from scrapie-infected brain and healthy brain treated in the same way.

Western blots were probed with mAb 3F4.

Fig. S-2: Stability of fractions obtained by sucrose gradient centrifugation. **A:** PrP fractions were obtained by centrifugation ($g_{av} = 200,620g$) of sPrP^{Sc} through a 10-60% sucrose gradient and analyzed by Western blot using mAb 3F4 (see Experimental Procedures for details). **B:** Fractions 3 and 4 were pooled, dialyzed against PBS to remove sucrose, and subjected for a second time to the same sucrose gradient fractionation procedure; this time,

fractions of twice as much volume as the first time, were collected (*i.e.*, 6 instead of 12), and PrP in each fraction concentrated by methanol precipitation prior to Western blot analysis. Although there was some “smearing” the majority of PrP localized in fraction 2, equivalent to combined 3 + 4 fractions in the first fractionation.

Fig. S-3. Representative eXtracted Ion Chromatogram (XIC) corresponding to peptide [111-136]³⁺ in an sPrP^{Sc} sample subjected to limited proteolysis with trypsin. Plot corresponds to TOF signal of m/z 788.328 to 788.442 from sPrP^{Sc} digested with a 1:8 trypsin to substrate ratio (theoretical monoisotopic mass of peptide [111-136]³⁺ = 788.3854).

Fig. S-4. Representative fragmentation spectrum of an ion corresponding to a peptide in an sPrP^{Sc} sample subjected to limited proteolysis with trypsin. The spectrum corresponds to fragmentation of ion of m/z 788.4, and confirms its identity as corresponding to peptide [111-136], HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSR.

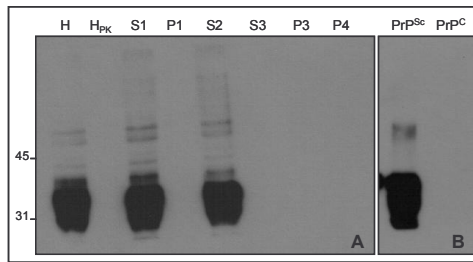


Fig. S-1

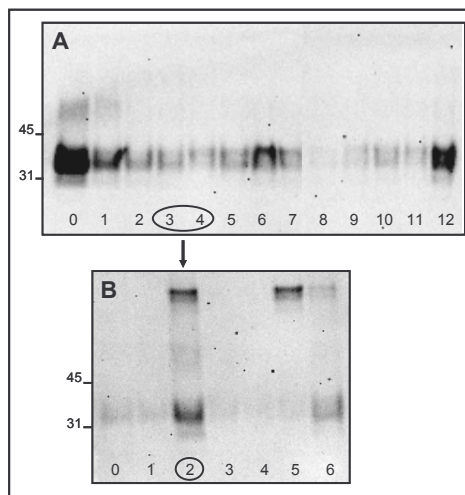


Fig. S-2

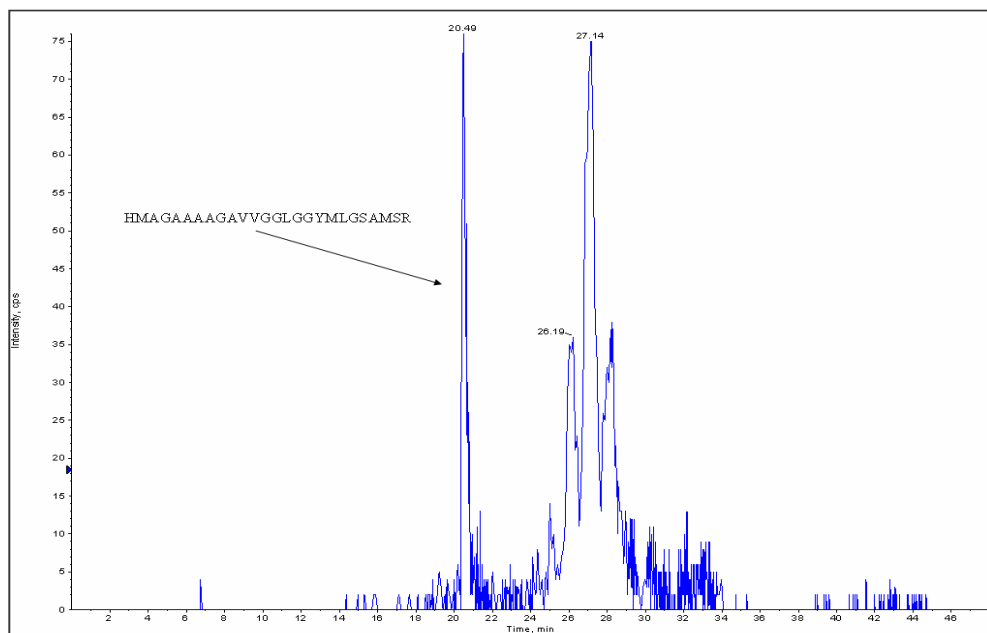


Fig. S-3

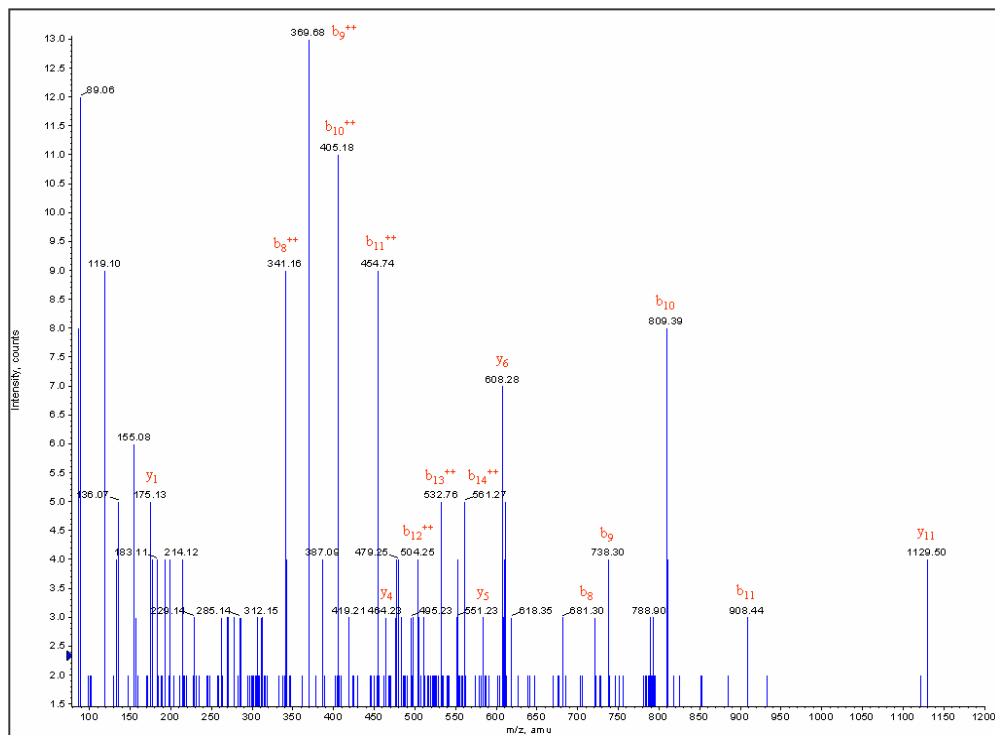


Fig. S-4

Accepted Manuscript

Scrapie prion protein (PrP^{Sc}) structural constraints obtained by limited proteolysis and mass spectrometry

Gustavo Sajnani, Miguel A. Pastrana, Irina Dynin, Bruce Onisko, Jesús R. Requena

PII: S0022-2836(08)00797-3
DOI: doi: [10.1016/j.jmb.2008.06.070](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.070)
Reference: YJMBI 60587

To appear in: *Journal of Molecular Biology*

Received date: 31 January 2008
Revised date: 16 May 2008
Accepted date: 24 June 2008



Please cite this article as: Sajnani, G., Pastrana, M.A., Dynin, I., Onisko, B. & Requena, J.R., Scrapie prion protein (PrP^{Sc}) structural constraints obtained by limited proteolysis and mass spectrometry, *Journal of Molecular Biology* (2008), doi: [10.1016/j.jmb.2008.06.070](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.070)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

ACCEPTED MANUSCRIPT

**SCRAPIE PRION PROTEIN (PrP^{Sc}) STRUCTURAL CONSTRAINTS OBTAINED BY
LIMITED PROTEOLYSIS AND MASS SPECTROMETRY**

Gustavo Sajnani¹, Miguel A. Pastrana¹, Irina Dynin², Bruce Onisko², and Jesús R. Requena¹

¹Prion research unit, School of Medicine, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Galiza, Spain. ²Western Regional Research Center, United States Department of Agriculture, Albany, CA 94710, USA.

Corresponding author: Gustavo Sajnani. Prion Research Unit. School of Medicine, USC. Rúa de S. Francisco s/n. 15782 Santiago de Compostela, Galiza, Spain. Phone: +34-981-559904. FAX: +34-981-559904. E-mail: gsajnani@usc.es

Elucidation of the structure of PrP^{Sc}, essential to understand the molecular mechanism of prion transmission, continues to be one of the major challenges in prion research, and is hampered by the insolubility and polymeric character of PrP^{Sc}. Limited proteolysis is a useful tool to obtain insight on structural features of proteins: proteolytic enzymes cleave proteins more readily at exposed sites, preferentially within loops, and rarely in β -strands. We treated PrP^{Sc} isolated from brains of hamsters infected with 263K and Drowsy prions with varying concentrations of proteinase K (PK). After PK deactivation, PrP^{Sc} was denatured, reduced, and cleaved at Cys179 with 2-nitro-5-thiocyanatonitrobenzoic acid (NTCB). Fragments were analyzed by nanoHPLC-MS and MALDI. Besides the known cleavages at positions 90, 86, 92 for 263K and 86, 90, 92, 98 and 101 for Dy, our data clearly demonstrate the existence of additional cleavage sites at more internal positions, including 117, 119, 135, 139, 142 and 154 in both strains.

PK-concentration dependence analysis and limited proteolysis after partial unfolding of PrP^{Sc} confirmed that only the mentioned cleavage sites at the N-terminal side of the PrP^{Sc} are susceptible to PK. Our results indicate that besides the “classic” amino terminal PK cleavage points, PrP^{Sc} contains, in its middle core, regions that show some degree of susceptibility to proteases and must therefore correspond to sub-domains with some degree of structural

flexibility, interspersed with stretches of amino acids of high resistance to proteases. These results are compatible with a structure consisting of short β -sheet stretches connected by loops and turns.

Keywords: PrP; strain; structure; limited proteolysis; mass spectrometry

Abbreviations used: PrP^{Sc}, scrapie prion protein; PK, proteinase K; Dy, drowsy; NTCB, 2-nitro-5-thiocyanatonitrobenzoic acid.

Introduction

PrP^C is a 209-residue glycoprotein anchored on the extracellular face of the plasma membrane by a glycosylphosphatidyl-inositol moiety. An abnormal and aggregated form of this protein, termed PrP^{Sc} is the infectious agent responsible of the transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). The main difference between PrP^C and PrP^{Sc} is conformational.

Even though the structure of PrP^C has been determined by NMR spectroscopy^{1,2} and X-ray crystallographic analysis³ the structure of PrP^{Sc} has been much more difficult to determine. It has not been possible to solve its tertiary structure, largely because of the insolubility of PrP^{Sc} and the failure to crystallize the heterogeneous aggregates that constitute it. However, several structural characteristics of PrP^{Sc} have been determined. Treatment with the non-specific protease proteinase K (PK) showed that while PrP^C is sensitive to proteolysis, PrP^{Sc} aggregates contain a resistant core consisting of amino acid residues ~90-231. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy has indicated that the transition from PrP^C to PrP^{Sc} is associated with a loss in α -helix and a large increase in β -sheet structure^{4,5}. The ultrastructure of PrP^{Sc} has also been analyzed using electron microscopy-based analysis of 2D crystals of PrP27-30^{6,7}. Several studies have also been conducted with recombinant PrP fibrils^{8,9}, although the relevance of structural features of such material with respect to PrP^{Sc} remains to be determined. The combination of the available biophysical data with computational techniques has been used to generate models for PrP^{Sc}^{6,10-13}. In one of such models a putative PrP^{Sc}

ACCEPTED MANUSCRIPT

structure was derived from a molecular dynamics simulation under amyloidogenic conditions¹⁰. In this simulation extended sheets formed by parallel and antiparallel extended strands spiral about the fibril axis. Another structure, proposed by Govaerts *et al.* was modeled by threading a portion of the prion sequence through a known β -helix fold^{6,7}. Authors contend that the sequence of PrP is compatible with a parallel left-handed β -helical fold that can assemble into trimers⁶. Recently Eisenberg's group has reported that segments from different fibril-forming proteins, PrP among them, suggest a steric zipper formed by two tightly interdigitated β -sheets¹⁴. Furthermore, strain diversity in TSEs has been suggested to be enciphered in the structure of the misfolded PrP^{Sc}. The first evidence of structural variations between different TSE agents with distinct biological properties came from differences in the migration patterns of limited PK digested samples in PAGE¹⁵. Conformation-dependent immunoassay suggested strain-specific protein conformations of eight prion strains passaged in Syrian hamsters¹⁶. FT-IR studies on PrP^{Sc} and PrP27-30 derived from different TSE strains showed that the secondary structure differed specifically for the various TSE agents, and that the strain differences were reflected by variations in amide I components^{17,18}. In the present study, we aimed at increasing the knowledge of PrP^{Sc} protein structure by using limited proteolysis. Recent reports have demonstrated the usefulness of combining limited proteolysis and mass spectrometry to obtain information regarding the 3-D structures of proteins. Conformational parameters such as accessibility, segmental mobility and protrusion correlate well with limited proteolysis. Modelling experiments have demonstrated that peptide bonds located within β -strands are resistant to proteolytic cleavage whereas peptide bonds within loops and more rarely α -helices may be cleaved¹⁹. We have to keep in mind that in limited proteolysis surface exposure is not the only parameter to take into account but also the flexibility of the protein region exposed. According to Fontana limited proteolysis of natively folded proteins occurs at sites with high mobility (flexible) and rarely at the level of chain segments of regular secondary structure such as α -helices. Therefore, the targets for limited proteolysis are locally unfolded or highly flexible segments²⁰⁻²³. We compared the different N-terminal cleavage sites of two different hamster PrP^{Sc} strains, 263K and Drowsy (Dy) that differ significantly in incubation time and PK sensitivity. To simplify the analytical

ACCEPTED MANUSCRIPT

challenge, we used 2-nitro-5-thiocyanatobenzoic acid (NTCB) after PK-treatment of PrP^{Sc} to cleave at the N-terminal side of cysteine 179. The NTCB reagent is commonly used to cyanilate free cysteines and cleave amide bonds at the N-terminal side of the modified cysteine residues, in a two-step reaction. Fragments generated can be conveniently analyzed by gel electrophoresis, chromatographic methods, or mass spectrometry^{24,25}. There are two cysteines in PrP, and since no carbohydrate chains appear before cysteine 179, this allowed identification of each amino terminal species as a unique peptide of sequence x to 178, where x is the amino terminal residue. Peptides were then analyzed by MALDI-TOF and nanoLC-ESI-Q-q-TOF.

Our results indicate that in addition to the previously described amino-terminal PK cleavage sites, PrP^{Sc} contains, in its core, regions of protease susceptibility separated by sequences where no cleavages are detected. These results are compatible with a structure consisting of β -sheet stretches connected by loops and turns. Furthermore the difference between the two strains, K and Dy PK-products is not the location of the cleavages, but relative amounts present after PK digestion.

Results

Identification of PK-cleavage sites in PrP^{Sc} 263K and Dy

A proteolytic cleavage map of Dy after PK digestion has been previously described by Bessen and Marsh²⁶. At least three amino-terminal ends were obtained, Gly-92, Gln-98 and Lys-101 with Gly-92 being the predominant one. For 263K, the most abundant amino-terminal ends after PK treatment have been determined to be Gly-82, Gly-86 and Gly-90.

Proteolytic activity of PK and subsequent cleavage with NTCB generates a mixture of amino-terminally truncated species that were first analyzed by MALDI-TOF. Three different concentrations of PK were used for the two strains: 1 μ g/ml, 5 μ g/ml, and 10 μ g/ml of PK that corresponds to 1/800, 1/160, and 1/80 PK/PrP ratio, respectively.

ACCEPTED MANUSCRIPT

NTCB cleavage allowed identification of each amino terminal species as a unique peptide of sequence (x to 178), where x is the amino terminal residue. Only the “x” position corresponding to the PK cleavage site will be indicated for clarity and simplification of the text.

Our results show an almost similar set of peptides in both strains (Fig. 1a-b). The more N-terminal cleavage sites correspond to positions 70, 74, 78, 82, 86, 90, and 92 and other more internal cleavages at positions 117, 119, 135, 139 and 142 in 263K. The same result plus cleavage at 101 was found in Dy. This result indicates that almost all cleavage sites present in one strain are also present in the other. The intensity of specific peaks is the only difference between them.

Although the data obtained in MALDI are qualitative rather than quantitative, and considering that similar concentration of both strains were used, a difference between 263K and Dy can be seen when comparing intensities of the more N-terminal (70 to 101) vs. “internal” (117 to 142) peaks. Due to intrinsic variability in peptide yields of the PK+NTCB reaction method other peaks corresponding to positions 131, 133, 134 and 154 were detected in the majority of, but not every experimental replicate, and again in both strains (Fig. 2a). Both, amino-terminal and what we have called “internal” cleavage sites increased in abundance as the concentration of PK was increased. Whereas in Dy the increase in peak intensity is more evident for the “internal” sites, and remains the same for the amino-terminal cleavage sites, the opposite is seen for 263K strain. The greater susceptibility of Dy to PK activity may explain this result. The tendency of the “internal” sites to increase in parallel to the PK concentration is especially striking for 117 and 119. This is also applicable for 135, 139 when using 50 µg/ml, corresponding to 1/16 PK/PrP ratio (data not shown). The data clearly show that the N-terminal side is more exposed/flexible to PK-catalyzed hydrolysis than the region of the protein spanning residues 117-142. Nevertheless the presence of peaks corresponding to positions 117, 119 and 139 at the lowest PK/PrP ratio indicate that, besides the flexible amino terminal tail three other areas of PK-susceptibility exist that have not been described until now: 117-119, 131-142 and the region close to 154.

In order to further confirm the results obtained, samples were analyzed by nanoLC-ESI-Q-q-TOF mass spectrometry. This technique allowed us to identify additional cleavage sites at the N-terminal side and confirmed some of the more internal ones, such as 117, 119, 131, 135, 139, and 154 as well

as 153 and 156 that were not detected in MALDI (Fig.2b, 2c). Cleavage in almost every position from 90 to 101 could be detected showing the high accessibility/flexibility of this portion of PrP^{Sc} to PK. Similar cleavage locations were found for 263K (data not shown). Two products were found for each PK cleavage site, one formed by cleavage of the amide bond by NTCB, and the other by condensation of guanidine with a carboxyl group on the peptide after NTCB cleavage, resulting in a modified peptide 41 daltons higher in molecular weight than for the unmodified peptide. This side-product has previously been described by Tang *et al.*²⁷. An interesting fact is that no new cleavage sites are seen as PK concentration was increased. The same was observed for the 50µg/ml PK treatment (data not shown). PK-protected areas between susceptible ones could be explained by different tertiary or quaternary structure, or both.

The quantitative importance of the “internal” cleavage sites is appreciated when a C-terminal antibody like R1 is used to detect deglycosylated PrP in WB (Fig. 3). Besides the intense band corresponding to cleavages in and around position 90, additional lower MW bands are evident. These bands are in general more intense in Dy samples. While it is impossible to ascertain the identity of each band, their apparent MW suggests that the one with ~16 kDa, particularly intense in Dy, could correspond to 117, 119-178 fragments. In order to rule out the possibility that such bands might correspond to a PK-labile minor component of our PrP^{Sc} prep, we increased the concentration of PK. In 263K, the intensity of the bands showed a positive concentration-dependence with respect to PK; in Dy samples, their intensity increased overall with 200µg/ml of PK, and then diminished with 1600µg/ml (Fig. 3). Globally, these results support the notion that these bands correspond to cleavages in partially accessible regions of PrP^{Sc}, more prevalent as the concentration of PK increases; in the less compact Dy samples, the introduction of additional cleavages at the highest PK concentration tested eventually destroys some of the alternative resistant cores generated initially. MALDI analysis of samples treated with these higher PK concentrations showed the presence of the same peptides obtained with lower concentrations (data not shown).

PK-cleavage analysis after partial unfolding of PrP^{Sc}

In an attempt to extend the map of PK-sensitive cleavage sites of PrP^{Sc} we treated PrP^{Sc} with intermediate concentrations of guanidine before cleavage analysis. Though 6M guanidine irreversibly denatures PrP^{Sc}, concentrations below 3M still maintain substantial native PrP^{Sc} structure, and furthermore lead to structural changes that are reversible upon dialysis²⁸. Samples were treated with either 1M or 2M guanidine for 1 hour at 37°C and then diluted to 0.5M to reduce guanidine concentration before PK digestion at 5µg/ml (Fig.4). As the concentration of guanidine increases, the conformation of PrP^{Sc} is destabilized, and the molecule is rendered increasingly susceptible to proteolytic digestion.

In both strains the more N-terminal cleavage sites plus positions 117 and 119 disappear after treatment with either 1M or 2M guanidine leaving only the more internal positions. Of note, just as seen in the PK concentration-dependent analysis no new cleavage sites were detected for either 263K nor Dy. Increasing PK sensitivity might be due to disruption of tertiary and/or quaternary structures within the PrP^{Sc} aggregate.

Effect of detergent on PK cleavage

We analyzed the effect of replacing 1% sarkosyl with 0.1% β-octylglucoside as the detergent used to resuspend PrP^{Sc}, on PK cleavage. The use of one or other detergent had an effect on the quaternary structure of PrP^{Sc}, as shown by the proportion of PrP^{Sc} molecules in the supernatant after centrifugation at 40,000 rpm (g_{av} 56806g). In suspensions prepared in 1% sarkosyl, ~30% of PrP^{Sc} molecules were found in this fraction, in good agreement with previous results²⁹. In contrast, suspensions prepared in 0.1% β-octylglucoside contained a very low amount of PrP^{Sc} molecules in the supernatant after centrifugation (Fig. 5a). MALDI analysis of peptides generated by PK cleavage showed that the same cleavage sites were detected (Fig.5b). This supports the idea that the pattern of PK cleavage is mostly dictated by secondary/tertiary structure, whereas quaternary structure modulates the intensity of cleavage at any given site.

Quantitation of selected N-terminal cleavage points

Considering the results obtained so far, the difference between 263K and Dy PK-products is not the location of the PK cleavages, but the abundance of particular peptides and their ratios when comparing the two strains. In order to further prove this statement we decided to quantitate the main amino terminal ends.

Peptides corresponding to the sequences **86-106**, **90-106**, **92-106**, **98-106** and **101-106**, obtained after trypsin digestion of denatured PK-treated PrP^{Sc} were selected for quantitation. The corresponding peptide standards were synthesized, purified and quantitated by amino acid analysis. These were then used to develop a multiple reaction monitoring (MRM) quantitative method based on a calibration curve made by injection of the synthetic standards from 1 fmol to 150 fmol. The MRM method was then used to accurately determine the relative abundances of the peptides of interest in the 263K and the Dy strains.

Figure 6a shows that peptide 90-106 is the most abundant in strain 263K whereas peptides 101-106 and 92-106 are most abundant in Dy. The amount of peptide 98-106 is also significantly larger in Dy than in 263K. Amounts of 86-106 were similar in both strains. These results show that our analytical approach can readily distinguish the Dy and 263K strains of hamster prions. This conclusion was further supported by comparing in WB the fragments generated by PK and NTCB treatment of the two strains (Fig.6b).

Discussion

We provide here new experimental data for the development of more accurate models of PrP^{Sc}.

By using limited proteolysis and mass spectrometry in combination with NTCB treatment we were able to obtain structural information of the N-terminal half of the protein. We have found that (i) besides the cleavage sites described in the literature, new and more internal zones of PK-susceptibility exist in PrP^{Sc}; (ii) limited PK digestion of native 263K and Dy followed by NTCB treatment generates the same peptides in both strains, albeit in different relative proportions; (iii) quantitation of N-

terminal peptides allows discrimination between the two strains providing a new tool for differential diagnosis.

PK-susceptibility regions in PrP^{Sc}

Four regions of susceptibility can be identified in the PrP^{Sc} molecule: 23 to 101, 117 to 119, 131 to 142 and, the region around 154 (Fig.7). To define the latter, we have considered both results in this study and results in a previous study which identified residue 151 and 136 as highly susceptible to proteolysis in a PK-sensitive fraction of PrP^{Sc}²⁹. The rationale of combining NTCB treatment after partial proteolysis was to identify every possible peptide produced up to position cys-179 after PK treatment. A high background in the m/z range below 2000, characteristic of MALDI analysis in linear mode, limited our capacity to identify possible peptides generated by cleavage beyond position 162 approximately. Although PK is classified as non-specific protease, it has been reported to have a preference for the peptide bond on the C-terminal side of aromatic residues. The only aromatic residue in the region 70-101 is tryptophan, which occurs at residue 65, 73, 81, 89, and 99 whereas from position 117-154 there is Tyr-128, Phe-141, Trp-145, Tyr-149 and Tyr-150. The consistent detection of cleavages at positions 117, 119 or 135 implies cleavage after alanine or methionine. This fact rules out the possibility that other positions were not cleaved by PK despite being exposed to the enzyme. Our results are in good agreement with previous reports describing the presence of novel PK-resistant PrP^{Sc} cores in different PrP^{Sc} samples. Kocisko *et al*, using an antibody that recognizes an epitope in the 217-232 region, revealed the presence of at least 3 substantial additional carboxy-terminal fragments in ShaPrP treated with PK after deglycosylation, in addition to the classic 19 kDa fragment starting at position 90²⁸. One of such fragments, with a size of 16 kDa, was concluded to span approximately from residue 115 into the 217-232 region, and most likely corresponds to our detected 117-119 cleavage points. The abundance of this PK-resistant fragment increased after partial unfolding of Sha PrP^{Sc}. Two additional fragments detected by this antibody but not by another one that recognizes an epitope in the 143-156 region are suggestive of cleavages in this region. An additional 7 kDa PK resistant carboxy-terminal fragment has been described by Marsh³⁰ in both Drowsy and

ACCEPTED MANUSCRIPT

Hyper ShaPrP^{Sc}. We were able to reproduce and expand Kocisko's findings as it is shown in the WB of figure 3 where five bands besides the classical unglycosylated one can be clearly seen.

Zou et al. described two families of PK resistant fragments with N-termini at residues 162, 167 and 154, 156, respectively, in CJD samples³¹. 2-D electrophoresis analysis suggests that these fragments make up a sizeable fraction of the total amount of PK-resistant fragments, perhaps as much as 24%³². Further, Zanusso et al. described two additional families of 16-17 kDa and 17.5-18 kDa PK-resistant fragments in CJD samples³³. These species, which are recognized by carboxy-terminal specific antibodies, would correspond to cleavage near positions 135 and 141 respectively.

Using a similar approach to the one described here, Bocharova et al. identified the regions 138/141, 152/153, and 162 as PK-susceptibility regions in amyloid fibrils of recombinant PrP^{Sc}³²; in these fibrils, though, the region encompassing residues 89-138 is fully susceptible to proteolysis, in contrast with PrP^{Sc} where no cleavage has been found from residue 120-130. The precise structural relationship between PrP^{Sc} and recombinant PrP amyloid fibrils remains to be established.

Strain differences

Elucidating the fundamentals of strain differences is one of the major challenges in prion research. The fact that PK cleaves two different strains in the same exact places suggests a very similar tertiary structure for both of them, at least for the N-terminal half of the protein.

A 1-2 kDa difference in SDS-PAGE between 263K and Dy after PK treatment is routinely reported¹⁷. Quantitation of the N-terminal ragged ends showed a preponderance of cleavage at position 90 for 263K and position 101 for Dy. The ~1.1 kDa difference between these two positions could explain the migration difference in gel described so many times in the literature. Western blot with 3F4 antibody of PK and NCTB treated PrP^{Sc} support this conclusion (Fig.6b). This 1.1, rather than the often reported 2 kDa difference between strains is in agreement with the findings reported in the original report of Bessen et al³⁴. Differences observed between the abundance of particular peptides in 263K and Dy may have relevance to differential diagnosis.

Despite the similarities of both strains, quantitation of N-terminal ragged ends and WB with C-terminal antibody also suggests that subtle structural differences may exist in the 70-101 and 117-119 segments of the protein.

Fitting experimental data to structural models of PrP^{Sc}

The data reported here strongly suggest that the structure of PrP^{Sc} conforms to an architecture consisting of a series of β strands alternating with turns and loops. Similar architectural designs have been recently established by solid NMR studies for Het-s³⁵, Sup35p³⁶ and Ure2p³⁷ prions in their fibrillar forms, and for the amyloid forms of A β (1-40)³⁸, A β (1-42)³⁹, β -microglobulin⁴⁰, and synuclein⁴¹. A similar structural organization has been suggested for the amyloid form of the SH domain⁴² based on cryo-EM studies. Of note, in those cases in which limited proteolysis studies preceded subsequent ones based on the use of NMR techniques, very good agreement, within the limits of the lower resolution afforded by the first approach, were obtained⁴³. Among recent theoretical models proposed for PrP^{Sc}, one proposed by Prusiner and colleagues^{6,7} also conforms, in general terms, to such a structural design, with the particularity that short beta strands form a beta helix spanning from residue 89 to 174 (mouse numbering), interrupted by two loops, K₁₀₀-P₁₀₄, and E₁₄₅-R₁₆₃. While our data are indeed compatible with a loop-interrupted beta helix, cleavages at the 90-101 region, at 117, 119, 135, 139, and 142 do not appear compatible with the location of these residues in the middle of assigned β -strands in such model⁶. However, a modified version of the model in which the location of loops were changed to fit the susceptibility and resistance regions revealed by our study, can be easily envisioned. However, these new constraints might be difficult to accommodate in the suggested β -helical threading. Wasmer *et al*, using a variety of elegant solid NMR experiments, have determined that the structure of the fibrillar, propagative form of Het-s is a stackable, two-decker, irregular solenoid, with four short β -sheet strands per deck connected by turns and loops⁴⁴. Several charged residues, poorly compatible with a β -sheet conformation, are simply excluded from the strands, and located in short connecting loop-like segments; conceivably, PrP^{Sc} might be a complex, flexible solenoid similar to Het-s, rather than a canonical β -helix.

ACCEPTED MANUSCRIPT

FTIR studies indicate that PrP^{Sc} has a ~40% content in beta sheet^{4,5}; if the three relatively PK resistant stretches defined by our studies do indeed pinpoint regions of putative beta sheet secondary structure, and allowing for some uncertainty in the determination of the precise borders of these regions, these might correspond to about 24 residues in beta conformation, i.e., ~18%, which is lower than expected; this suggests that additional beta strands may exist. In this respect, although we do not have experimental data beyond position 154, PK-resistant cores beginning at positions 162 and 167 reported by Zou *et al.*³¹ in CJD and, the 7 Kda fragment seen in ShaPrP^{Sc} suggest alternation of beta strands and loops into the C-terminal region of PrP^{Sc}, although it is not certain whether such results can be extrapolated to ShaPrP.

In summary, we provide a new set of experimental structural constraints of PrP^{Sc}. While they are still clearly insufficient to allow the derivation of a complete PrP^{Sc} model, they should prove useful in constraining and testing models. Thus, our data are completely incompatible with the “spiral model” proposed by DeMarco and Daggett¹⁰, derived from *in silico* simulations and based on a continuum of laterally associated beta sheets. Key cleavage points detected in our studies lie in the middle of proposed β -sheet strands.

Our results suggest that PrP^{Sc} conforms to a succession of beta strand-turn/loop-beta strand assemblies, likely to be stacked forming more than one layer. Plausible specific structures conforming to such an architectural design include loop-interrupted solenoids. Additional experimental constraints obtained by deuterium exchange, chemical cross-linking⁴⁵, and electron microscopy studies are clearly needed, and will eventually converge in a definitive, experimentally based structural model of PrP^{Sc}.

Experimental procedures

Isolation of PrP^{Sc}

PrP^{Sc} was isolated from brains of terminally ill Syrian hamsters infected with either 263K or Drowsy strain of scrapie, using a slightly modified version²⁹ of the procedure of Diringer *et al*⁴⁶.

A cocktail of protease inhibitors (Complete, Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) at a final concentration of 1X was used in all buffers throughout the procedure up to the penultimate pellet, as defined in the mentioned study⁴⁶. The final pellet was resuspended in T8.5 containing 1% sarkosyl and no protease inhibitors, at concentrations between 1-2 µg/µl. The stock suspension thus prepared was aliquoted and frozen until further use; its purity was assessed by SDS-PAGE with Coomassie blue staining and MALDI, and estimated to be approximately 80%.

Western Blot Analysis

After PK treatment, Pefabloc was added to a final concentration of 2 mM. Samples were subsequently deglycosylated with PNGase F (New England Biolabs, Inc.), according to the manufacturer's instructions, and subjected to 16% acrylamide SDS-PAGE. Immunoblot was performed with C-terminal R1 antibody (InPro Biotechnology, Inc.) which recognizes an epitope in the region of residues 226-231, at 1:2500 dilution.

NTCB cleavage reaction

All buffers and reagents were prepared fresh for the NTCB reactions. Between 15-20 µg of purified PrP^{Sc} was reduced in 2 mM DTT for 1h at 37°C under denaturing conditions (6M guanidine and 100 mM Tris buffer pH 8.00). In the same buffer, samples were cyanylated in 10 mM 2-nitro-5-(thiocyanato)-benzoate (NTCB) for 30 minutes at RT. After methanol precipitation, samples were redissolved in 6M guanidine, 100 mM Tris buffer. PrP^{Sc}, specifically cyanylated at the reactive thiols, was cleaved by alkaline hydrolysis with 150mM NaOH for 15 minutes at 37°C. The NTCB reaction was terminated by addition of trifluoroacetic acid (TFA) to a final pH of 2-3. PrP^{Sc} peptides were

isolated from the reaction mixture using C-18 ZipTips™ (Millipore) according to the manufacturer's instructions. Peptides were eluted from the tips in 10 µl of 50% acetonitrile, 0.1% TFA and used directly for MALDI analysis; alternatively, the eluate was dried by centrifugal evaporation (Savant Speed-Vac).

MALDI

A 2 µL portion of PrP^{Sc} peptide sample was mixed with an equal volume of a saturated solution of sinapinic acid in acetonitrile and 0.1% aqueous TFA (1:2). One microliter of the mixture was spotted onto a Bruker sample plate, allowed to air-dry, and analyzed using a Bruker Autoflex MALDI instrument in linear mode. The laser frequency was 25 Hz; pulsed ion extraction was set at a value of 140-150 ns. Repeated laser shots, typically 25-30, were averaged.

Qualitative Mass Spectrometry: Nanospray LC/MS/MS

NanoLC-ESI-MS-MS was done with an Applied Biosystems (ABI/MDS Sciex, Toronto, Canada) Model QStar Pulsar equipped with a Proxeon Biosystems (Odense, Denmark) nanoelectrospray source. Redissolved PK-digested and NTCB cleaved PrP^{Sc} or trypsin digests (20µl) were loaded automatically onto a C-18 trap cartridge and after washing, the trapped peptides were chromatographed on a reversed phase column (Vydac 238EV5.07515, 75µ x 150 mm; Hesperia, CA) fitted at the effluent end with a coated spray tip (FS360-50-5-CE, New Objective Inc., Woburn, MA). An LC Packings nano-flow LC system (Dionex, Sunnyvale, CA) with autosampler, column switching device, loading pump, and nano-flow solvent delivery system was used to elute the column. Elution solvents were: A (0.5% acetic acid in water) and B (80% acetonitrile, 0.5% acetic acid). Samples were eluted at 250 nl/min with the following gradient profile: 8% B at 0 min to 80% B in a 15 min linear gradient; held at 80% B for 5 min then back to 8% B for 10 min. The QStar Pulsar was externally calibrated daily and operated above a resolution of 7,000. The acquisition cycle time of 6s consisted of a single 1s MS "survey" scan followed by a 5s MS/MS scan. Ions between m/z 400 to 1,000 of charge states between +2 to +5 having intensities greater than 40 counts in the survey scan were selected for fragmentation. The dynamic exclusion window was set to always exclude previously

ACCEPTED MANUSCRIPT

fragmented masses. Collision energy optimized for charge state and m/z was automatically selected by the Analyst QS 1.1 software after adjusting parameters to obtain satisfactory fragmentation of Glu fibrinogen peptide (+2), and ACTH (+3 and +4). Nitrogen was used for the collision gas and the pressure in the collision cell ranged from 3x10⁻⁶ to 6x10⁻⁶ torr. The externally calibrated TOF-MS survey scans of interest were averaged then processed with either the Peptide Reconstruct tool for scans containing peptides with molecular weights less than 4,000 dalton or with the Protein Reconstruct tool for scans containing peptides with molecular weights above 4,000 dalton.

Quantitative Mass Spectrometry: NanosprayLC MS/MS

NanoLC-ESI-MS-MS was done with an Applied Biosystems (ABI/MDS Sciex, Toronto, Canada) Model QTrap 4000 equipped with a Proxeon Biosystems (Odense, Denmark) nanoelectrospray source. For quantitation, an external calibration curve was created by a dilution series of each synthetic peptide analog. Peptide standards corresponding to the sequences **86-106**, **90-106**, **92-106**, **98-106**, and **101-106** of PrP were purchased from Anaspec (San Jose, CA). The identity of each synthetic peptide was confirmed by mass spectrometry and its purity determined to be greater than 90% as shown by LC-UV. A multiple reaction monitoring (MRM)-based quantitative method was developed⁴⁷.

Acknowledgements

We thank Isabel Magán, Noemi Ladra and Esteban Guitián from the USC Mass Spectrometry Core Facility for technical support in mass spectrometric analysis of samples.

This work was supported by Grants EET2001-4861 and BFU2006-04588/BMC from the Spanish Ministry of Science and Education and FP6 2004 FOOD 3B 023183 from the European Union.

References

1. Lopez, G. F., Zahn, R., Riek, R., & Wuthrich, K. (2000). NMR structure of the bovine prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 8334-8339.
2. Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez, G. F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G., & Wuthrich, K. (2000). NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 145-150.
3. Knaus, K. J., Morillas, M., Swietnicki, W., Malone, M., Surewicz, W. K., & Yee, V. C. (2001). Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 770-774.
4. Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., & . (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 10962-10966.
5. Caughey, B. W., Dong, A., Bhat, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F., & Caughey, W. S. (1991). Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* **30**, 7672-7680.
6. Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B., & Cohen, F. E. (2004). Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 8342-8347.
7. Wille, H., Michelitsch, M. D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F. E., Agard, D. A., & Prusiner, S. B. (2002). Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 3563-3568.
8. Anderson, M., Bocharova, O. V., Makarava, N., Breydo, L., Salnikov, V. V., & Baskakov, I. V. (2006). Polymorphism and ultrastructural organization of prion protein amyloid fibrils: an insight from high resolution atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* **358**, 580-596.
9. Tattum, M. H., Cohen-Krausz, S., Thumanu, K., Wharton, C. W., Khalili-Shirazi, A., Jackson, G. S., Orlova, E. V., Collinge, J., Clarke, A. R., & Saibil, H. R. (2006). Elongated oligomers assemble into mammalian PrP amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* **357**, 975-985.
10. DeMarco, M. L. & Daggett, V. (2004). From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 2293-2298.
11. DeMarco, M. L., Silveira, J., Caughey, B., & Daggett, V. (2006). Structural properties of prion protein protofibrils and fibrils: an experimental assessment of atomic models. *Biochemistry* **45**, 15573-15582.
12. Armen, R. S., DeMarco, M. L., Alonso, D. O., & Daggett, V. (2004). Pauling and Corey's alpha-pleated sheet structure may define the prefibrillar amyloidogenic intermediate in amyloid disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 11622-11627.
13. Langedijk, J. P., Fuentes, G., Boshuizen, R., & Bonvin, A. M. (2006). Two-rung model of a left-handed beta-helix for prions explains species barrier and strain variation in transmissible spongiform encephalopathies. *J. Mol. Biol.* **360**, 907-920.

ACCEPTED MANUSCRIPT

14. Sawaya, M. R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M. I., Sievers, S. A., Apostol, M. I., Thompson, M. J., Balbirnie, M., Wiltzius, J. J., McFarlane, H. T., Madsen, A. O., Riek, C., & Eisenberg, D. (2007). Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* **447**, 453-457.
15. Bessen, R. A. & Marsh, R. F. (1992). Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J. Virol.* **66**, 2096-2101.
16. Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F. E., & Prusiner, S. B. (1998). Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat. Med.* **4**, 1157-1165.
17. Caughey, B., Raymond, G. J., & Bessen, R. A. (1998). Strain-dependent differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 32230-32235.
18. Thomzig, A., Spassov, S., Friedrich, M., Naumann, D., & Beekes, M. (2004). Discriminating scrapie and bovine spongiform encephalopathy isolates by infrared spectroscopy of pathological prion protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 33847-33854.
19. Hubbard, S. J. (1998). The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1382**, 191-206.
20. Fontana, A., de Laureto, P. P., Spolaore, B., Frare, E., Picotti, P., & Zambonin, M. (2004). Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim. Pol.* **51**, 299-321.
21. Fontana, A., Zambonin, M., Polverino, d. L., De, F., V., Clementi, A., & Scaramella, E. (1997). Probing the conformational state of apomyoglobin by limited proteolysis. *J. Mol. Biol.* **266**, 223-230.
22. Fontana, A., Polverino, d. L., De, F., V., Scaramella, E., & Zambonin, M. (1997). Probing the partly folded states of proteins by limited proteolysis. *Fold. Des* **2**, R17-R26.
23. Fontana, A., Fassina, G., Vita, C., Dalzoppo, D., Zamai, M., & Zambonin, M. (1986). Correlation between sites of limited proteolysis and segmental mobility in thermolysin. *Biochemistry* **25**, 1847-1851.
24. Bahler, M., Benfenati, F., Valtorta, F., Czernik, A. J., & Greengard, P. (1989). Characterization of synapsin I fragments produced by cysteine-specific cleavage: a study of their interactions with F-actin. *J. Cell Biol.* **108**, 1841-1849.
25. Jacobson, G. R., Schaffer, M. H., Stark, G. R., & Vanaman, T. C. (1973). Specific chemical cleavage in high yield at the amino peptide bonds of cysteine and cystine residues. *J. Biol. Chem.* **248**, 6583-6591.
26. Bessen, R. A. & Marsh, R. F. (1994). Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J. Virol.* **68**, 7859-7868.
27. Tang, H. Y. & Speicher, D. W. (2004). Identification of alternative products and optimization of 2-nitro-5-thiocyanatobenzoic acid cyanilation and cleavage at cysteine residues. *Anal. Biochem.* **334**, 48-61.
28. Kocisko, D. A., Lansbury, P. T., Jr., & Caughey, B. (1996). Partial unfolding and refolding of scrapie-associated prion protein: evidence for a critical 16-kDa C-terminal domain. *Biochemistry* **35**, 13434-13442.
29. Pastrana, M. A., Sajjani, G., Onisko, B., Castilla, J., Morales, R., Soto, C., & Requena, J. R. (2006). Isolation and characterization of a proteinase K-sensitive PrP^{Sc} fraction. *Biochemistry* **45**, 15710-15717.
30. Bartz, J. C., Bessen, R. A., McKenzie, D., Marsh, R. F., & Aiken, J. M. (2000). Adaptation and selection of prion protein strain conformations following interspecies transmission of transmissible mink encephalopathy. *J. Virol.* **74**, 5542-5547.

31. Zou, W. Q., Capellari, S., Parchi, P., Sy, M. S., Gambetti, P., & Chen, S. G. (2003). Identification of novel proteinase K-resistant C-terminal fragments of PrP in Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Biol. Chem.* **278**, 40429-40436.
32. Bocharova, O. V., Breydo, L., Salmikov, V. V., Gill, A. C., & Baskakov, I. V. (2005). Synthetic prions generated in vitro are similar to a newly identified subpopulation of PrP^{Sc} from sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Protein Sci.* **14**, 1222-1232.
33. Zanusso, G., Farinazzo, A., Prelli, F., Fiorini, M., Gelati, M., Ferrari, S., Righetti, P. G., Rizzuto, N., Frangione, B., & Monaco, S. (2004). Identification of distinct N-terminal truncated forms of prion protein in different Creutzfeldt-Jakob disease subtypes. *J. Biol. Chem.* **279**, 38936-38942.
34. Bessen, R. A., Kocisko, D. A., Raymond, G. J., Nandan, S., Lansbury, P. T., & Caughey, B. (1995). Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* **375**, 698-700.
35. Ritter, C., Maddelein, M. L., Siemer, A. B., Luhrs, T., Ernst, M., Meier, B. H., Saupe, S. J., & Riek, R. (2005). Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion. *Nature* **435**, 844-848.
36. Shewmaker, F., Wickner, R. B., & Tycko, R. (2006). Amyloid of the prion domain of Sup35p has an in-register parallel beta-sheet structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 19754-19759.
37. Chan, J. C., Oyler, N. A., Yau, W. M., & Tycko, R. (2005). Parallel beta-sheets and polar zippers in amyloid fibrils formed by residues 10-39 of the yeast prion protein Ure2p. *Biochemistry* **44**, 10669-10680.
38. Petkova, A. T., Ishii, Y., Balbach, J. J., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Delaglio, F., & Tycko, R. (2002). A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 16742-16747.
39. Luhrs, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Dobeli, H., Schubert, D., & Riek, R. (2005). 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 17342-17347.
40. Iwata, K., Fujiwara, T., Matsuki, Y., Akutsu, H., Takahashi, S., Naiki, H., & Goto, Y. (2006). 3D structure of amyloid protofilaments of beta2-microglobulin fragment probed by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 18119-18124.
41. Heise, H., Hoyer, W., Becker, S., Andronesi, O. C., Riedel, D., & Baldus, M. (2005). Molecular-level secondary structure, polymorphism, and dynamics of full-length alpha-synuclein fibrils studied by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 15871-15876.
42. Jimenez, J. L., Guijarro, J. I., Orlova, E., Zurdo, J., Dobson, C. M., Sunde, M., & Saibil, H. R. (1999). Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *EMBO J.* **18**, 815-821.
43. Del Mar, C., Greenbaum, E. A., Mayne, L., Englander, S. W., & Woods, V. L., Jr. (2005). Structure and properties of alpha-synuclein and other amyloids determined at the amino acid level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 15477-15482.
44. Wasmer, C., Lange, A., Van Melckebeke, H., Siemer, A. B., Riek, R., & Meier, B. H. (2008). Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science* **319**, 1523-1526.
45. Onisko, B., Fernandez, E. G., Freire, M. L., Schwarz, A., Baier, M., Camina, F., Garcia, J. R., Rodriguez-Segade, V. S., & Requena, J. R. (2005). Probing PrP^{Sc} structure using chemical cross-linking

ACCEPTED MANUSCRIPT

and mass spectrometry: evidence of the proximity of Gly90 amino termini in the PrP 27-30 aggregate. *Biochemistry* **44**, 10100-10109.

46. Diringer, H., Beekes, M., Ozel, M., Simon, D., Queck, I., Cardone, F., Pocchiari, M., & Ironside, J. W. (1997). Highly infectious purified preparations of disease-specific amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleic acids of viral size. *Intervirology* **40**, 238-246.
47. Onisko, B., Dynin, I., Requena, J. R., Silva, C. J., Erickson, M., & Carter, J. M. (2007). Mass spectrometric detection of attomole amounts of the prion protein by nanoLC/MS/MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 1070-1079.

Figure Legends

Fig. 1. Concentration-dependent limited digestion of PrP^{Sc}. 263K **(a)** and Dy **(b)** PrP^{Sc} were treated with 1, 5 or 10 µg/ml of PK for 1h at 37°C as indicated in top right corner of the spectrum. Only peaks corresponding to peptides with a single PK cleavage (x-178) are indicated.

Fig. 2. (a) MALDI spectra of a Dy sample digested with 10µg/ml of PK for 1h at 37°C and treated with NTCB. Although less frequent, more internal cleavage sites like 131 and 154 were also detected. **(b,c)** NanoLC-ESI-q-TOF analysis of PrP^{Sc} PK limited digestion, Dy sample digested with 5µg/ml of PK for 1h at 37°C and treated with NTCB. For data processing, the TOF-MS scans in the region of the chromatogram in which the peptides of interest eluted were averaged. The averaged spectrum was then transformed from a m/z domain to a mass domain using the Bioanalyst v 1.1 Protein Reconstruct tool in case of figure **b** and Peptide Reconstruct tool in case of figure **c**. Protein Reconstruct algorithm will not work for low molecular weight peptides such as 154-178. The high sensitivity of this technique allowed detecting numerous N-terminal cleavage sites.

Fig.3. Western blot of purified 263K and Dy PrP^{Sc}. Samples were treated with 50, 200 and 1600 µg/ml of PK (lanes 1, 2, and 3, respectively) and subsequently deglycosylated. Samples were resolved on SDS-PAGE and PrP was detected with C-terminal antibody R1.

Fig. 4. Effect of guanidine-induced partial unfolding of PrP^{Sc} on its digestion by PK. 263K **(a)** and Dy **(b)** PrP^{Sc} were treated with none, 1M or 2M guanidine and then digested with 5µg/ml of PK for 1h at 37°C and treated with NTCB.

Fig. 5. Effect of different detergents on PrP^{Sc}. Western blot **(a)** showing effect of 1% sarkosyl and 0.1% BOG on PrP^{Sc} levels after centrifugation; r-pellet and s-supernatant. Samples were resolved on SDS-PAGE gels (15%), and PrP was detected with mAb 3F4. MALDI spectra **(b)** of Dy PrP^{Sc} resuspended in either 0.1%

ACCEPTED MANUSCRIPT

BOG or 1% sarkosyl, digested with 5 µg/ml PK and treated with NTCB.

Fig. 6. (a) Quantitation of amino terminal PK-generated ragged ends in 263K and Dy strains of PrP^{Sc}. **(b)** Western blot of N-terminally truncated fragments obtained after digestion of 5µg of 263K and Dy PrP^{Sc} with 5µg/ml PK and NTCB treatment (see diagram on top). Samples were resolved on SDS-PAGE gels (15%), and PrP was detected with mAb 3F4. Top band correspond to cleavages at and around position 90 whereas bottom band is most likely due to cleavage at position 101. This result correlates with the quantitation data where 263K and Dy strains can be clearly distinguished comparing cleavages at positions 90 and 101.

Fig. 7. Map of susceptibility of PrP^{Sc} to digestion by PK under limiting conditions. Red indicates PK-cleavage points detected several times; blue, PK-cleavage points detected once. Green indicates cleavage points detected in a previous study using trypsin in a PK-sensitive fraction isolated from PrP^{Sc}²⁹. Magenta indicates the two cysteines implicated in the disulfide bond and bold letters the glycosylation sites.

ACCEPTED MANUSCRIPT

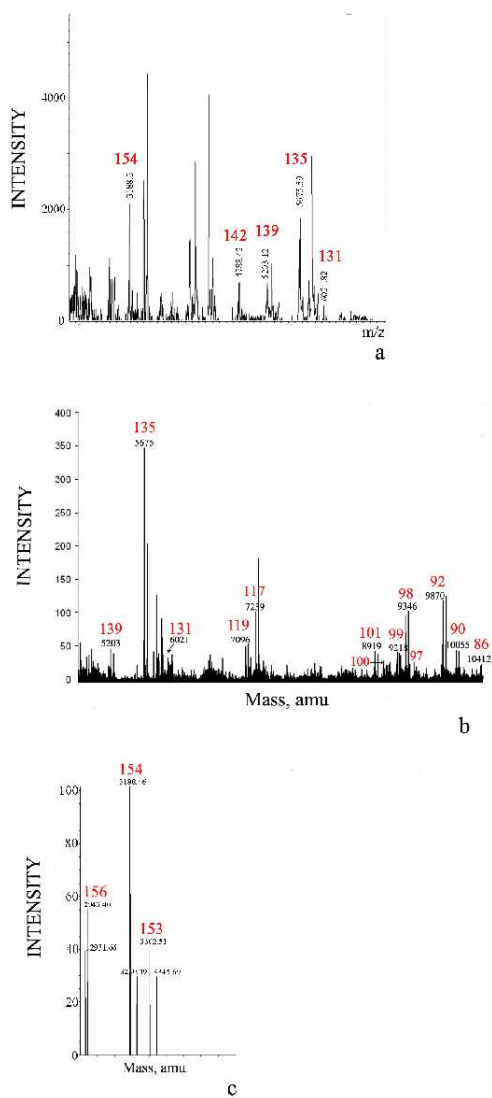


Fig.2

ACCEPTED MANUSCRIPT

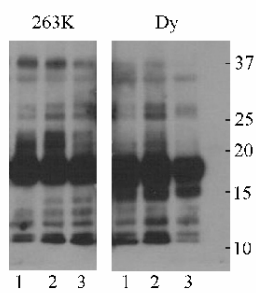


Fig.3

ACCEPTED MANUSCRIPT

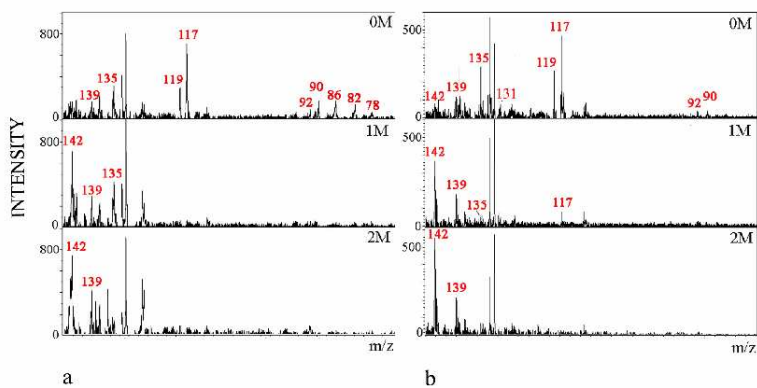


Fig.4

ACCEPTED MANUSCRIPT

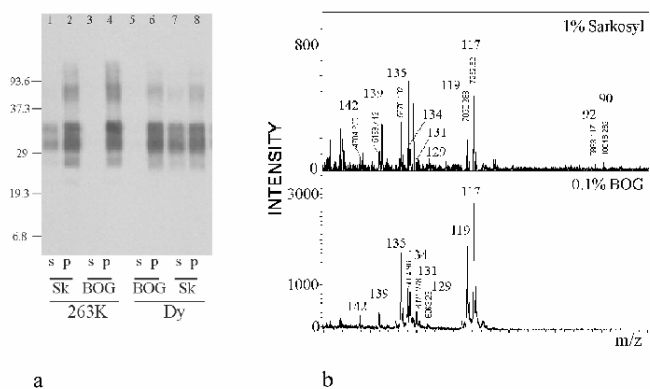
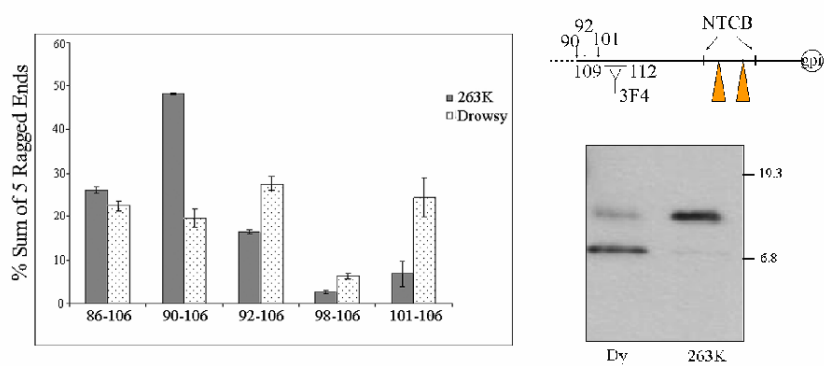


Fig.5



a

Fig.6

b

ACCEPTED MANUSCRIPT

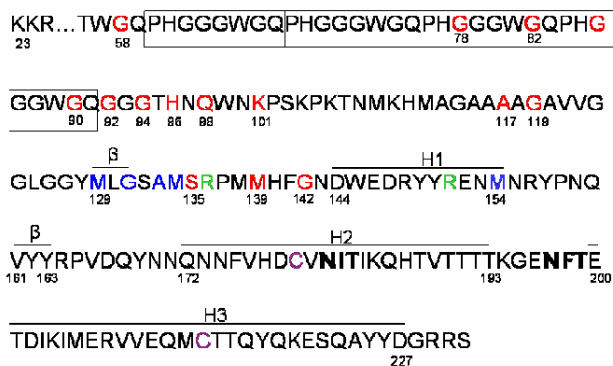


Fig.7

ANEXO II: Comunicaciones en congresos



Isolation of proteinase K sensitive PrP^{Sc}

Miguel A. Pastrana and Jesús R. Requena

Prion Research Unit, Departments of Microbiology and Medicine, School of Medicine, University of Santiago, Spain.

Summary

The abnormal isoform of the prion protein, PrP^{Sc}, has traditionally been defined, in an operational way, by its aggregated status and its characteristic high resistance to proteinase K (PK), properties that serve as a biochemical criterium to discriminate between this isoform and PrP^C. However, recent studies have identified a fraction of PrP^{Sc} that is sensitive to the standard PK treatment (sPrP^{Sc}) and suggest that this fraction corresponds to PrP^{Sc} with a lower degree of aggregation than that of PK resistant PrP^{Sc} (rPrP^{Sc}). A considerable interest can be attached to sPrP^{Sc} because: 1) it could be an important intermediate in the process by which PrP^C transforms into infectious, pathogenic PrP^{Sc}; 2) different PrP^{Sc} strains contain distinct, specific proportions of sPrP^{Sc}; 3) diagnostic assays for prion disease based on detection of PrP^{Sc} after treatment of samples with PK may obviously underestimate PrP^{Sc}; 4) this material should prove useful and versatile in future structural and analytical studies.

We reasoned that a fraction of sPrP^{Sc} might be isolated from PrP^{Sc} preparations by ultracentrifugation at intermediate speed. Our results show that the supernatant obtained under these conditions is sPrP^{Sc}, while the pellet is essentially rPrP^{Sc}, evidencing a positive correlation between resistance to PK and aggregation state.

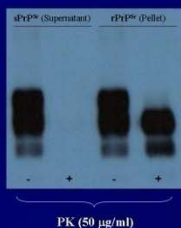


Fig. 1. Degradation of sPrP^{Sc} by PK at standard conditions (50 µg/ml; 37 °C; 1 h).

Experimental procedures

PrP^{Sc} was isolated from brains of terminally ill scrapie 263K-infected Syrian golden hamsters using a slightly modified version of the procedure of Dinger *et al.* (Intervirol 1997, 40: 238-246) in the presence of protease inhibitors.

In our final, optimized procedure, we centrifuged approximately 15 µg of PrP^{Sc} suspended in 50 µl of 1% Sarkosyl in a Beckman TLA-120-1 rotor at 40.000 rpm (maxRCF = 69709) for 2 hours at 20 °C. The supernatant was collected and the pellet was resuspended by sonication in 50 µl of 1% Sarkosyl.

Fractions of supernatant and pellet were treated with either PK or trypsin at 37 °C during 1 hour, subjected to SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using monoclonal antibody 3F4.

Conformation-dependent immunoblots were conducted according to the procedure of Sarhan *et al.* (Neurology 1990, 40: 110-117), briefly, two µl of each sample were spotted on a nitrocellulose membrane and incubated in PBS with or without 4M Guanidinium chloride (GndCl), after thorough washing, the membrane was probed with mAb 3F4.

Results

The supernatant obtained under the described conditions is sPrP^{Sc}, while the pellet is essentially rPrP^{Sc} (Fig. 1).

sPrP^{Sc} presents partial PK resistance under less drastic conditions (Fig. 2).

As opposed to rPrP^{Sc}, sPrP^{Sc} shows no conformational-dependent enhanced recognition by mAb 3F4 (Fig. 3).

sPrP^{Sc} is also fully susceptible to degradation by other proteases, such as trypsin (Fig. 4).

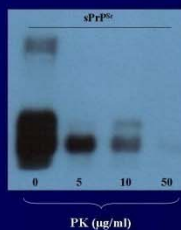


Fig. 2. sPrP^{Sc} is partially resistant to PK.

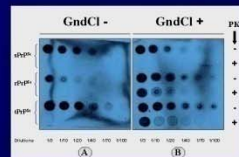


Fig. 3. Conformation-dependent immunoblots for sPrP^{Sc}, rPrP^{Sc} and total PrP^{Sc} (tPrP^{Sc}). Panel A: No GndCl pre-treatment. Panel B: 4M GndCl pre-treatment. Samples were treated with PK, (50 µg/ml; 37 °C; 1h) as indicated.

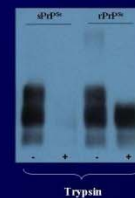


Fig. 4. Degradation of sPrP^{Sc} by trypsin (0.1 µg - 0.5 µg PrP protein).

Conclusions

- We have achieved isolation of an sPrP^{Sc} fraction.
- The procedure used for isolation of sPrP^{Sc} evidences a positive correlation between resistance to PK and aggregation state.
- sPrP^{Sc} should prove useful in future structural and analytical studies. Partial proteolysis studies aimed at characterising proteolytic susceptibility of specific residues are in course.

Supported by grant EET2001-4861, Ministerio Español de Ciencia y Tecnología (MCYT)

Insights of PrP^{Sc} structure obtained by limited proteolysis and mass spectrometry

Gustavo Sajani¹, Miguel Angel Pastrana¹, Irina Dynin², Jesus R. Requena¹, and Bruce Onisko²

¹Prion research unit, School of Medicine, University of Santiago, Santiago de Compostela, Galiza, Spain; ²Western Regional Research Center, USDA, Albany, California, USA.

Introduction

Even though the structure of PrP^{Sc} has been determined by NMR spectroscopy and X-ray crystallographic analysis, the structure of PrP^{Sc} has been much more difficult to determine. It has not been possible to resolve the tertiary structure of PrP^{Sc}, largely because of its insolubility and the failure of its heterogeneous aggregates to crystallize.

Recent reports have demonstrated the use of combining limited proteolysis and mass spectrometry to obtain information regarding the 3-D structures of proteins. Conformational parameters such as accessibility, segmental mobility and protrusion correlate well with limited proteolysis. Modelling experiments have demonstrated that peptide bonds located within β -strands are resistant to proteolytic cleavage whereas peptide bonds within loops and, to some extent, α -helices may be readily cleaved (Hubbard, BBA 1392:191-206, 1998). Furthermore, strain diversity in TSE has been suggested to be enciphered in the structure of the misfolded PrP^{Sc}.

In the present study, we intend to increase the knowledge of PrP^{Sc} protein structure by comparing the different N-terminal cleavage sites of two different PrP^{Sc} strains that differ significantly in incubation time and proteinase K (PK) sensitivity. To simplify the analytical challenge, we used 2-nitro-5-thiocyanatobenzoic acid (NTCB) after PK-treatment of PrP^{Sc} to cleave at the N-terminal side of cysteine 179. Since there are no carbohydrate chains before cysteine 179, this allowed identification of each amino terminal species as a unique peptide of sequence (to 179), where x is the amino terminal residue. Peptides were then analyzed by MALDI-TOF and nanoLC-ESI-QT of.

Recent studies have shown that a sizeable fraction of PrP^{Sc} present in prion-infected tissues is sensitive to digestion by PK. PK-sensitive PrP^{Sc} (sPrP^{Sc}) was obtained by differential centrifugation, at an intermediate speed, of Syrian hamster PrP^{Sc} obtained through a conventional procedure based on ultracentrifugation in the presence of detergents; sPrP^{Sc} is completely degraded under standard conditions (50 μ g/ml of PK at 37 $^{\circ}$ C for 1 h) and also can be digested by trypsin. This fact prompted us to study limited proteolysis experiments of sPrP^{Sc} using trypsin. This has allowed investigation of the susceptibility of individual tyrosine and arginine residues to cleavage, which has provided structural information.

Experimental procedures

PrP^{Sc} was isolated from Syrian hamsters inoculated with either 263K and Drowsy (Dy) prions. PK-treated PrP^{Sc} was denatured, reduced and treated with NTCB which caused peptide bond cleavage at cysteine residues.

Fragments were analyzed by MALDI on a Bruker Daltonics Autoflex instrument in reflectron mode; analysis by nanoLC-ESI-MS/MS was done using an Applied Biosystems Q-Star instrument.

sPrP^{Sc} was isolated from total PrP^{Sc} by ultracentrifugation at an intermediate speed. Briefly, a portion of PrP^{Sc} was homogenized by application of 3-4 sonication pulses of 1s each and spun in a ultracentrifuge at 40,000 rpm ($g_u = 56,806g$) for 2 hours at 20 $^{\circ}$ C. Peptide quantitation was done by nanoLC-MS/MS using an Applied Biosystems Model Q-Trap 4000 mass spectrometer operated in multiple reaction monitoring (MRM) mode. Quantitation of peptides was done by external calibration using purified synthetic peptides.

Results

MALDI-TOF and nanoLC-ESI-QT of analysis of PK-PrP^{Sc} reproduced previously observed cleavage sites for 263K (at 90 and 92), and for Dy (at 92, 98 and 101). However our data clearly demonstrate the existence of additional cleavage sites, such as 94, 96, 97, 99 and 100 in Dy and 98 and 101 in 263K. We have also found new "internal" cleavages at positions 117, 119 and 135 in both strains (Figs. 1 and 2).

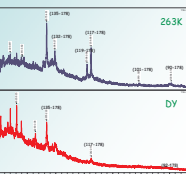


Fig. 1

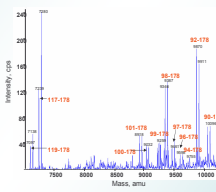
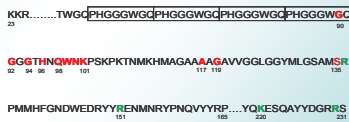


Fig. 2

We digested sPrP^{Sc} using trypsin to substrate ratios ranging from 1:2 to 1:2,000 and analyzed the reaction mixtures by nanoLC/MS/MS. The most susceptible trypsin cleavage sites were at positions 136 and 151. At higher concentrations of trypsin, additional cleavage sites were detected: 220 and 230 (Fig. 3).



Oral Abstracts

FC1.2

Limited Proteolysis of PrP^{Sc}: Alternating PK Resistant and Sensitive Segments Suggest a Beta Strand-turn-beta Strand Structural Core

Requena, JR¹; Sajjani, G¹; Pastrana, MA¹; Yeves, L¹; Onisko, B²; Dynin, F²

¹University of Santiago de Compostela, Medicine, Spain; ²USDA, Western Regional Research Center, USA

Elucidation of the structure of PrP^{Sc}, essential to understand the molecular mechanism of prion transmission, continues to be a major challenge in prion research. Limited proteolysis has been successfully used to obtain information on structural features of insoluble proteins. Proteolytic enzymes cleave proteins at exposed, flexible sites, while sparing rigid β -sheet stretches. We treated PrP^{Sc} isolated from 263K and Drowsy prion-infected hamsters with increasing concentrations of proteinase K (PK). After PK deactivation, PrP^{Sc} was denatured, reduced, cleaved at Cys179 with 2-nitro-5-thiocyanatonitrobenzoic acid (NTCB), and fragments analyzed by nanoHPLC-MS and MALDI. We detected peptides corresponding to the known amino-terminal cleavages at positions 86, 90, 92, 94, 96, 97, 98, 99 and 101 in both Dy and 263K PrP^{Sc}, although with different individual abundances. We also detected novel, albeit minor cleavage points at internal positions corresponding to two discrete regions: 117,119, and 135, 139, 142, in both strains, and detectable at early times. PK concentration-dependence analysis and limited proteolysis after treatment of PrP^{Sc} with 2 M guanidine, known to partially but not irreversibly unfold PrP^{Sc}, confirmed that only these cleavage sites are susceptible to PK, while interspersed segments remained spared.

These results place experimental constraints on PrP^{Sc} structural models, and are suggestive of a structure consisting of short β -sheet stretches connected by loops and turns, similar to the one recently derived from hydrogen exchange/solid NMR studies for the Het-s prion. The essential commonality of this structural arrangement, a stack of interdigitated pairs of β -sheet stretches, with essentially unchanged globular domains located in the periphery, extensive to other fibril-forming proteins such as A β (1-42) or Ure2p (10-39) is further suggested by recognition of PrP^{Sc} by generic amyloid-conformation specific antibodies. Our data also suggest that the overall structures of Dy and 263K PrP^{Sc} are very similar, with differences primarily in the 86-101 region.

Limited proteolysis of PK-sensitive PrP^{Sc} further supports a structure featuring beta sheet stretches interspersed with loops/turns for PrP^{Sc}

G. Sajnani, M.A. Pastrana, A. Ramos, E. Vazquez, I. Dynin, B. Onisko, J.R. Requena

Background: Partial resistance of PrP^{Sc} to PK revealed early on that it contains two domains, a highly sensitive one spanning up to residue ~90, probably structured as a random coil, and a very compact one spanning from that position to the C terminus. Using more resolute techniques, we identified regions exhibiting intermediate susceptibility to PK within the compact core, suggesting that the central part of PrP^{Sc} (residues ~90-178) conforms to an alternation of resistant beta stretches and more labile loops/turns. In the present study, we have aimed at extending our analysis to a PK-sensitive fraction of PrP^{Sc}, which can be completely and readily cleaved by PK, allowing a more extensive application of limited proteolysis protocols.

Objectives: While we have established that PK-sensitive PrP^{Sc} has converting activity *in vitro*, we first sought to confirm that it is infectious, to ensure that structural studies using it are fully relevant. After this, we probed its structure by limited proteolysis.

Methods: We isolated a PK-sensitive fraction of PrP^{Sc} by intermediate force centrifugation as described (Pastrana *et al.* Biochemistry, 45:15710-7, 2006). For infectivity studies, we inoculated 50/200 ug of it or of PK-resistant PrP^{Sc} to Syrian hamsters intracranially or intraperitoneally, respectively. For limited proteolysis studies, we treated PK-sen PrP^{Sc} with different concentrations of PK, and analyzed reaction products by WB and by mass spectrometry techniques.

Results and Discussion: All animals inoculated with PK-sen PrP^{Sc} succumbed to scrapie with similar/lower incubation times than to those inoculated with PK-resistant PrP^{Sc}. Analysis of proteolytic fragments at different PK concentrations and times confirmed the same regions of relative susceptibility and resistance previously seen in total PrP^{Sc}, albeit with different, faster kinetics. These results lend further support to the notion that the central structure of PrP^{Sc} consists of short beta sheet stretches interspersed with loops/turns.

