

***La Proteína Prión Humana: Del Paradigma
Conformacional Al Desarrollo De
Patologías Neurodegenerativas***

***Cátedra de Bioquímica de Macromoléculas, Licenciatura en Biotecnología,
Departamento de Ciencia y Tecnología***

Profesor titular: Dr. Mario R. Ermácora.

Profesor instructor: Dr. Javier Santos.

Julio del 2008.

Autores: María Belén Sabaini y Lucas Andrés Dettorre.

Índice

Introducción	2
Reseña historia	4
Estructura primaria de la PrP	5
Morfología estructural de la PrP	7
Localización y expresión de la PrP	9
Sitio de unión a cobre	10
Rol del puente disulfuro en la estabilidad y plegamiento de la PrP	12
Potenciales funciones de la PrP^C	14
Teorías del cambio conformacional de los priones	14
Desestabilización de la PrP^C debida a mutaciones del gen PRNP	15
Interacciones moleculares entre PrP^C y PrP^{Sc}	15
Procesos postraduccionales	17
Glicosilación de la PrP^C	17
Intermediario de plegado de la PrP	18
Intermediario de plegado en la reacción de oligomerización de la PrP	19
Rol de la hélice 1 en la patogénesis	24
Concepto de intermediario de plegado en la formación de estructuras priónicas y amiloides, integración termodinámica de los fenómenos involucrados	25
Conclusiones	28
Referencias	29

Introducción

Existe un grupo de enfermedades degenerativas del sistema nervioso central (SNC), que afectan al ser humano y a algunos animales, que poseen carácter transmisible y que se manifiestan mediante diversas formas clínicas. Desde el punto de vista patológico, se caracterizan por presentar astrocitosis reactiva, lesiones vacuolizantes (espongiformes) y depósitos amiloideos, en ausencia de reacción inflamatoria; entre su sintomatología se incluyen ataxia, temblor generalizado, alteraciones de la memoria, pérdida de coordinación, detrimento de las habilidades cognitivas, disfunción motora, demencia progresiva e, infaliblemente, la muerte. En conjunto, dichos cuadros patológicos se conocen bajo el nombre de enfermedades neurodegenerativas transmisibles, encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs), o simplemente enfermedades causadas por priones o prionopatías (EPRs). En el ser humano, las más destacadas son el kuru, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), el insomnio familiar fatal (IFF), la angiopatía amiloide cerebral causada por priones (AAC-PRP) y el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), y en animales, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB, conocida vulgarmente como “mal de la vaca loca”) y el scrapie (o prurito lumbar) en ovinos, siendo esta última la enfermedad en la que se han centrado la mayor parte de los estudios experimentales. A pesar de su capacidad de transmisión, no se ha demostrado convincentemente que estas patologías estén causadas por ningún agente microbiano convencional, y se supone que son ocasionadas por una proteína denominada “prión” (Prusiner, 1991 y 1995). Un prión se define como un agente patógeno infeccioso de estructura estrictamente proteica, resistente a los procedimientos que modifican o hidrolizan los ácidos nucleicos (Tyler et al, 1995). El término fue introducido por Prusiner en 1982, con el propósito de destacar que se trata de agentes distintos de virus y viroides. Justamente, la palabra prión resulta ser el apócope de la expresión *proteinaceous infectious particles* –del inglés: partícula proteica infecciosa- (Prusiner, 1987). Resultan sorprendentes dos hechos relacionados con estos procesos patológicos: en primer lugar, que el agente causal de la enfermedad sea una proteína transmisible que se multiplica en el huésped y que no se halla asociada a ácidos nucleicos, por lo que no parece un componente estructural o enzimático de un microorganismo o agente biológico convencional (virus, viroide u otro), y en segundo lugar, aparentemente, en contradicción con el anterior, algunas de las enfermedades englobadas en esta clasificación pueden presentarse de tres modos distintos: esporádicamente, por infección exógena o como una enfermedad familiar (genética, heredable) (Figura 1), siendo todas las formas transmisibles experimentalmente.

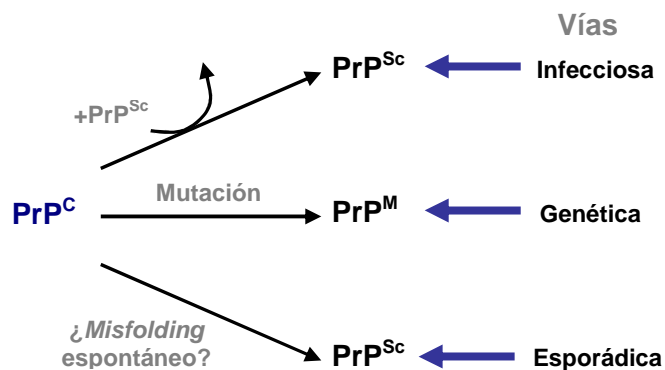


Figura 1. Vías de desarrollo de prionopatías. En la vía infecciosa, la conversión de PrP^{C} en PrP^{Sc} es iniciada por una semilla o núcleo de PrP^{Sc} preexistente y exógeno. En las EPRs heredables, la forma mutante de PrP^{C} (PrP^{M}) puede plegarse erróneamente y agregarse, y en ciertos casos, adquirir propiedades símil PrP^{Sc} capaces de desencadenar un cuadro patológico en animales receptores inoculados. En los casos esporádicos, el mecanismo de *misfolding* espontáneo es desconocido. Adaptado de Watts et al, 2006.

Sin embargo, ambos hechos podrían tener una explicación común. Las células del ser humano y de los animales producen en condiciones fisiológicas una proteína normal de elevada homología en todas las especies estudiadas, de 253-254 aminoácidos (33-35 kDa de masa); esta proteína se ha denominado PrP (proteína del prión). Si bien se desconoce su función fisiológica, se ha postulado que podría estar relacionada con el desarrollo neuronal, dado que su expresión es más abundante en las células del SNC que en otros tejidos. No obstante, animales transgénicos en los que se ha suprimido el gen que la codifica presentan un desarrollo normal. La proteína, también denominada PrP^{C} (c por celular), es procesada y exportada a la superficie celular, donde se une a un residuo de fosfatidilinositol glucosilado (GPI). Posteriormente, la proteína podría ser endocitada en vacuolas citoplásmicas y ser catabolizada o bien regenerada, volviendo a la superficie. En las preparaciones del tejido cerebral de los animales con scrapie se detectó una proteína con características fisicoquímicas diferentes a la PrP^{C} , ya que era resistente a las proteasas y a otras sustancias con actividad proteolítica (Bolton et al, 1982; McKinley et al 1983) y capaz de formar agregados y depósitos fibrilares (Prusiner et al, 1983; Merz et al, 1981). Presentaba la misma secuencia de aminoácidos que la PrP normal (PrP^{C}), pero había sufrido un cambio conformacional (de plegamiento) que podría justificar las diferencias con aquel, y se la denominó PrP^{Sc} (sc por scrapie). En las demás enfermedades degenerativas transmisibles se han hallado proteínas con estas características: igualdad de secuencia y cambio conformacional respecto a la PrP^{C} se han denominado según la enfermedad PrP_{ECJ} , PrP_{GSS} y otras, pero algunos autores, dada la homología de la secuencia primaria entre todas ellas, las denominan colectivamente PrP^{Sc} . Esta proteína constituiría el prión. Además de las evidencias epidemiológicas, estas enfermedades (humanas y animales) se han podido transmitir a animales de

experimentación, inicialmente ovejas y cabras. La posibilidad de transmitir el scrapie a pequeños roedores de laboratorio y reducir el tiempo de incubación de la enfermedad facilitó el análisis empírico de estos procesos (Kimberlin et al, 1977) y la obtención de cantidades sustanciales de proteína altamente purificada, y se observó que la proteína depositada intracelularmente es la PrP 27-30 (27-30 kDa), que es un fragmento (proteasa resistente con 67 aminoácidos menos) de la PrP^{Sc} (de 33-35 kDa). La PrP 27-30 sería un catabolito de la PrP^{Sc}; ambas son capaces de transmitir y reproducir la enfermedad (Pablos-Méndez et al, 1993). Como se ha señalado, no existen diferencias en la secuencia de aminoácidos entre la PrP^C y la PrP^{Sc} de una misma especie animal (y escasa diferencia interespecífica; aproximadamente 5-30 aminoácidos), ni tampoco se han detectado diferencias en la organización del gen en animales sanos o enfermos, lo que implicaría que la diferencia entre ambas no es una mutación, sino un plegamiento diferente de la proteína elaborada (Oesch et al, 1985).

En el presente trabajo, se discutirán los puntos de mayor relevancia concernientes a la proteína prión humana, en cuanto a su estructura, composición, localización y posibles funciones, con la finalidad de confluir en la problemática del plegado proteico y su impacto en el desarrollo de patologías neurodegenerativas asociadas al cambio conformacional de la proteína en cuestión. Para ello, se recabará información bibliográfica en la cual se discuta en profundidad cuestiones biofísicas inherentes a la PrP, de modo de fundamentar nuestras observaciones en base al estudio minucioso y experimental de la bioquímica de esta macromolécula.

Reseña historia

A mediados del siglo XVIII, se manifestaron las primeras referencias de enfermedades espongiiformes transmisibles, cuando ganaderos europeos describieron una enfermedad neurodegenerativa letal que afectaba a ovejas y cabras, la cual fue denominada "tembladera" (en inglés, *scrapie*). El cerebro de estos animales presentaba un aspecto de "esponja", del cual deriva el término "espongiiforme". Recién a principios del siglo XX, se detallaron los primeros casos de encefalopatía espongiiforme en humanos, padecimiento que fue bautizado como enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. Posteriormente, se demostró que estas enfermedades eran transmisibles.

El descubrimiento del agente patógeno fue atribuido a Stanley Prusiner en 1982, quien demostró que se trataba de partículas puramente proteicas, libres de ácidos nucleicos, y designó al agente infeccioso con el nombre de prión. Gracias a este descubrimiento, le fue otorgado el Premio Nobel de Fisiología o Medicina, en 1997.

Aunque la naturaleza del agente infeccioso aún era una incógnita, Prusiner sometió los priones a distintos tratamientos con el fin de alterar las proteínas, de modo tal de perturbar su capacidad infecciosa. Observó que perdían infectividad una vez tratados con fenol (agente desnaturizante de proteínas, pero no de ácidos nucleicos), aunque eran resistentes a algunos de los procesos de degradación proteica, en particular, al tratamiento con proteasas. Sin embargo, si los sometía a la acción de enzimas que atacaban a los ácidos nucleicos (ADN y ARN nucleasas), radiación UV o a la modificación con hidroxilamina, las partículas no perdían infectividad. Estos estudios llevaron a concluir que los priones eran partículas patógenas de naturaleza proteica y sin asociación a ácidos nucleicos (Prusiner, 1982). Este investigador consiguió, más adelante, infectar ratones con el prión de la tembladera, logrando un modo para reproducirlos, aislarlos y estudiarlos más a fondo (Prusiner, 1984).

Estructura primaria de la PrP

La proteína prión celular humana (hPrP^C o simplemente PrP^C) consta de 253 aminoácidos y, mediante secuenciación proteica y espectrofotometría de masas, se ha establecido que la PrP^{Sc} también contiene la misma cantidad de residuos, idénticos a los que se deduce de la secuencia del gen que codifica para la proteína prión normal. Ambas isoformas son codificadas por un único gen llamado PRNP, que en el ser humano se localiza en el brazo corto del cromosoma 20 (Caughey et al, 1988; Chesebro et al, 1985; Oesch et al, 1985). Este gen está presente en mamíferos, aves e incluso en los reptiles y la secuencia de aminoácidos para la cual codifica ha mantenido gran homología en la escala filogenética.

PrP^C y PrP^{Sc} poseen un peso molecular aparente de 33-35 kDa en geles de SDS poliacrilamida. Después del tratamiento con proteínasa K (serin hidrolasa de amplio espectro para la digestión general de proteínas en muestras biológicas), PrP^{Sc} se acorta a un tamaño de 27-30 kDa, en tanto que PrP^C desaparece como consecuencia de la digestión.

La PrP^C es sintetizada en los ribosomas del retículo endoplásmico (RE) y es translocada de manera cotraduccional al interior de esta organela, debido a la acción de una secuencia señal constituida por los primeros 22 aminoácidos del extremo amino terminal (N-terminal) de la proteína (Hölscher et al, 2001). Una vez dentro del RE, la secuencia señal (residuos 1-22) es escindida en forma proteolítica, como parte del procesamiento postraduccional normal al cual es sometido la proteína. De igual forma, ocurre la eliminación de 22 aminoácidos de su extremo carboxilo terminal (C-terminal). Luego del procesamiento de los fragmentos N- y C- terminales, tanto PrP^C

como PrP^{Sc} poseen un total de 209 residuos. El dominio C-terminal, un segmento altamente hidrofóbico, contiene una señal para la incorporación de una o dos cadenas de oligosacáridos conocidas como glicosilfosfatidilinositol (GPI), probablemente en la serina número 231 (Prusiner, 1982, 1984, 1995, 1998; Coria, 2002). El GPI se une covalentemente a los lípidos de la membrana plasmática de las células, de manera que la proteína queda expuesta al medio extracelular. Cerca del extremo N-terminal, se localiza una región que contiene de 5 a 6 repeticiones en tandem del octapéptido PHGG(G/S)WGQ (entre los residuos 60 y 93), rico en aminoácidos prolina y glicina. Además, posee una secuencia homóloga que ha perdido un residuo de histidina (PQGGGGWGQ, entre los residuos 52 y 60). Este dominio, junto con dos residuos de histidina en las posiciones 96 y 111, constituye un sitio de unión de Cu²⁺. Por otra parte, el dominio N-terminal posee además una secuencia palindrómica, AGAAAAGA, que podría estar involucrada en la fibrillogénesis (Jobling et al, 1999).

Continuando con el análisis de la secuencia aminoacídica, luego de las repeticiones octapeptídicas, la PrP posee un segmento central, altamente conservado, rico en aminoácidos hidrofóbicos (aminoácidos 110/113 a 128). Esta secuencia constituye un dominio transmembrana.

La PrP^C muestra dos sitios susceptibles de glicosilación. Como se analizará posteriormente, este evento postraduccional se produce particularmente en forma de N-glicosilación, en las asparaginas 181 y 197. Por último, cabe destacar la formación de un único puente disulfuro entre los residuos de cisteína 179 y 214.

La Figura 2 muestra un esquema lineal de la estructura primaria de la PrP^C y algunos elementos de secuencia anteriormente descriptos.

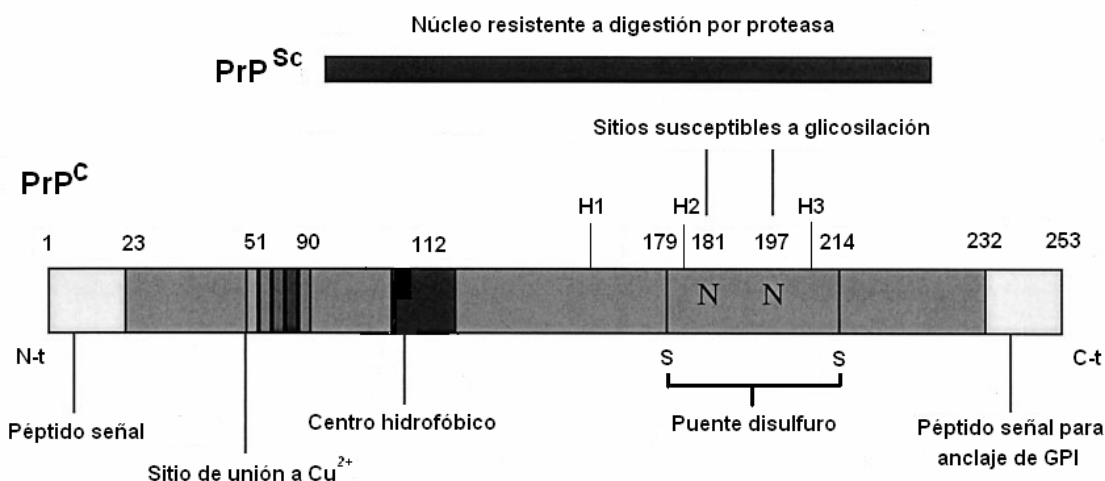


Figura 2. Estructura primaria de la proteína príon (PrP^C). N-t: extremo amino terminal; C-t: extremo carboxilo terminal; N: Asparagina; S: azufres de residuos de cisteína, involucrados en el puente disulfuro; GPI: glicosilfosfatidilinositol; H1, H2, y H3: regiones de estructura secundaria alfa helicoidales características. Además se muestra una comparación con el núcleo resistente a proteinasa de PrP^{Sc}. Los números de la figura indican la posición en la cadena polipeptídica. Tomado de Brown, 2001.

Morfología estructural de la PrP

En condiciones normales, la molécula de PrP^C adopta una disposición enmadejada, plegada en múltiples hélices (espirales o cilíndricas) denominadas hélices- α . Dado que no ha sido posible producir cristales de la proteína priónica, la estructura tridimensional de la PrP^C se ha estudiado principalmente por resonancia magnética nuclear (RMN). Estos estudios señalan que la hPrP^C posee un dominio desestructurado N-terminal, que involucra por los residuos 23-119, y un dominio globular C-terminal, que se extiende desde el aminoácido 125 hasta el 231. Este último dominio presenta tres estructuras α -hélice en los residuos 143-153, 171-192 y 199-226 (H1, H2 y H3, respectivamente), y dos láminas β -plegada antiparalelas localizadas en los residuos 128-131 y 160-163 (S1 y S2, respectivamente) (James et al, 1997; Riek et al, 1997). Además, puede ser dividido en dos subdominios: un subdominio largo en forma de hebilla (*hairpin*), constituido por la H1 y las laminas antiparalelas, y un subdominio puramente alfa helicoidal, que contiene las estructuras H2 y H3 (Jamin et al, 2002). Asimismo, dentro de este dominio C-terminal, se han localizado tres regiones de irregularidad estructural: la primera consta de un asa compuesta por los aminoácidos 167-171, la segunda comprende a los aminoácidos 187-194 y la tercera, a los residuos 219-228.

Por otra parte, estudios de un PrP sintético han demostrado la existencia de una región adicional que no se dispone en hélice- α , la cual está comprendida por los residuos 90-145. Dentro de esta secuencia, los aminoácidos 113-128 están muy conservados, y como ya se ha mencionado, corresponden a una región transmembrana.

PrP^C y PrP^{Sc} han podido ser diferenciadas experimentalmente gracias a que ambas isoformas difieren notablemente en sus propiedades fisiológicas y conformacionales. Estudios de dicroísmo circular (CD) en el UV lejano, han permitido determinar la composición en cuanto al contenido de estructura secundaria presente en cada una de las variantes, permitiendo su fácil diferenciación: PrP^C está compuesta por un 42% de estructuras α -hélices y un 3% de láminas β -plegada, mientras que PrP^{Sc} está formada por un 43% de hojas β -plegada y 30% de hélices α . La Figura 3 muestra los espectros característicos de CD en el UV lejano para las isoformas evaluadas.

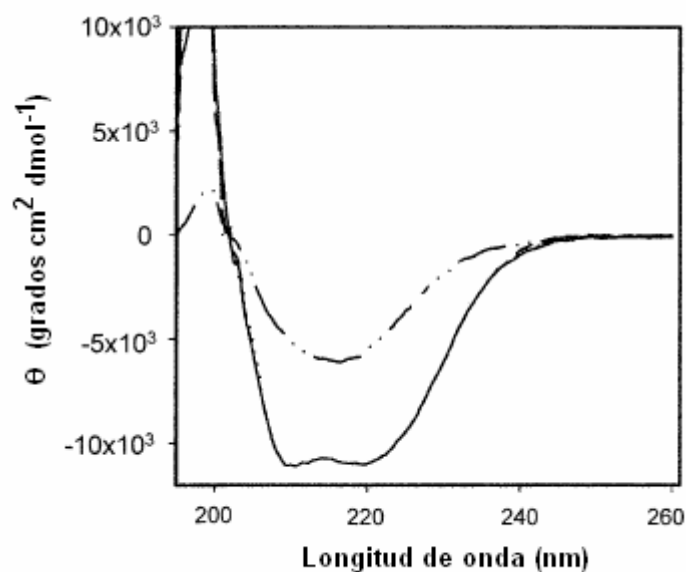


Figura 3. Espectros de CD en el UV lejano característicos de PrP^C y PrP^{Sc}. El espectro de línea llena corresponde a la isoforma normal caracterizada por un alto contenido de α -hélices. Se observan las bandas típicas de este tipo de estructura secundaria: bandas negativas a 208 y 222 nm y banda positiva a 190 nm. El espectro de línea punteada corresponde a la isoforma scrapie caracterizada por un alto contenido de hojas- β . Se observan las bandas típicas de láminas beta: banda negativa a 215-218 nm y banda positiva en torno a los 195 nm. Adaptado de Baskakov et al, 2004.

La Figura 4 muestra las estructuras tridimensionales propuestas para las isoformas anteriormente mencionadas. En la Tabla 1 se apuntan las diferencias más significativas existentes entre ambas.

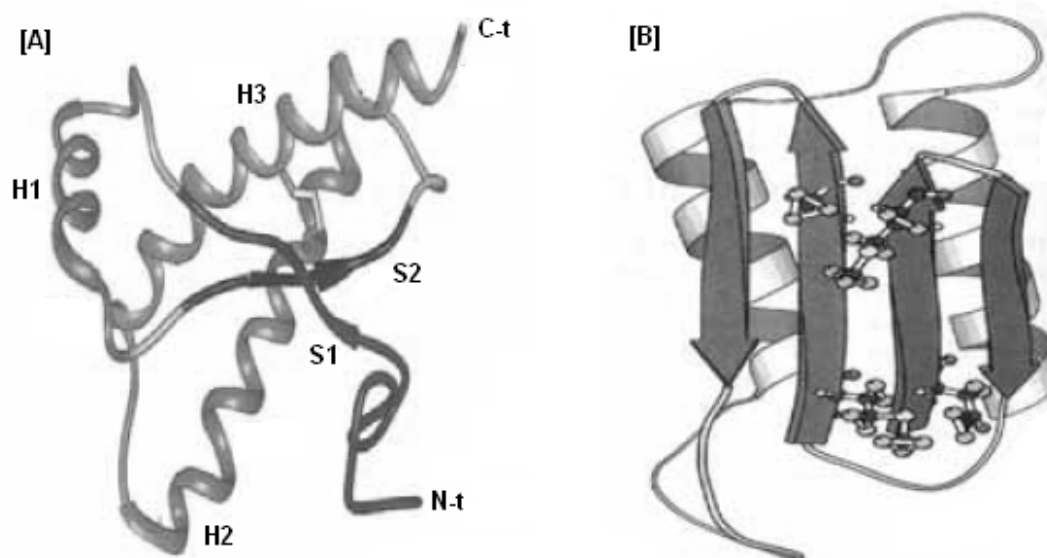


Figura 4. Modelos postulados para la estructura terciaria de PrP^C y PrP^{Sc}. [A]: Estructura tridimensional de la PrP^C. N-t: extremo amino terminal; C-t: extremo carboxilo terminal; H1, H2 y H3: regiones de estructura secundaria en α -hélice; S1 y S2: hojas β antiparalelas 1 y 2. Propuesto por Huang et al, 1994. [B]: Modelo tridimensional de la PrP^{Sc}, propuesto por Huang et al, 1996. Adaptado de Prusiner, 1996.

Proteína priónica celular (PrP ^C)	Proteínas priónica <i>Scrapie</i> (PrP ^{Sc})
Forma normal o fisiológica	Forma anormal o patógena
No transmisible	Transmisible
Anclada a membrana por un grupo GPI	Libre y agregable extracelularmente
Rica en hélices- α	Rica en hojas- β
Sensible a proteasas	Parcialmente resistente a proteasas
Sensible a agentes físicos y químicos y a tratamientos estándar de desinfección	Resistente a radiación ionizante, ultravioleta y a tratamientos estándar de esterilización.

Tabla 1. Características fisicoquímicas y estructurales de PrP^C y PrP^{Sc}.

Localización y expresión de la PrP

La PrP^C puede hallarse anclada a las membranas plasmáticas celulares, habiéndose reportado la mayor concentración en las neuronas, particularmente en las membranas pre y post-sinápticas, lo que sugiere que posee importancia en el funcionamiento de éstas (Brown, 2001). También se ha encontrado en las células dendríticas, en las uniones neuromusculares, en varios tejidos periféricos y en los leucocitos (Brown et al, 1997). En el cerebro de ratones y embriones de pollo, el mRNA de la PrP se detecta al comienzo de la embriogénesis, incrementándose sus niveles en dichas localizaciones a medida que tiene lugar el desarrollo embrionario. En el sistema nervioso central (SNC) de animales adultos, la PrP y su mRNA están ampliamente distribuidos, aunque se concentran particularmente en la región neocortical y el hipocampo, en las células de Purkinje del cerebelo y en las neuronas motoras espinales (Rodríguez Ferri, 2001). Por otra parte, estudios recientes han demostrado que esta isoforma normal de la PrP se expresa considerablemente en las células del epitelio intestinal, distribuyéndose predominantemente sobre la membrana apical de este tipo celular. Esto permitiría explicar como, durante la ingestión oral, la PrP^{Sc} exógena es capaz de propagarse desde el tracto gastrointestinal al sistema nervioso, debido a su interacción y posterior conversión de la PrP^C del epitelio del huésped (De Keukeleire et al, 2007).

Por su parte, la PrP^{Sc}, puede localizar dentro de la célula, en estructuras del sistema endocítico, y extracelularmente, formando placas amiloides. Según se desprende del uso de ratones transgénicos, esta isoforma se localiza en el cerebro, principalmente en el interior de las neuronas. Además, puede presentarse en tejido nervioso, muscular y en células del sistema inmunitario (Horiuchi et al, 2004). Por otra parte, mediante estudios de inmunofluorescencia efectuados sobre cultivos de células infectadas, se ha verificado cierta acumulación de la isoforma en el aparato de Golgi. También se ha localizado PrP^{Sc} a nivel endosómico y lisosómico. Otra técnica aplicada al estudio del prión scrapie (tanto de origen infeccioso como mutante), es la tinción inmune con oro en la superficie celular.

Sitio de unión a cobre

Como ya hemos discutido, la PrP es capaz de interactuar con iones cúprico mediante una región circunscripta en su dominio N-terminal, que consta de repeticiones octapeptídicas en tandem. La unión del cobre a esta secuencia repetitiva es fácilmente detectable mediante ensayos de espectroscopía de masas, empleando péptidos sintéticos que representan el octapéptido del dominio en cuestión. Tal como se observa en la Figura 5, la solución conteniendo un tri-octapéptido en agua (Figura 5A), revela un único pico en el espectro obtenido, correspondiente a la secuencia polipeptídica. En cambio, luego de la adición de CuSO_4 a la solución, se observan tres picos adicionales, los cuales poseen relaciones m/z correspondientes a la unión del péptido a 1, 2 y 3 átomos de cobre, respectivamente (Figura 5B). Esto indica que cada ion Cu^{2+} puede unirse a una sola unidad repetida, es decir, un catión por cada octapéptido. Por otro lado, los espectros obtenidos luego de la incubación del péptido con iones Zn^{2+} y Mn^{2+} (Figuras 5C y 5D, respectivamente) muestran que, para estos últimos, únicamente aparecen dos picos adicionales, lo que indicaría que sólo dos cationes de cada especie se une a la secuencia tri-octapeptídica.

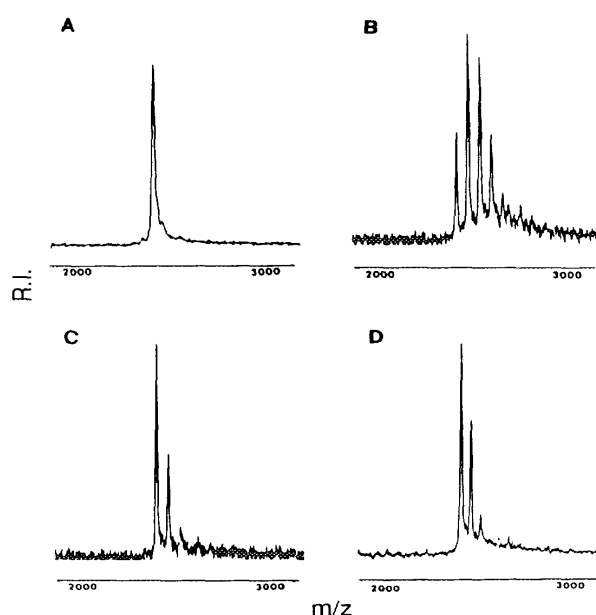


Figura 5. Espectros MALDI TOF MS para el tri-octapéptido. [A]: péptido en agua, en ausencia de sales; [B]: en 10 mM de CuSO_4 ; [C]: en 10 mM de ZnSO_4 ; [D]: en 10 mM de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mn}$. Tomado de Hornshaw et al, 1995.

Estos experimentos indican que la proteína príon muestra una mayor afinidad por el ion cúprico respecto de los otros cationes evaluados (Hornshaw et al, 1995).

Por otra parte, a pH neutro (pH 7,4), la unión del dominio N-terminal a cationes Cu^{2+} es coordinada por un solo grupo imidazol, dos grupos amida desprotonados de los residuos de Gly y un oxígeno carboxilo (Figura 6B). Este modo de coordinación permite la unión de hasta 6 iones Cu^{2+} a la proteína en estudio. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que a concentraciones saturantes de Cu^{2+} y pH levemente ácido (pH 5,5) se produce un modo alternativo de coordinación (Wells et al, 2006). En este nuevo modelo, se supone que la proteína se une únicamente a dos cationes cúprico, mediante la coordinación del metal por los seis residuos de His del dominio desplegado N-terminal y el grupo amino terminal de la PrP^{C} (Figura 6A).

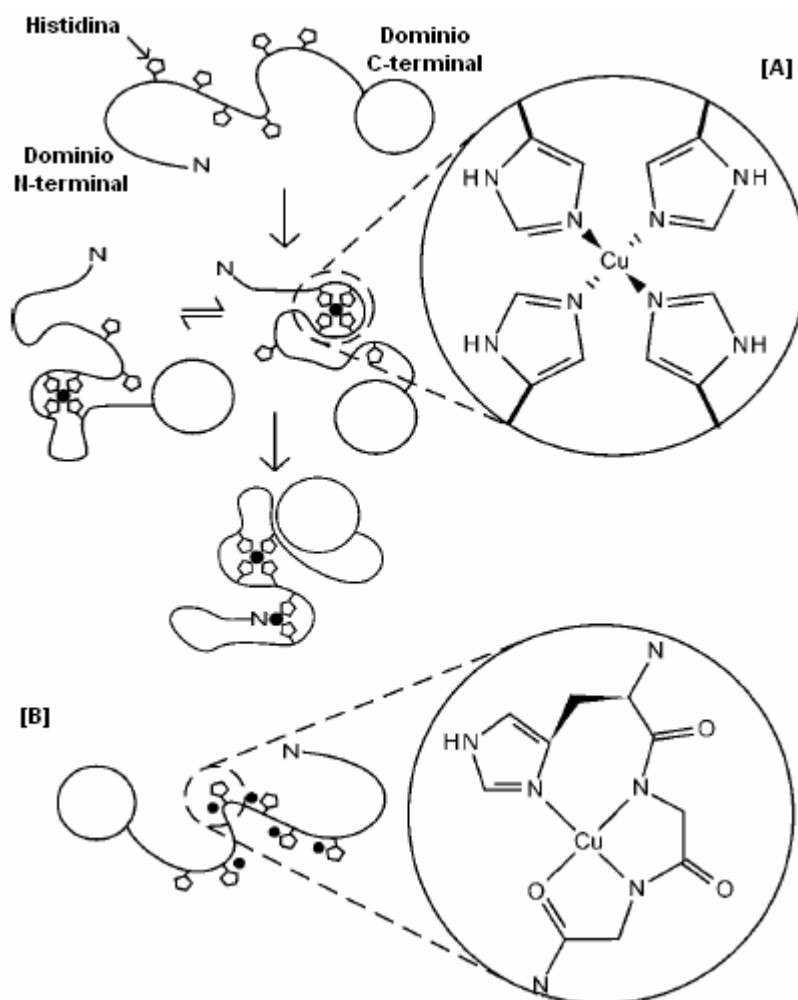


Figura 6. Modelos de coordinación de Cu^{2+} a las repeticiones octapeptídicas de la PrP. [A] La unión de Cu^{2+} a la PrP, a pH 5,5, involucra la coordinación mediada por combinación por intercambio de los grupos imidazólicos de los residuos de histidina. Se muestran la apo-PrP (parte superior), el ensamblaje PrP-Cu^{2+} (al medio) y el complejo PrP-2Cu^{2+} (parte inferior). Se observa, además, que en la coordinación de cada ion, múltiples His actúan como ligandos. [B] A pH 7,4, en condiciones saturantes de cobre, la PrP puede unir al menos cinco iones Cu^{2+} , cada uno coordinado por un único grupo imidazol y por enlaces peptídicos circundantes. Adaptado de Wells et al, 2006.

Asimismo, los datos revelan que la unión de Cu^{2+} a la proteína príon impide la libre asociación de la proteína in vitro, lo que sugiere que el ión metálico puede desempeñar un papel importante en el control de la oligomerización in vivo.

Rol del puente disulfuro en la estabilidad y plegamiento de la PrP

La PrP posee un puente disulfuro nativo formado por los residuos de cisteína 179 y 214. En la proteína PrP^C plegada, este enlace covalente se encuentra inmerso en un ambiente hidrofóbico y no es accesible a los agentes reductores como el DTT. Sin embargo, el puente disulfuro es fácilmente reducido si la proteína es tratada con dicho agente en presencia de urea 8 M o cloruro de guanidinio (GuHCl) 6 M. Numerosos trabajos han estudiado, en forma rigurosa, el efecto del puente disulfuro sobre la conversión PrP^C → PrP^{Sc}. Para ello, se analizó el plegado y estabilidad de la PrP humana recombinante portando su puente disulfuro nativo, forma oxidada (PrP^{ox}), su forma reducida, con sus Cys libres (PrP^{red}) y una mutante a la cual se le sustituyeron ambos residuos de Cys por dos residuos de Ala (C179A /C214A). A pH neutro, los intentos de *refolding* mediante diálisis (10 mM fosfato de sodio, pH 7.0) de las variantes PrP^{red} y la doble mutante, resultaron en una precipitación de las proteínas, sin dejar material en forma soluble. Además, ambas generaron agregados amorfos, caracterizados por una transición a conformaciones ricas en estructuras beta, la cual mostró estar invariablemente asociada a procesos de oligomerización. En contraste con los resultados obtenidos a pH neutro, la diálisis llevada a cabo en condiciones ácidas (10 mM de acetato de sodio, pH 4,0) no dio lugar a una precipitación visible de las proteínas. Es decir, ambas fueron capaces de replegarse en condiciones ácidas suaves. Sin embargo, luego de la remoción completa de la urea, las muestras se observaron ligeramente turbias, lo que indica que al menos una fracción de la proteína se ha agregado. Ensayos de SEC-FPLC (Figura 7) revelaron la presencia de una proteína monomérica con un radio de Stokes aparente de 28 Å. Comparando este valor con el correspondiente a la proteína oxidada de tipo salvaje (24 Å), se verifica que la pérdida del puente disulfuro en la proteína prión estaría asociada a una transición hacia una conformación menos compacta.

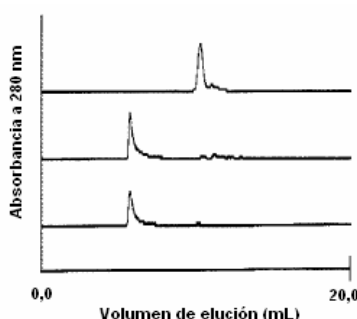


Figura 7. Perfiles de la cromatografía de exclusión molecular para la proteína wild type con los puentes disulfuros nativos (arriba), PrP^C reducida con DTT (medio) y la variante C179A/C214A (abajo). La proteína de tipo salvaje con los disulfuro nativos eluye como proteína monomérica (volumen de elución de 10,2 mL), mientras que la reducida y la mutante eluyen en el volumen muerto de la columna (5,6 mL). El tamaño límite de exclusión de la columna Bio-Sil-250 SEC empleada, es de 600 kDa de proteínas globulares. Adaptado de Maiti y Surewicz, 2001.

Por otra parte, se observó, mediante diversos análisis espectroscópicos, que las formas monoméricas de las variantes anteriores mostraron características de glóbulo fundido, entre ellas, interacciones terciarias comprometidas (Figura 8B), incremento de la superficie hidrofóbica expuesta (Figura 8C), ausencia de una transición cooperativa en presencia de urea (Figura 8D) y pérdida parcial de estructura secundaria (Figura 8A). En conjunto, los resultados anteriores permitieron verificar que la remoción del puente disulfuro desestabiliza la estructura nativa.

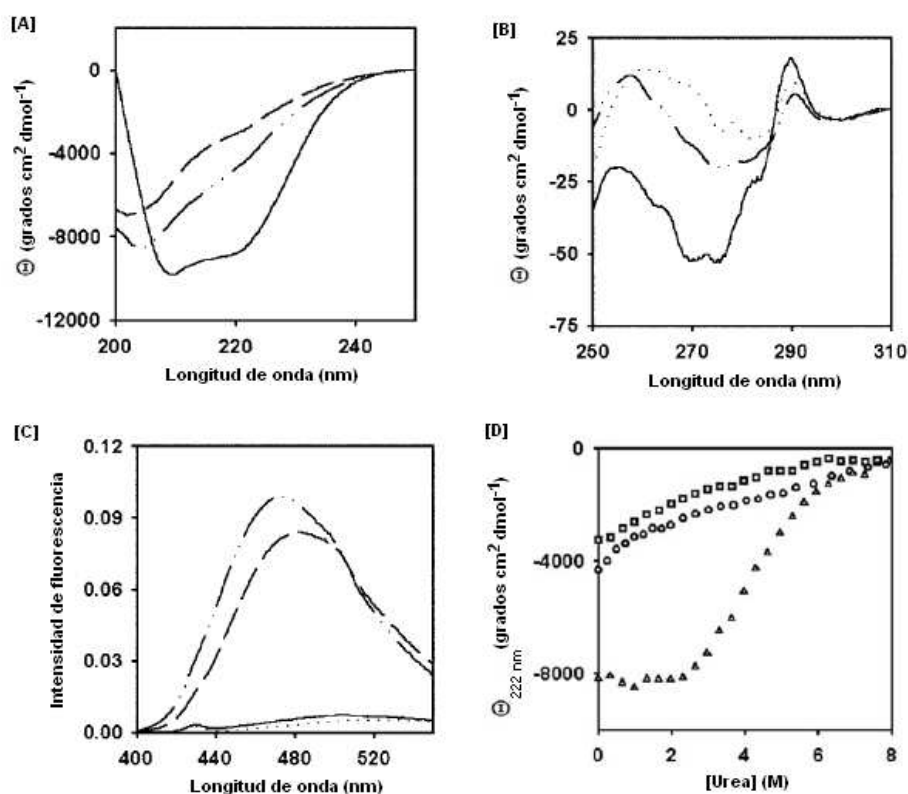


Figura 8. Caracterización espectroscópica de la variante de PrP^C wild type portando su puente disulfuro nativo, la variante reducida (PrP^{ox} y PrP^{red}, respectivamente), y de una mutante doble, libre de Cys (C179A/C214A). [A]: Espectros de CD en el UV lejano de PrP^{ox} (línea llena), de PrP^{red} (líneas a rayas) y de C179A/C214A (línea a rayas y puntos). Espectros obtenidos a pH 4, en buffer acetato de sodio 10 mM. Se observa pérdida de elementos de estructura secundaria en las variantes PrP^{red} y C179A/C214A respecto de PrP^{ox}, mostrando, a priori, el efecto estabilizante del puente de disulfuro [B]: Espectros de CD en el UV cercano de PrP^{ox} (línea llena), de PrP^{red} (líneas a rayas) y de C179A/C214A (línea a rayas y puntos). Se grafica, además, como referencia, el espectro de la PrP desplegada en urea 8 M (línea punteada). En forma análoga al caso anterior, se observa menor grado de organización de la estructura terciaria en las variantes PrP^{red} y C179A/C214A respecto de PrP^{ox}. [C]: Espectros de fluorescencia de ANS en presencia de PrP^{ox} (línea llena), de PrP^{red} (líneas a rayas) y de C179A/C214A (línea a rayas y puntos). Se muestra, además, el espectro de fluorescencia del ANS en ausencia de proteína. Se verifica un aumento de la intensidad de la señal para las variantes PrP^{red} y C179A/C214A, respecto de la forma portando el disulfuro nativo intacto, posiblemente debido a un aumento de la accesibilidad de la sonda al core hidrofóbico, lo cual habla de una mayor inestabilidad de la conformación de dichas variantes. La longitud de onda de excitación empleada fue 375 nm. [D]: Curvas de *unfolding* inducidas por urea para las formas PrP^{ox} (triángulos), de PrP^{red} (cuadrados) y de C179A/C214A (círculos). Los ensayos fueron llevados a cabo en buffer acetato pH 4; el grado de desplegado fue monitoreado mediante medición de elipticidad a 222 nm. Nuevamente, se demuestra la mayor inestabilidad de las formas reducida y libre de Cys, que muestran una mayor sensibilidad al caótopo, es decir, se verifica pérdida de estructura alfa helicoidal (pérdida de señal a 222 nm) aun a bajas concentraciones de urea, en las cuales la forma nativa oxidada continúa plegada. Adaptado de Maiti and Surewicz, 2001.

Potenciales funciones de la PrP^C

Actualmente, las funciones biológicas de PrP^C son poco claras. Sin embargo, dado que su secuencia aminoacídica es altamente conservada entre especies, se sugiere que posee especial importancia en procesos fisiológicos. Como ya se ha mencionado, ésta proteína liga iones de cobre, lo cual estimula la endocitosis de la PrP^C desde la superficie celular de manera rápida e irreversible (Quaglio et al, 2001). Esto indicaría la posibilidad de que esta proteína funcione como receptor celular de Cu²⁺, asignándole un papel activo en la homeostasis de este catión implicado en procesos de oxidación-reducción (Brown et al, 2001).

Además, se ha propuesto que la función de PrP^C es “suavizar” las respuestas de las neuronas para evitar el daño que les causaría estar activas demasiado tiempo. Es decir, actúa como transductor de señales intracelulares para la protección de las células nerviosas. De este modo, tanto la falta de estas proteínas como su funcionamiento incorrecto, causarían la pérdida de dicha función protectora. Esto último constituiría parte del motivo por el cual, en prionopatías, las neuronas de los pacientes mueren. Y con ellas, los propios enfermos (Martins et al, 2002).

Otros estudios relacionan la PrP^C con la señalización en la superficie celular o con mecanismos de adhesión célula-matriz extracelular, debido a su unión a la membrana plasmática a través del GPI, anteriormente mencionado. También se la ha relacionado con la posibilidad de que esté involucrada en el fenómeno de potenciación a largo plazo y en procesos fisiológicos del sueño (Martins et al, 2002). Asimismo, se sabe que PrP^C es capaz de unirse a la proteína precursora al receptor de laminina (LPR), glicoproteína estructural más abundante en la membrana basal (Rieger et al, 1999).

Teorías del cambio conformacional de los priones

Tal como ya se ha mencionado, el evento cardinal y factiblemente causal de las EPRs es el cambio de la conformación de la PrP^C a la de la proteína prión anómala o “scrapie” PrP^{Sc}, por lo que, actualmente, la mayoría de las investigaciones sobre la etiología de las EPRs se han encaminado en la elucidación de este fenómeno. La conversión de PrP^C en PrP^{Sc} resulta ser un evento postraduccional que ocurre una vez que la proteína “normal” PrP^C ha alcanzado su localización en el dominio extracelular de las membranas neuronales, o inclusive, más tarde, durante el transporte vesicular de la PrP al interior de la neurona (Weissmann et al, 1999). Debido a la existencia de diversos mecanismos de adquisición de las EPRs –hereditario, esporádico e

infeccioso- se han propuesto varias teorías que pretenden explicar el cambio conformacional, las cuales se mencionan a continuación.

Desestabilización de la PrP^C debida a mutaciones del gen PRNP

Las variantes hereditarias de las EPRs son causadas por mutaciones puntuales del gen PRNP, las cuales se manifiestan en la sustitución de un residuo aminoacídico por otro en la proteína madura (Cohen et al, 1999) o por la inserción de repeticiones octapeptídicas (Fernandez-Escamilla et al, 2004). Además, se ha propuesto que la localización de aminoácidos incorrectos, especialmente en los dominios α -hélice, desestabilizaría la estructura terciaria de la PrP^C, acrecentando la posibilidad de que la hélice afectada y sus vecinas se replieguen dando origen a nuevas estructuras en lámina β -plegada, inexistentes en la forma normal (Prusiner et al, 1982). Hasta la fecha, si bien se han caracterizado alrededor de 30 mutaciones en familias con EPRs, únicamente el 10% de los casos reportados son de origen hereditario, por lo que la mayoría se consideran ocasionales o de naturaleza infecciosa, y además, no evidencian ningún tipo de mutación en el gen, ni modificaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína (Prusiner et al, 1982). Debido a lo anteriormente postulado, esta teoría no resultaría estar lo suficientemente argumentada como para explicar el cambio conformacional del 90% de los casos restantes (Liemann et al, 1999). Para probar la validez de esta teoría en las EPRs hereditarias, se ha estudiado la estabilidad termodinámica de ocho diferentes PrP^C cuya secuencia difiere únicamente en un aminoácido. Si bien se ha demostrado que estas mutaciones puntuales están asociadas a EPRs, ningún cambio aminoacídico causa la inestabilidad suficiente para provocar el cambio de conformación característico de la PrP^{Sc}, por lo que se sugiere que la desestabilización de la PrP^C no es el mecanismo causal de la formación de la isoforma patológica en las variantes hereditarias (Liemann et al, 1999).

Interacciones moleculares entre PrP^C y PrP^{Sc}

Esta teoría supone dos modelos posibles:

En primer lugar, el denominado "Modelo de Nucleación", postula que la isoforma "normal" PrP^C se encuentra en equilibrio conformacional con la isoforma patológica PrP^{Sc}, o bien, con un precursor de ésta. En este sentido, si bien la estructura de PrP^C sería la favorecida, el cambio conformacional constituiría un proceso estocástico que tendría su origen cuando unas cuantas moléculas de conformación anormal actúan como una semilla o núcleo capaz de inducir un cambio masivo sobre moléculas

normales, convirtiéndolas en moléculas con la conformación anómala (Aranda et al, 1992) y es el resultado de interacciones directas entre la PrP^C y la PrP^{Sc} (Prusiner et al, 1995) (Figura 9A). Una vez que se inicia la transformación, ésta se propaga como una reacción en cadena, y debido a la insolubilidad que caracteriza a las moléculas de PrP^{Sc}, éstas se depositan en el citoplasma neuronal, formando extensos agregados y causando efectos citotóxicos (Pan et al, 1993).

Por otro lado, un segundo modelo conocido como “Modelo de Plegamiento”, plantea que la conversión de la PrP^C requiere que ésta se encuentre desplegada y que se vuelva a plegar de manera anormal, bajo la influencia de una molécula de PrP^{Sc} (Georgieva et al, 2004) (Figura 9B). Este proceso involucraría atravesar una barrera energética muy grande (Weissmann et al, 1999). La presencia de la PrP^{Sc} que iniciaría este proceso estaría adjudicada a una infección o a la transformación ocasional de moléculas PrP^C (Satheeshkumar, 2004). Este modelo ha sido sustentado en estudios in vitro en los cuales se ha reportado que la PrP^C, conformada mayoritariamente por estructuras α -hélice, es capaz de modificar espontáneamente su conformación hacia estructuras β -plegada, que constituyen la PrP^{Sc}.

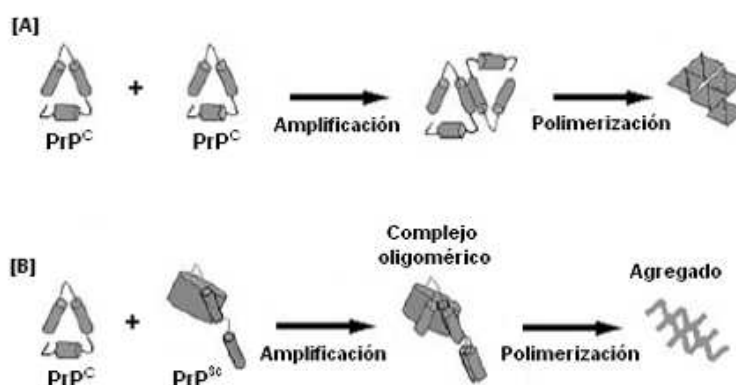


Figura 9. Esquema de las dos teorías que postulan que las interacciones moleculares entre PrP^C y PrP^{Sc} son la base del cambio conformacional de los priones. [A]: Modelo de nucleación; [B]: Modelo de plegamiento. Modificado de Masters and Beyreuther, 1997.

Como implicación inmediata de estos dos modelos del cambio conformacional, se intuye que es necesaria la presencia de la PrP^C en el huésped para que pueda ser establecida una infección. Esto fue corroborado por Prusiner en 1982, al demostrar la resistencia de ratones con el gen PRNP suprimido, y que por lo tanto, no producían PrP^{Sc} al ser infectados por scrapie (Prusiner et al, 1992).

Procesos postraduccionales

Dado que no se han encontrado diferencias químicas entre la PrP^C y la PrP^{Sc}, se presume la existencia de otros fenómenos implicados en el cambio conformacional y en la agregación de la PrP. Esto permite explicar el carácter patológico de las prionopatías a través de las modificaciones postraduccionales de la PrP. Una proteína no es biológicamente activa hasta que adquiere la conformación plegada nativa, determinada por su secuencia de aminoácidos. La cadena polipeptídica adopta de forma espontánea dicha conformación cotraduccional o postraduccionalmente -durante o después de su síntesis-. De este modo, el mensaje genético lineal del que es portador el ARN mensajero, se convierte en una estructura tridimensional específica del nuevo polipéptido sintetizado. Sin embargo, en muchos casos, se requiere que la cadena polipeptídica -recién sintetizada- experimente una modificación postraducciona. De este modo, la proteína adopta su conformación nativa respectiva. A estos cambios, se les denomina modificaciones postraduccionales y dependen de la naturaleza de la proteína. Uno de los mecanismos postraduccionales de mayor importancia en la fisiopatogénesis de las EPRs es la glicosilación.

Glicosilación de la PrP^C

La glicosilación consiste en la formación de un enlace glicosídico, catalizada enzimáticamente, entre un oligosacárido y proteínas o lípidos. Las proteínas glicosiladas o glicoproteínas poseen funciones importantes en membranas, lisosomas y en el espacio extracelular, participando principalmente como moléculas de reconocimiento celular. En contraste, pocas proteínas citosólicas se encuentran glicosiladas. Las glicoproteínas contienen una o más cadenas de carbohidratos, que pueden clasificarse de acuerdo al aminoácido al que se une el azúcar: de tipo N-glicosídico, si se enlaza sobre una asparagina (Asn) o de tipo O-glicosídico, cuando la transferencia afecta un residuo de serina (Ser) o treonina (Thr).

La PrP^C posee dos sitios propicios para la N-glicosilación, en los residuos de asparagina 181 y 197. Estos sitios pueden ser glicosilados en forma variable, dando origen a cuatro glicofomas de dicha proteína. Una de estas formas está doblemente glicosilada, dos son monoglicosiladas y una no se encuentra glicosilada (Clausen et al, 1996). Los oligosacáridos unidos a la PrP^C establecen formas ortogonales, con carga negativa. Éstos cubren a la proteína impidiendo, por efecto estérico, interacciones intra o intermoleculares. El hecho que la PrP contenga tal variedad de complejos oligosacáridicos, sugiere que se modifican las propiedades que distinguen entre la

PrP^C y PrP^{Sc}. Sin embargo, células tratadas con un inhibidor de la glicosilación, como la tunicamicina, produjeron especies simples de la PrP no glicosiladas, pero resistentes a proteasas. En este experimento se concluyó que la N-glicosilación no es esencial para la síntesis de la PrP resistente a proteasas. Sin embargo, no hay evidencia de que las moléculas de PrP^{Sc} no glicosiladas se asocien a la infectividad en las enfermedades por priones. Hasta el momento se ha sugerido que las modificaciones postraduccionales que pudieran dar lugar al cambio conformacional de PrP^C a PrP^{Sc} son producto de la N-glicosilación (Chen et al, 2002). La O-glicosilación no ha sido tomada en cuenta para explicar la transformación de la PrP, ya que en las fracciones aisladas, tanto de PrP^C como de PrP^{Sc}, no se han encontrado este tipo de cadenas de carbohidratos. No obstante, dada la dificultad para purificar fracciones de ambas isoformas y por la degradación, es factible suponer que los carbohidratos O-glicosilados pudieran estar presentes en la proteína príon y que no hayan sido detectados (Rudd et al, 2001).

Intermediario de plegado de la PrP

Se ha demostrado experimentalmente la existencia de poblaciones de intermediarios cinéticos durante el plegado de la proteína príon humana (Apetri y Surewicz, 2002). Estas especies representarían un precursor monomérico crucial en la conversión de la conformación normal a la isoforma patogénica PrP^{Sc}.

Los estudios se han centrado en el plegado de una proteína recombinante correspondiente al fragmento 90-231 de la PrP. Esta región es de especial importancia dado que posee todos los elementos de la secuencia resistente a proteínasa hallada en la isoforma patogénica, contiene todas las mutación puntuales asociadas a desordenes priónicos familiares y es suficiente para la propagación de la enfermedad. Dado que la fluorescencia de un único Trp nativo, ubicado en la posición 99, varía poco con el desplegamiento de la proteína, se han estudiado variantes de la PrP portando Trp en el dominio plegado C-terminal. Esto fue posible mediante la sustitución de Trp99 por Phe y de Phe o Tyr en diferentes posiciones por Trp y estudios de *fold*ing y *un*fold*ing* por *stopped-flow*. En particular, el análisis de los gráficos de Chevron de dos mutantes, Y218W y F175W, a pH neutro y ácido (Figuras 10A, C y E), muestra que los datos experimentales no pueden ajustarse a una transición en dos estados, dado que el comportamiento del logaritmo de la constante de velocidad de replegado versus concentración de desnaturante, a bajas concentraciones de urea, claramente se desvía de la linealidad. Por otra parte, experimentos de *un*fold*ing* en presencia de urea a pH neutro o levemente ácido, permitieron ajustar los datos obtenidos a modelos de

tres estados (Figura 10B, D y F). De esta manera, se evidenció que la proteína prión se pliega mediante un mecanismo de tres estados involucrando un intermediario monomérico. Este intermediario temprano, sugiere ser relativamente compacto y especialmente estable en condiciones de acidez. Estas condiciones resultan de potencial relevancia en el desarrollo de prionopatías, dado que varios reportes han indicado que la transición $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ ocurre en compartimentos celulares con bajo pH. Esto último, en conjunto con la alta hidrofobicidad y la tendencia a la agregación, típico de intermediarios de plegado, postularían al intermediario como un mejor candidato respecto del estado desplegado a ser precursor monomérico de la PrP^{Sc} .

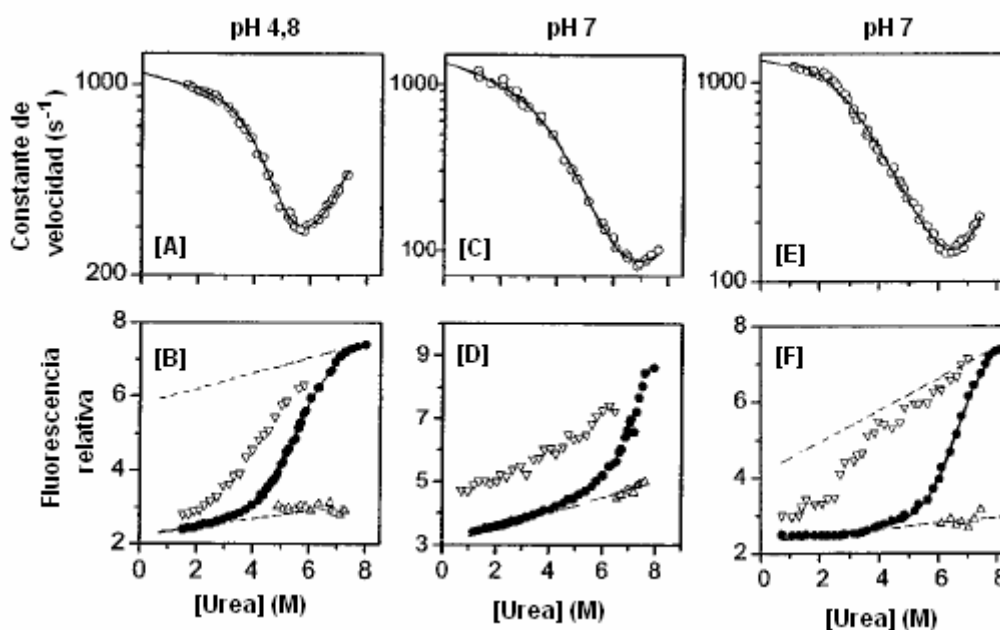


Figura 10. Datos de plegado y desplegamiento para la mutante Y218W a pH 4,8 y 7 ([A] y [B], y [C] y [D], respectivamente) y la mutante F175W a pH 7 ([E] y [F]). [A], [C] y [E]: Gráficos de Chevron para cada mutante en cada condición de pH. Se observa la curvatura de las curvas de plegado a bajas concentraciones de caótopo, lo cual resulta ser una desviación del comportamiento de dos estados. [B], [D] y [F]: Gráficos de intensidad de fluorescencia inicial extrapoladas a tiempo cero para el replegado (\blacktriangledown) y la reacción de desplegamiento (\triangle), junto a las intensidades de fluorescencia en el equilibrio a tiempos largos (\bullet), en función de la concentración de urea. Las líneas punteadas corresponden a las extrapolaciones lineales de las líneas de base para los estados nativo y completamente desplegado. La línea sólida representa el mejor ajuste no lineal de los datos experimentales, de acuerdo a un modelo secuencial de tres estados: $\text{N} \leftrightarrow \text{I} \leftrightarrow \text{U}$. Tomado de Apetri y Surewicz, 2002.

Intermediario de plegado en la reacción de oligomerización de la PrP

Como ya se mencionó, el plegamiento incorrecto de la proteína prión resulta ser la causa principal de numerosas enfermedades neurodegenerativas fatales en humanos y animales. Estas patologías están asociadas con el plegado erróneo de la PrP^{C} , rica en α -hélices, lo cual da origen a una forma anómala, patogénica y rica en hojas β , la PrP^{Sc} . El estado nativo de la PrP^{C} está representado por los residuos 89 a 231, los cuales constituyen un dominio globular carboxi-terminal, que consta de tres α -hélices

(H1, H2 y H3) y dos hojas β antiparalelas cortas (S1 y S2). El mecanismo de conversión de PrP^C a PrP^{Sc} continua siendo desconocido, si bien es sabido que ocurre postraducionalmente sin modificaciones covalentes detectables. La transformación requiere un cambio substancial de conformación de un monómero, rico en α -hélices, a una estructura amiloide polimérica, rica en estructuras β .

La PrP^C puede ser transformada *in vitro* en una variedad de estructuras no nativas, con alto contenido en hojas β . Diferentes condiciones pueden inducir diversas estructuras, una de las cuales es un β -oligómero, β^0 (Baskakov et al). El estado β^0 se origina en condiciones suaves acídicas y desnaturalizantes, similares a aquellas presentes en las vesículas endocíticas humanas. Algunas de las características de β^0 son similares a las de la PrP^{Sc}: alto contenido de estructura beta, resistencia a proteinasa K y alta afinidad de unión al 1-anilinoftalen-8-sulfonato (ANS). Sin embargo, a diferencia de la PrP^{Sc}, β^0 es soluble y de carácter monodisperso, y sorprendentemente, no actúa como molde en la formación de PrP^{Sc}. Además, constituye un complejo macromolecular muy estable –es un decámero persistente de PrP-, cuya formación procede por una vía que compite con la formación de cuerpos amiloides.

En estudios recientes (Tahiri-Alaoui et al, 2004 y 2006) se ha reportado que el polimorfismo del codón 129 exhibe un efecto cuantificable sobre la cinética de formación de β^0 . Se demostró que el β^0 formado a partir de mezclas equimolares de PrP portando valina o metionina en la posición 129 es refractaria a la formación de amiloides, respecto a soluciones conteniendo uniformemente una única forma alélica de la proteína. Dado que la heterocigosis en esta posición ha manifestado estar asociada epidemiológicamente a menores tasas de desarrollo de EPRs, se ha inferido que β^0 podría tener un rol adaptativo, secuestrando PrP fuera de la vía de formación de cuerpos amiloides. Otros indicios que respaldarían esta última teoría son: 1) la organización cuaternaria de β^0 es característicamente estable, es decir, que el decámero no crece progresivamente, mientras que los agregados amiloides se propagan de forma indefinida; 2) β^0 es perfectamente soluble, aún en altas concentraciones, permitiendo su clarificación a través del drenaje linfático por vía reticuloendotelial; 3) β^0 actúa, como ya se a discutido, como una “trampa” de las formas monoméricas anómalas de PrP^C, previniendo su ingreso a la ruta de elongación de amiloides.

Como ya hemos debatido, una clave para entender el mecanismo de la transición conformacional entre α -hélices y hojas β sería la identificación de precursores de plegado. La posibilidad de que un intermediario parcialmente desplegado, cuya formación y conversión sería promovida por una reacción irreversible con la PrP^{Sc} insoluble, ha sido propuesta y discutida por modelos recientes (Cohen et al, 1994). En efecto, en un estudio posterior (Gerber et al, 2007), se ha identificado dicho intermediario, PrP^I o α^I , el cual es parcialmente desplegado, y está involucrado en la formación del β -oligómero. El estado α^I es formado cuantitativamente y en forma rápida cuando la PrP^C es transferida a una buffer adecuado y, posteriormente, sufre rearrreglos conformacionales lentos (horas o días dependiendo de las condiciones) que dan origen al ensamblaje en la estructura cuaternaria del β^0 . Empleando la técnica SEC-HPLC (cromatografía líquida de alta resolución adaptada a exclusión molecular) pudo revelarse el carácter monomérico de α^I y su lenta oligomerización en β^0 (Figura 11B). Por otra parte, el análisis de dicroísmo circular (CD) en el UV lejano, sensible al contenido y a los cambios de la estructura secundaria, muestra que el replegado de la proteína PrP desnaturalizada, en condiciones que promueven la oligomerización, rinde un estado de vida corta con un contenido de estructura secundaria similar al del estado nativo (Figura 11C). Los ensayos de CD en el UV cercano, por su parte, evidencian que el intermediario muestra una reducción de su organización terciaria, lo cual se desprende de una reducción de la señal de CD respecto de la forma nativa PrP^C (Figura 11D), si bien se mantiene compacto, con sólo un incremento del 10 % en su radio hidrodinámico (datos no mostrados). Además, los gráficos de fluorescencia (Figura 11E) muestran que la intensidad de la señal de ANS (reactivo que se une selectivamente a superficies hidrofóbicas, con un sustancial incremento de la fluorescencia) en presencia de α^I aumenta significativamente respecto de PrP^C, lo cual podría explicarse mediante la apertura del *core* hidrofóbico, como se ha descrito previamente para glóbulos fundidos (Semisotnov et al, 1991).

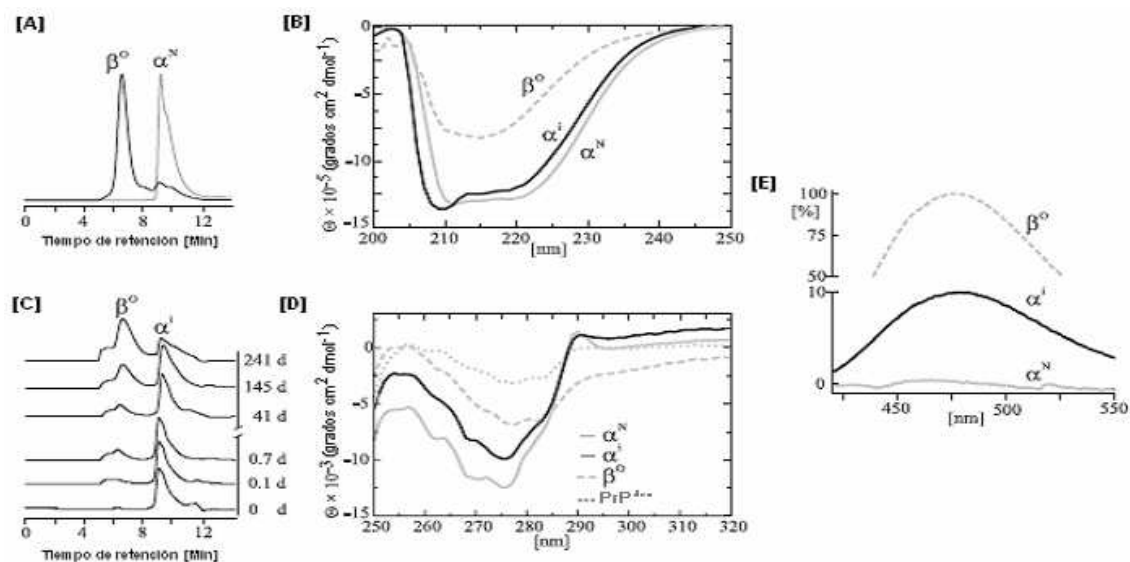


Figura 11. Caracterización cromatográfica y espectroscópica de la PrP^C, el intermediario glóbulo fundido y el decámero beta. **[A]:** Perfiles cromatográficos de exclusión molecular-HPLC (SEC-HPLC) de la PrP nativa, PrP^C (α^N), y el oligómero beta (β^O). **[B]:** Espectros de CD en el UV lejano de α^N , el intermediario de plegado (α^I) y β^O , donde se observa el comportamiento típico de α -hélice para α^N y α^I , y un alto contenido de láminas beta para β^O . No se muestran las señales de CD por debajo a 200 nm debido a la distorsión de las bandas, resultado de la absorción de la urea. **[C]:** Perfiles de SEC-HPLC para el intermediario y su oligomerización a distintos tiempo de incubación (d: días de incubación). **[D]:** Espectros de CD en el UV cercano de α^N , α^I y β^O , y de PrP desnaturalizada (PrP^{Des}). Se observa cierto grado de desorganización de la estructura terciaria de α^I respecto de α^N . **[E]:** Espectros de diferencia de fluorescencia de ANS para la α^N , α^I y β^O . Se gráfica el porcentaje de la diferencia de intensidad de fluorescencia del ANS con y sin proteína para cada caso. Se verifica un aumento de la intensidad de la señal para el intermediario, respecto de la forma nativa, posiblemente debido a un aumento de la accesibilidad de la sonda al core hidrofóbico del intermediario de plegado, lo cual resultaría ser un indicativo del aumento del área expuesta por el glóbulo fundido. La longitud de onda de excitación empleada fue 375 nm. Adaptado de Gerber et al, 2007.

En conjunto, los resultados previamente reportados constituyen evidencias experimentales de la existencia del un intermediario *molten globule* (glóbulo fundido) rico en estructura alfa helicoidales en el proceso de oligomerización, adjudicado a la especie α^I .

Por último, la Figura 12 muestra un esquema de las distintas vías de conversión conformacional de la PrP recombinante in vitro, derivadas de los resultados previamente discutidos.

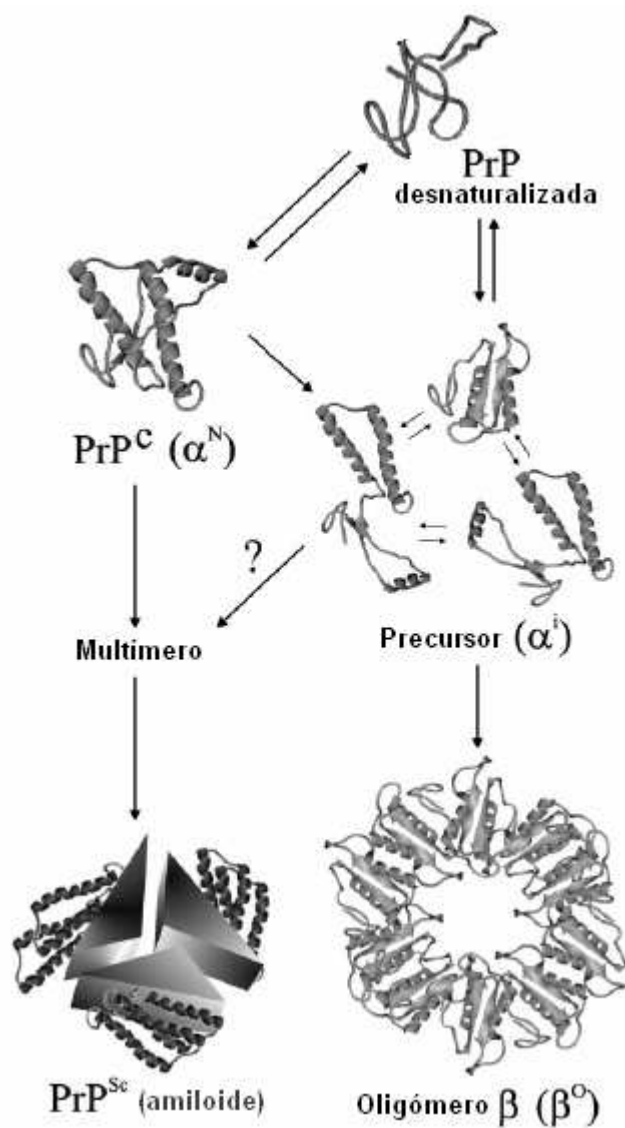


Figura 12. Representación esquemática de los múltiples mecanismos de plegado de la proteína PrP recombinante in vitro. Se muestran numerosas vías de plegado de la proteína recombinante portando su disulfuro oxidado, incluyendo el *refolding* rápido de PrP desnaturalizada a su estado nativo (α^N) y la formación de amiloides. Por último, se esquematiza la formación del beta-decámero (β^o), vía un intermediario no nativo (α^i), con características de glóbulo fundido. Las estructuras α^i y β^o no intentan ser realistas. Adaptado de Gerber et al, 2007.

Rol de la hélice 1 en la patogénesis

La hélice alfa 1 (H1: residuos 144-154) se caracteriza por poseer una secuencia sumamente inusual, que podría tener un rol central en la infectividad de los priones. En las proteínas, las hélices α y las hojas β normalmente contienen residuos hidrofóbicos que forman contactos terciarios con el core proteico. Dichas interacciones actúan estabilizando la estructura secundaria y pueden ser acrecentadas por la formación de pares iónicos (puentes salinos) o puentes disulfuros. No obstante, la H1 cuenta con una serie de características que atentan contra dicha regla general. En primer lugar, la H1 está compuesta casi exclusivamente por residuos hidrofílicos (DWEDRYRENM), por lo cual es incapaz de formar interacciones hidrofóbicas estabilizantes con el core de la proteína. Además, 6 de los 11 residuos poseen carga a pH neutro (Asp, Glu y Arg), lo cual convierte a la H1 en la hélice más hidrofílica de todas las conocidas hasta el momento. En segundo lugar, esta estructura está estabilizada por la formación de dos puentes salinos intrahelicoidales. Sin embargo, no forma puentes salinos externos (terciarios) con el resto de la PrP^C. Esto se debe a que la mayor parte de las cargas residen sobre la cara externa de la hélice, en dirección opuesta a la localización del resto del dominio globular C-terminal. En tercer lugar, el ordenamiento secuencial de las cargas interactúa favorablemente con el momento dipolar intrínseco de la α hélice. Por último, la estructura muestra una elevada superficie expuesta y un número significativo de enlaces de hidrógeno accesibles al solvente.

A partir de modelos computacionales basados en la estructura cargada de H1, se ha previsto que los puentes salinos internos –que según se supone, estabilizan la hélice– podrían también sufrir un rearrreglo para formar enlaces iónicos intermoleculares que promoverían la agregación de PrP en isoformas ricas en láminas beta. Esto ha llevado a proponer a la H1 como un posible sitio de asociación de PrP^C a PrP^{Sc} durante la formación del complejo heterodimérico. No obstante, la presencia de estos puentes salinos en ausencia de la isoforma patogénica estabilizaría a la PrP^C, evitando su conversión.

Por otro lado, se ha sugerido que durante la conversión de PrP^C→PrP^{Sc}, las hélices H2 y H3 permanecerían intactas y unidas mediante el enlace disulfuro nativo de la PrP, mientras que los segmentos N terminales a H2 sufrirían un rearrreglo para dar origen a una hélice beta levógira, utilizando residuos que sobresalen de la estructura de la H1 como un asa (loop) adjacente a las moléculas vecinas de PrP, lo cual expondría a la hélice en una zona que podría influenciar la replicación del prión (Govaerts et al, 2004; Wille et al, 2002). La Figura 13 esquematiza el rearrreglo propuesto que sufre el elemento H1.

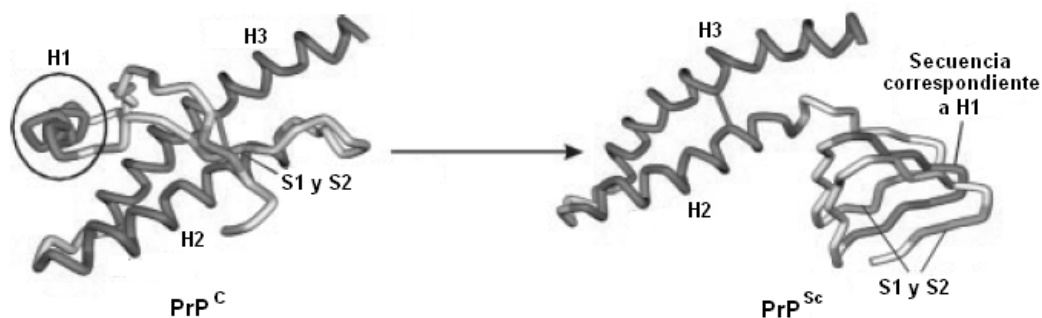


Figura 13. Vista esquemática del cambio conformacional de la PrP^C en la forma patológica PrP^{Sc}. Se muestran la estructura del dominio carboxi-terminal de PrP^C (entrada en PDB: 1QLX) y un modelo estructural de PrP^{Sc} (basado en cristalografía electrónica de baja resolución y modelado por homología propuesto por Wille et al) para la misma secuencia aminoacídica. Nomenclatura de elementos de estructura secundaria: α hélices 1, 2 y 3 (H1, H2 y H3, respectivamente) y hojas β 1 y 2 (S1 y S2, respectivamente). En ambas isoformas, se esquematiza el puente disulfuro Cys179-Cys214 que conecta a H2 y H3. Modificado de Masters and Beyreuther, 1997.

Este modelo ha derivado de estudios de cristalografía electrónica de baja resolución, en los cuales se verifica la incorporación del dominio desestructurado N-terminal y del subdominio *hairpin* del dominio terminal, que contiene a H1, a la estructura beta de giro izquierdo, mientras que el subdominio helicoidal (H2 y H3) retiene su estructura nativa (Wille et al, 2002). El hecho de que H1 se incorpore en una hélice beta paralela, presente en la estructura de los amiloides, permitiría suponer que la estabilidad de esta alfa hélice constituye una barrera necesaria para prevenir la conversión espontánea de PrP^C a PrP^{Sc}.

Concepto de intermediario de plegado en la formación de estructuras priónicas y amiloides: integración termodinámica de los fenómenos involucrados

Diversos análisis espectroscópicos conformacionales de los fenómenos de disociación y desplegado de la PrP^{Sc}, y en más detalle, de su *core* resistente a proteinasa (PrP27-30), han demostrado que ambas proteínas se pliegan a través de un intermediario conformacional monomérico (Safar et al, 1993 y 1994), y permitieron establecer el concepto de intermediario de plegado (*framework*) para la proteína PrP. Los intermediarios conformacionales de PrP27-30 y PrP^{Sc} resultar ser críticos, ya que son precursores de la reacción de agregación o formación de los cuerpos amiloides.

El generalmente aceptado concepto de *framework* vectorial para el plegamiento proteico, el cual se ha sustentado en datos espectroscópicos de RMN y CD disponibles para una gran variedad de proteínas, demuestra que las proteínas no se pliegan en un solo paso, sino que lo hacen mediante intermediarios distintivos,

caracterizados por ser estados no nativos, con estructura secundaria no desnaturalizada, aunque carente de elementos terciarios. Las leyes cinéticas y termodinámicas requieren que PrP^C y PrP^{Sc} sufran una transición conformacional análoga a la que ocurre experimentalmente *in vivo*. Los problemas categóricos en la formación de amiloides serían, entonces: 1) determinar los pasos intermedios en el mecanismo de plegado de PrP^C; 2) especificar los pasos intermediarios de la vía alternativa de plegado de PrP^{Sc}; y 3) explicar cómo ambos caminos están termodinámica y conformacionalmente enlazados para determinar el punto crítico de cruce entre dichos mecanismos (Safar, 1995; Safar et al, 1995). Tales conocimientos resultan ser esenciales para el desarrollo de conceptos de terapia génica o desarrollo farmacológico racional.

Tal como ya hemos discutido, la conformación de los intermediarios de plegado de la PrP, los cuales pueden ser disociados o agregados a bajas concentraciones de GuHCl o mediante un aumento del pH, reúne todas las características de un glóbulo fundido. Este estado es estructural y termodinámicamente distinto de las formas nativa y desnaturalizada de la proteína, el cual se ha definido como un estado compacto, de conformación parcialmente ordenada con estructura terciaria inespecífica, alto contenido de estructura secundaria, una significativa flexibilidad estructural y una tendencia intrínseca a formar agregados como consecuencia de una mayor exposición de su superficie hidrofóbica (Matthews, 1993). Por ende, no resulta extraño que el estado glóbulo fundido de cualquier proteína sea significativamente menos estable que su correspondiente forma nativa. En el caso de la PrP, una estabilidad menor de este intermediario proveería un “túnel termodinámico” para la transición PrP^C→PrP^{Sc} (Figura 14). Este fenómeno podría ser un importante mecanismo que permitiría la conversión estructural, puesto que tal proceso es separado mediante una gran barrera energética, tal como se ha demostrado para proteínas y péptidos modelos. Un ligando hipotético o una mutación puntual podría desestabilizar la conformación nativa PrP^C a favor de un glóbulo fundido, disminuyendo favorablemente, en ese sentido, la barrera energética.

La complejidad y la existencia de un equilibrio de disociación y desplegamiento de más de dos estados para PrP^{Sc} y PrP27-30, impide calcular en forma precisa la estabilidad termodinámica de las proteínas. Sin embargo, los puntos medios de las transiciones conformacionales de cada intermediario son proporcionales a su estabilidad. Analizando estos puntos, aparentemente, la forma PrP^{Sc} o los agregados amiloides de PrP27-30 son significativamente más estables que la conformación glóbulo fundido, y además, representarían trampas cinéticas para estos intermediarios monoméricos y metaestables. La estabilización termodinámica adicional, con un aumento sincrónico

del contenido en laminas beta en la estructura secundaria, estaría asociada a la agregación y clivaje proteolítico del N-terminal de la isoforma PrP^{Sc}, lo cual desencadenaría el rearrreglo de la PrP27-30 para originar los amiloides maduros. Este procesamiento del extremo amino constituye un importante paso irreversible adicional que resulta en agregados más estables que aquellos generados por la forma PrP^{Sc} (Safar et al, 1993). Por su parte, la estabilidad termodinámica de la PrP está estrechamente relacionada con su tasa de recambio, y la alta estabilidad de las formas agregables podría explicar por si sola su acumulación. La estructura secundaria estimada por espectros CD en el UV lejano de la isoforma PrP^C es bastante similar, aunque no idéntica, a la estructura secundaria del glóbulo fundido de PrP^{Sc}. Por otra parte, si los intermediario de las isoformas normal y anómala, en efecto, reflejan ser análogas química y conformacionalmente, o si el glóbulo fundido para la forma PrP^{Sc} es estabilizado por su unión a un ligando, continúan siendo los principales debates en cuanto a la conversión y replicación de la proteína prión. Por ello, que compartimentos subcelulares y mecanismos específicos están involucrados en la formación del intermediario de plegado de la PrP y conllevan a la polimerización in vivo, constituyen el cuestionamiento fundamental como vía de elucidación de la etiología de las prionopatías.

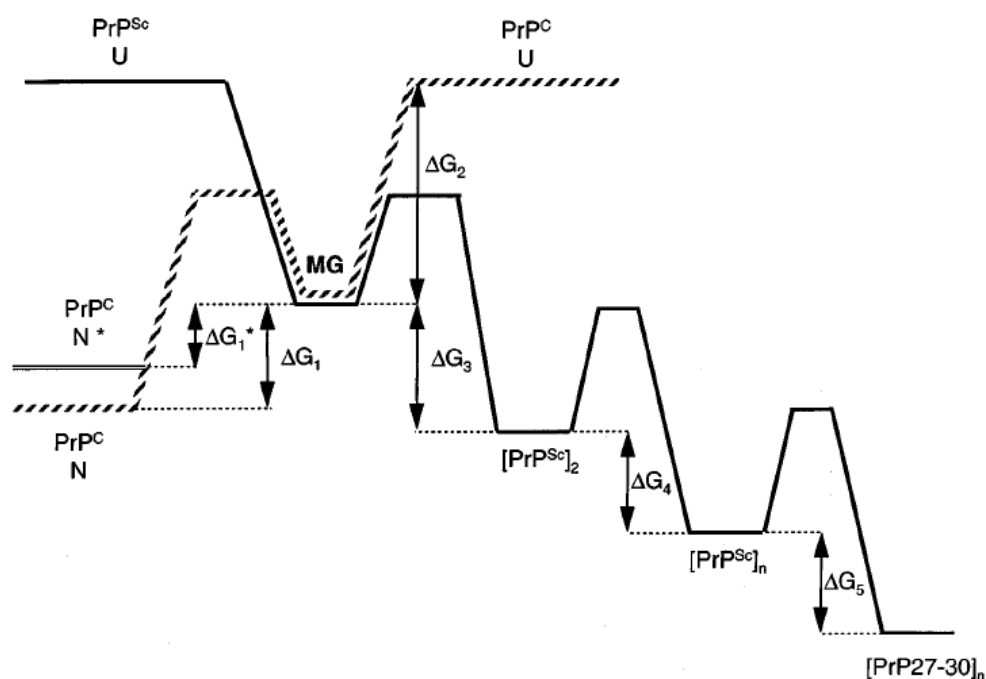


Figura 14. Descripción termodinámica formal de los mecanismos de transición conformacional de PrP^C y PrP^{Sc}. Las vías involucran las formas PrP^C, PrP^{Sc} y PrP27-30 (en amiloides) con conformaciones nativa (N), desplegada (U), intermediario glóbulo fundido (MG), dímeros ([PrP^{Sc}]₂) y agregados de PrP^{Sc} y PrP27-30 ([PrP^{Sc}]_n) y [PrP27-30]_n, respectivamente). Determinadas experimentalmente mediante análisis de equilibrio de disociación y desplegado de ambas proteínas en GuHCl (Safar et al, 1993 y 1994). El asterisco indica a la PrP^C portando una mutación puntual o insercional. En la figura, se evidencia el papel fundamental del intermediario MG en la intersección crítica de las rutas conformacionales y en el paso inicial de mecanismo de agregación. Los agregados de [PrP^{Sc}]_n actuarían como una trampa cinética para las conformaciones proteicas intrínsecamente inestables. Se grafican, en forma arbitraria, las energías transicionales entre los distintos estados (ΔG₁-ΔG₅) y la barrera energética de activación entre ellos. Tomado de Safar, 1996.

Conclusiones

Como hemos desarrollado y discutido a lo largo de este trabajo, las prionopatías o enfermedades causadas por priones constituyen, por múltiples razones, patologías atípicas y ciertamente paradigmáticas. Esto se debe primordialmente a que el dispositivo de transmisión de estas afecciones contradice el Dogma Central de la Biología Molecular, puesto que el agente etiológico de estas enfermedades es capaz de replicarse a sí mismo en ausencia de ácido nucleico, y además, se opone al principio biológico que establece que la estructura primaria de una proteína determina de manera unívoca el plegamiento o estructura terciaria de la misma. Este cambio conformacional de la proteína prión, el cual resulta ser el evento clave en el desarrollo de las EPRs, aun en la actualidad continúa siendo investigado. Por dichas razones, resulta imperioso involucrar esfuerzos para la generación y profundización del conocimiento referente a este fenómeno, en particular, para desarrollar terapias eficientes al respecto, y en general, para dilucidar en forma fehaciente la dicotomía conformacional que manifiestan estas macromoléculas, de modo de adquirir nuevos conocimientos biofísicos que permitan en forma determinante resolver cuestiones asociadas a la naturaleza el plegado de proteínas *in vitro* e *in vivo*.

Referencias

- Aranda, A.. Possible cell-free Prion replication. *Med Hypotheses* 1992;38:249-251.
- Baskakov, I. V., Legname, G., Baldwin, M. A., Prusiner, S. B., and Cohen, F. E. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 21140–21148.
- Baskakov, I. V., Legname, G., Gryczynski, Z., Prusiner, S. B. *Protein Science* (2004), 13:586–595.
- Bolton, D.C., McKinley, M.P., Prusiner, S.B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 1982; 218: 1.309-1.311.
- Brown, D.R. Copper and prion disease. *Brain Research Bulletin*, Vol. 55, No. 2, pp. 165–173, 2001.
- Brown, D.R. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends of Neuroscience* 2001;24:85-90.
- Brown, D.R., Schulz-Schaeffer, W.J., Schmidt, B., & H.A. Kretzschmar. 1997. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp. Neurol.*, 146:104-112.
- Caughey, B., Race, R.E., Chesebro, B. Detection of prion protein mRNA in normal and scrapie-infected tissues and cell lines. *J Gen Virol* 1988; 69: 711-716.
- Chen, P.Y., Lin, C.C., Chang, Y.T., Lin, S.C., Chan, S.I. One O-linked sugar can affect the coil-to-beta structural transition of the prion peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12633-12638.
- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D. et al. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature (Lond)* 1985; 315: 331-333.
- Clausen, H., Benneth, E.P.. One family of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases control the initiation of mucin-type O-linked glycosylation. *Glycobiology* 1996;6:635-646.
- Cohen, F. E., Pan, K. M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R. J., and Prusiner, S. B. (1994) *Science* 264, 530–531
- Cohen, F.E. Protein misfolding and prion diseases. *J Mol Biol* 1999;293:313-320.
- Coria, B.F. Demencias por priones. En: Alberca R, López Pousa YS. *Enfermedad de Alzheimer y otras demencias*. Médica Panamericana. España. 2002.
- De Keukeleire et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354 (2007) 949–954.

- Fernandez-Escamilla, A.M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Serrano, L. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat Biotechnol* 2004;10:1302-1306.
- Georgieva, D., Koker, M., Redecke, L., Perbandt, M., Clos, J., Bredehorst, R., Genov, N., Betzel, C. Oligomerization of the proteolytic products is an intrinsic property of prion proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323:1278-1286.
- Gerber, R., Tahiri-Alaoui, A., Hore, P. J., and James, W. (2007) *J. Biol. Chem.* 282, nº. 9, pp. 6300–6307
- Govaerts, C., H. Wille, S. B. Prusiner, and F. E. Cohen. 2004. Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:8342–8347.
- Hölscher, C., Bach, U.C., Dobberstein, B. Prion Protein Contains a Second Endoplasmic Reticulum Targeting Signal Sequence Located at its C Terminus. *J Biol Chem* 2001;276:13388-13394.
- Horiuchi, M., Yamazaki, N., Ikeda, T., Ishiguro, N., Shinagawa, M. A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *J Gen Virol* 1995;76:2583-2587.
- Hornshaw, M. P.; McDermott, J.R.; Candy, J.M.; Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein; *Biochemical and biophysical research communications*; p.621-629; 1995.
- Huang, Z. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7139-7143
- Huang, Z., Prusiner, S. B. and Cohen, F. E. (1996) *Folding Des.* 1, 13-19
- James, T. L., H. Liu, N. B. Ulyanov, S. Farr-Jones, H. Zhang, D. G. Donne, K. Kaneko, D. Groth, I. Mehlhorn, S. B. Prusiner, and F. E. Cohen. 1997. Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10086–10091.
- Jamin, N., Coic, Y. M., Landon, C., Ovtracht, L., Baleux, F., Neumann, J. M., and Sanson, A. (2002) *FEBS Lett.* 529, 256–260.
- Jobling, M. F., Stewart, L. R., White, A. R., McLean, C., Friedhuber, A., Maher, F., Beyreuther, K., Masters, C. L., Barrow, C. J., Collins, S. J., and Cappai, R. (1999) *J. Neurochem.* 73, 1557–1565.
- Kimberlin, R., Walker, C. Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster. *J Gen Virol* 1977; 34: 295-304.
- Liemann, S., Glockshuber, R. Influence of amino acid substitutions related to inherited prion disease on the thermodynamic stability of the cellular prion protein. *Biochem* 1999;38:3258-3267.

- Maiti, N.R. and Surewicz, W.K., *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 276, No. 4, Issue of January 26, pp. 2427–2431, 2001.
- Martins, V.R., Brentani, R.R. The biology of the cellular prion protein. *Neurochem International* 2002;41:353-355.
- Masters, C.L., Beyreuther, K. Tracking turncoat prion proteins. *News and Views. Nature* 1997;388:228-229.
- Matthews CR (1993) Pathways of protein folding. *Annu Rev Biochem* 62:653-683
- McKinley, M.P., Bolton, P.C., Prusiner, S.B. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 1983; 35: 57-62.
- Merz, P.A., Somerville, R.A., Wisniewski, H.M., Iqbal, K. Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol* 1981; 54: 63-74.
- Oesch, B., Westaway, P., Walchli, M., Mckinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R. et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 1985; 40: 735-746.
- Pablos-Méndez, A., Netto, E.M., Defendini, R. Infectious prions or cytotoxic metabolites? *Lancet* 1993; 341: 159.
- Pan, K.M., Baldwin, M.A., Nguyen, J., Gasse, M., Serban, A. Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10962-10966.
- Prusiner, S. El príon en la patología. *Investigación y Ciencia*. 1995; Marzo: 14-21.
- Prusiner, S. Novel Proteinaceous Infectious Particles cause Scrapie. *Science* 1982;216:136-144.
- Prusiner, S.B. Molecular biology of prion disease. *Science* 1991; 25: 1.515-1.522.
- Prusiner, S.B. Terminology. En: Prusiner, S.B., McKinley MP, editores. *Prions*. San Diego: Academic Press, 1987; 37-53.
- Prusiner, S.B. The prion diseases. *Sci Am* 1995; 272: 48-57.
- Prusiner, S.B., McKinley, M.P., Bowman, K.A., Bolton, D.C., Bendhej, P.E., Groth, D.F. et al. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 1983; 35: 349-358.
- Quaglio, E., Chiesa, R., Harris, A. Copper converts the Cellular prion protein into a protease-resistant species than is distinct from the scrapie isoform. *J Biol Chem* 2001;276:11432-11438.
- Rieger, R.; Lasmézas, C.I.; Weiss, S.; Role of the 37 kDa laminin receptor precursor in the life cycle of prions; 1999; 6; 7-16.
- Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, R. Glockshuber, and K. Wuthrich. 1997. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23–231). *FEBS Lett.* 413:282–288.

- Rodríguez Ferri, E.F. 2001. Encefalopatías espongiformes. Priones. Mesa Redonda sobre Encefalopatías espongiformes. Colegio Oficial de Veterinarios de León-Facultad de Veterinaria. Junio.
- Rudd, P.M., Wormald, M.R., Wing, D.R., Prusiner, S.B. and Dwek, R.A. Prion glycoprotein: Structure, dynamics and roles for sugars. *Biochemistry* 2001;40:3759-3766.
- Safar J (1995) Prions, Prions, Prions (Prusiner SB, ed.) pp 71-78. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo
- Safar, J., Roller, P.P., Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J. Jr (1993) Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem* 268:20276-20284
- Safar, J., Roller, P.P., Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J. Jr (1994) Scrapie amyloid (prion) protein has the conformational characteristics of an aggregated molten globule folding intermediate. *Biochemistry* 33:8375-8383
- Safar, J., Roller, P.P., Ruben, G.C., Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J. Jr (1995) *Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders* (Iqbal K, Winblad B, Wisniewski HM, ed.) pp 775-781. John Wiley & Sons Ltd, London
- Satheeshkumar, K.S., Murali, J., Jayakumar, R. Assemblages of prion fragments: novel model systems for understanding amyloid toxicity. *J Struct Biol* 2004;148:176-193.
- Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas, A. F., and Gilmanshin, R. I. (1991) *Biopolymers* 31, 119–128
- Tahiri-Alaoui, A., Gill, A. C., Disterer, P., and James, W. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 31390–31397
- Tahiri-Alaoui, A., Sim, V. L., Caughey, B., and James, W. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 34171–34178
- Tyler, K. Prions. En: Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R., editores. *Principles and practice of infectious diseases* (4.a ed.). Nueva York: Churchill Livingstone, 1995; 1.674-1.676.
- Watts, J.C., Balachandran, A., Westaway, D. The expanding universe of prion diseases. *PLoS Pathog* 2006 2(3): e26.
- Weissmann, C. Molecular genetics of Transmissible Spongiform Encephalopathies. *J Biol Chem* 1999;274;1:3-6.
- Wille, H., M. D. Michelitsch, V. Guenebaut, S. Supattapone, A. Serban, F. E. Cohen, D. A. Agard, and S. B. Prusiner. 2002. Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:3563–3568.