

## Diferencias de glicosilación entre las isoformas de proteínas priónicas normales y patógenas

Pauline M. Rudd, Tama Endo, [...] y Raymond A. Dwek

[Información adicional del artículo](#)

### RESUMEN

La proteína priónica consiste en un conjunto de variantes glicosiladas o glicofomas. Las enzimas que dirigen el procesamiento de oligosacáridos y, por lo tanto, controlan el perfil de glucano para cualquier glicoproteína dada, a menudo son muy sensibles a otros eventos que tienen lugar dentro de la célula en la que se expresa la glicoproteína. Las alteraciones en las poblaciones de azúcares unidos a las proteínas pueden reflejar cambios causados, por ejemplo, por procesos de desarrollo o por enfermedades. Aquí informamos que las proteínas priónicas (PrP) normales (PrP<sup>C</sup>) y patógenas (PrP<sup>Sc</sup>) de hámsteres sirios contienen el mismo conjunto de al menos 52 oligosacáridos ligados a N bi-, tri- y tetraantenary, aunque las proporciones relativas de individuales los glicanos difieren. Esta conservación de la estructura sugiere que la conversión de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> no se limita a un subconjunto de PrP que contienen azúcares específicos. En comparación con la PrP<sup>C</sup>, la PrP<sup>Sc</sup> contiene niveles reducidos de glicanos con residuos de GlcNAc que se bisecan y niveles elevados de azúcares triantenarios y tetraantenarios. Este cambio es consistente con una disminución en la actividad de *N*-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII) hacia PrP<sup>C</sup> en células donde se forma PrP<sup>Sc</sup> y argumenta que, al menos en algunas células que forman PrP<sup>Sc</sup>, la maquinaria de glicosilación ha sido perturbada. La reducción de la actividad de GnTIII es intrigante tanto con respecto a la patogenia de la enfermedad priónica como a la ruta de replicación de los priones.

**Palabras clave:** *N*-acetilglucosaminiltransferasa III prurigo lumbar

La transmisión de enfermedades priónicas, también conocidas como encefalopatías espongiiformes, implica la conversión de la proteína priónica normal (PrP<sup>C</sup>) en un conformero causante de enfermedades (PrP<sup>Sc</sup>) ([1](#)). Numerosos datos sostienen que los priones son proteínas infecciosas compuestas exclusivamente por PrP<sup>Sc</sup>; la formación de PrP<sup>Sc</sup> implica la adquisición de una gran cantidad de hoja  $\beta$  y una reducción modesta de la hélice  $\alpha$  ([2](#)).

La proteína priónica contiene dos sitios de *N*-glicosilación conservados (Asn-181 y Asn-197 en el hámster sirio). Las funciones de los azúcares aún no están establecidas, aunque los ratones transgénicos que expresan priones con

deleciones de uno o ambos sitios de glicosilación muestran patrones inusuales de depósito de PrP<sup>Sc</sup> (3). También se ha propuesto que los patrones de bandas SDS/PAGE específicos, que representan el núcleo resistente a la proteasa de PrP<sup>Sc</sup> (designado PrP 27–30) con cero, uno o dos sitios de glicosilación ocupados, se correlacionan con diferentes cepas de priones (4). Esta hipótesis ha resultado controvertida y el tráfico subcelular de PrP argumenta en contra de que las cadenas de azúcar especifiquen las propiedades codificadas por cepas (5–9). En la actualidad, no se han informado comparaciones detalladas de la glicosilación entre PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>Sc</sup>, aunque estudios anteriores de PrP 27-30 [de hámsteres sirios \(10-14\) y ratones \(15\)](#) han indicado que la glicosilación es compleja. Un estudio reciente de glicanos PrP<sup>Sc</sup> murinos por MS (15) ha demostrado que ambos sitios están parcialmente ocupados y que contienen conjuntos de azúcares diferentes pero superpuestos.

Ahora hemos comparado la composición del grupo de oligosacáridos liberados de la PrP<sup>C</sup> aislada de cerebros normales de hámster sirio (SHa) (PrP<sup>C</sup>) con la del grupo de azúcares liberados de la PrP 27–30 aislada de los cerebros de hámsteres infectados con scrapie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación de PrP<sup>C</sup> y PrP 27–30.

Se preparó PrP<sup>C</sup> de longitud completa a partir de cerebros adultos de SHa usando el mAb 3F4 unido a proteína A agarosa. A continuación, se pasó PrP<sup>C</sup> a través de proteína A Sepharose y una columna TSK 3000 HPLC GPC para eliminar los niveles bajos de IgG y polímeros de glucosa lixiviados de las columnas anteriores. Las fracciones que contenían PrP<sup>C</sup> se combinaron y dializaron durante la noche a temperatura ambiente frente a agua pura MilliQ que contenía NaN<sub>3</sub> al 0,005 % y se liofilizaron antes de la hidrazinólisis.

La PrP 27–30 se preparó a partir de cerebros SHa infectados con scrapie mediante digestión con proteinasa K, que escinde la región N-terminal de la proteína dejando los residuos 90–231 (16). Por lo tanto, la PrP 27-30 fue representativa de toda la población de PrP<sup>Sc</sup> conformacionalmente alterada en el cerebro, incluido el amiloide, la PrP<sup>Sc</sup> adherida a las superficies celulares y la PrP<sup>Sc</sup> que se somete al proceso de reciclaje celular. La PrP 27–30 se concentró mediante centrifugación en gradiente de sacarosa. El sedimento se resuspendió en 1 ml de guanidina HCl 6 M durante 18 horas a 4 °C. La proteína se precipitó en guanidina HCl con 5 volúmenes de etanol y se centrifugó a 100 000 × g durante 30 min. El sedimento se lavó con etanol y se resuspendió en NaOAc 20 mM (pH 5,5) y SDS al 0,1 %, finalmente se purificó por GPC en una columna HPLC TSK 3000, se dializó en agua que contenía NaN<sub>3</sub> al 0,005 % y se liofilizó antes de la hidrazinólisis. Los glicanos se liberaron en dos reacciones separadas de hidrazinólisis a partir de dos preparaciones diferentes de SHa PrP 27–30 y PrP<sup>C</sup> y por el péptido N-glucosidasa-F de geles SDS/PAGE siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (17).

### **Liberación y Re - N -Acetilación de Glicanos.**

Aproximadamente 30 µg de cada proteína se dializaron contra agua y se liofilizaron. Los glicanos se liberaron con hidracina a 85 °C y se re- N -acetilaron usando un GlycoPrep 1000 (Oxford GlycoSciences, Abingdon, Reino Unido).

### **Marcaje fluorescente del terminal reductor con 2-aminobenzamida (2-AB).**

Los glicanos liberados se evaporaron a sequedad usando una centrífuga de vacío. El marcaje con 2-AB se llevó a cabo mediante aminación reductora utilizando el kit de marcaje Oxford GlycoSciences Signal ( [18](#) ).

### **Secuenciación simultánea de exoglucosidasa del conjunto de glicanos liberados.**

Las soluciones de glicano se evaporaron a sequedad en una centrífuga de vacío. Se añadió un total de 10 µl de soluciones de enzimas estandarizadas (obtenidas de Oxford GlycoSciences) de la siguiente manera y las mezclas se incubaron durante 16–24 h a 37 °C en tampón de citrato/fosfato 100 mM (pH 5) que contenía acetato de zinc 0,2 mM y Cloruro de sodio 0,15 M. Las condiciones para las enzimas individuales en las matrices fueron las siguientes: *Arthrobacter ureafaciens* sialidasa (EC 3.2.1.18 , ABS): 1–2 unidades/ml; concentración de sustrato, 5–30 µM; α-fucosidasa de harina de almendras (EC 3.2.1.111 , AMF): 10 unidades/ml/1 mg/ml BSA; β-galactosidasa testicular bovina (EC 3.2.1.23 , BTG): 3 miliunidades/ml; concentración de sustrato 20 µM; α-fucosidasa de riñón bovino (EC 3.2.1.51, BKF). Las muestras se purificaron de enzimas y sales antes del tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz MS (MALDI-TOF MS) pasándolas a través de resinas de lecho mixto de Chelex 100 (Na<sup>+</sup>)/Dowex AG50X 12 (H<sup>+</sup>)/Ag3X 4A (OH<sup>-</sup>)/QAE Sephadex A-25. Las muestras se purificaron de las exoglucosidasas antes del análisis por HPLC pasándolas a través de un tubo de microcentrífuga insertado con un filtro de unión a proteínas (Microspin 45 µm CN, Pro-Mem, RB Radley, Essex, Reino Unido). Los filtros se lavaron con 15 µl de acetonitrilo al 5%.

### **Separaciones de fase normal de oligosacáridos neutros y ácidos.**

Las separaciones de fase normales se realizaron en una columna de cromatografía GlycoSep-N (Oxford GlycoSciences) y las estructuras se asignaron de acuerdo con la ref. [19](#) \_

### **Separación de Glicanos por Carga.**

La cromatografía de intercambio aniónico débil se llevó a cabo utilizando una columna GlycoSepC (Oxford GlycoSciences) según la ref. [20](#) \_

### **MALDI-TOF MS.**

Los datos se adquirieron en un instrumento de sector magnético Micromass AutoSpec-FPDQ equipado con un láser de nitrógeno pulsado (337 nm) y un

detector de matriz ( [21](#) ), (Micromass , Manchester, Reino Unido). Las muestras se prepararon añadiendo la muestra de oligosacárido (1  $\mu$ l) en agua a la solución matriz [3  $\mu$ l de una solución saturada de ácido 2,5-dihydroibenzoico (2,5-DHB) en acetonitrilo] en el objetivo del espectrómetro de masas y permitiéndole para secar a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se recristalizó en 1  $\mu$ l de etanol ( [22](#) ). El detector de matriz se fijó en la posición de alta resolución y el rango de masas se fijó para que fuera apropiado para la muestra que se estaba examinando. Para la adquisición de datos, el láser se hizo funcionar a plena potencia y el rayo láser se movió manualmente sobre la muestra para compensar el agotamiento de la muestra bajo el rayo láser.

### Modelado Molecular.

Esto se realizó en una estación de trabajo Silicon Graphics Indigo 2 utilizando el software INSIGHTII y DISCOVERY (Molecular Simulations, San Diego). Las figuras se produjeron utilizando el programa MOLSCRIPT ( [23](#) ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los conjuntos de glucanos de PrP<sup>c</sup> y PrP 27-30 se liberaron mediante hidrazinólisis y los glucanos se analizaron mediante MALDI MS (Fig.([Figura 1;1](#); [MesaTabla 1\)1](#)) y, después del marcaje fluorescente con 2-AB ( [18](#) ), mediante cromatografía de intercambio aniónico débil (datos no mostrados) y HPLC de fase normal (NP) (Fig.([Figura 2;2](#); [MesaTabla 1\).1](#)). Las estructuras se asignaron a partir de las composiciones de MS, las posiciones de elución de NP HPLC expresadas en unidades de glucosa, los valores incrementales previamente asignados para la adición de residuos de monosacáridos a los núcleos de glucano ( [19](#) ) y los resultados de las digestiones de cada conjunto de glucanos mediante el uso de matrices de exoglucosidasas ( [24](#) ). (Higo. ([Figura 2;2](#); [MesaTabla 1\).1](#)).



[Figura 1](#)

Extracción retardada de iones positivos MALDI MS de los glucanos neutros de PrP<sup>c</sup> (traza superior) y PrP 27–30 (traza central) registrados a partir de 2,5-DHB. La identificación de los picos se da en la [Tabla 1.1](#). Los glicanos se observaron como [M+Na] ...

No.	Mass <sup>1</sup>	GU <sup>2</sup>	% Total <sup>3</sup>		Comp. <sup>4</sup>	Structure <sup>5</sup>
			PrP <sup>C</sup>	PrP 27-30		
Glycans found in the prion glycoprotein						
1	1647.6	6.70	2.93	1.57	4,4,1	A2G1(1,6)F
2		6.82				A2G1(1,3)F
3	1663.6	7.16	3.59	0.63	5,4,0	A2G2
4	1658.6	6.25	2.83	4.01	3,5,1	A2G6FB
5	1793.6	-	1.23	1.10	4,4,2	A2G1F2
6	1809.6	7.57	5.38	4.56	5,4,1	A2G2F
7	1825.6	-	2.08	1.49	6,4,0	Hybrid
8	1850.7	7.03	3.97	3.23	4,5,1	A2G1(1,3)FB
9	1955.7	-	5.39	4.96	5,4,2	A2G2F2
Σ	1971.7	-	1.89	1.97	6,4,1	Hybrid
		2.46	0.44	3.27	4,5,2	A2G1F2F2

tabla 1

Estructuras y datos analíticos de glicanos en las glicoproteínas priónicas

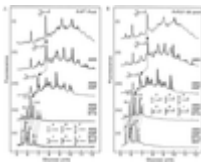


Figura 2

El análisis de HPLC de fase normal de las agrupaciones de glicanos marcados con 2-AB derivados de PrP<sup>C</sup> ( A ) y PrP 27–30 ( B ). Se sometieron alícuotas de las mezclas de glicanos a digestiones con exoglucosidasa utilizando las matrices de enzimas que se muestran en cada panel. Picos sombreados ...

La cromatografía de intercambio aniónico débil ( 20 ) y el análisis MALDI MS de los grupos de glicanos intactos (datos no mostrados) revelaron que no había una diferencia significativa en las proporciones relativas de las poblaciones de estructuras sialiladas en PrP<sup>C</sup> y PrP 27–30. En cada caso, ≈48 % de los azúcares eran neutros, el 20 % contenía un residuo de ácido siálico, el 18 % estaba disialilado, el 10 % estaba trisialilado, el 3,5 % estaba tetrasialilado y el 0,5 % contenía cinco ácidos siálicos.

Los pools de glicanos desialilados también fueron analizados por MALDI MS (Fig.(Figura 11 A y B)). En los espectros de PrP<sup>C</sup> y PrP 27–30, estaban presentes 54 picos de iones con masas consistentes con estructuras de oligosacáridos. Muchos de estos picos contenían glicanos isoméricos (Tabla (Tabla 1).1). NP-HPLC resolvió al menos 10 de estas estructuras isoméricas y confirmó que hay muy pocas diferencias entre los dos grupos (Fig.(Figura 22 Aii y Bii)). Los productos de la digestión resultantes de la incubación de las reservas de glicanos con sialidasa y fucosidasa de harina de almendras (especificidad para la fucosa unida α1–3/4 a GlcNAc) fueron consistentes con la presencia de fucosa del brazo externo que forma parte de un Lewis X<sup>o</sup> sialil Lewis<sup>x</sup> tipo de estructuras (Fig.(Figura 22 Aiii y Biii)). Análisis de la reserva de glicanos después de la digestión con una matriz de enzimas que contiene β-galactosidasa de testículos bovinos (Fig.(Figura 22 Aiv y Biv)) mostraron pérdidas de galactosa consistentes con la presencia de estructuras bi-, tri- y tetraantenarias que contenían fucosilación central (confirmado por incubación con α-fucosidasa de riñón bovino (Fig.(Figura 22 Av y Bv)). La incubación de los glicanos en esta fracción con *Streptococcus pneumoniae* β- N -

acetilhexosaminidasa a una concentración específica de brazo (5 miliunidades/ml, datos no mostrados) confirmó la presencia de estructuras bi-, tri- y tetraantenarias bisectadas y no bisectadas y mostró que la mayoría de glucanos triantenarios se ramificaron en el brazo  $\alpha$ 1,3 del núcleo de trimanosilo.

Los glucanos que se identificaron tanto en PrP<sup>c</sup> como en PrP 27–30 eran típicos de los azúcares cerebrales en el sentido de que estaban muy sialilados y contenían una alta proporción de estructuras con uno o más residuos de fucosa del brazo externo (59 %) y con GlcNAc bisectriz ( 25 %). El noventa y cinco por ciento de las estructuras contenían núcleo de fucosa (Fig.(Figura 22 Aiv y Biv ). Las estructuras no bisectadas se encontraron con y sin núcleo de fucosa, mientras que las estructuras bisectadas generalmente tenían el núcleo fucosilado. Después de la desialización, la estructura principal ( $\approx$ 9,5 % en PrP<sup>c</sup> y 7,9 % en PrP 27–30) fue el glicano biantenarico monogalactosilado que contenía un residuo de fucosa en el brazo externo [A2G1FBF ( $\alpha$ 1,3 a GlcNAc) véase la nota al pie de la Tabla Tabla 11 para la designación de estructuras]. Higo.Figura 22 destaca la digestión de este oligosacárido por los arreglos enzimáticos.

El grado de heterogeneidad y la conservación de las estructuras hace que sea poco probable que un subconjunto de moléculas de PrP<sup>c</sup> que llevan azúcares particulares esté predispuesto a convertirse en PrP<sup>sc</sup>. También es poco probable que la estructura de la proteína alrededor de los sitios de glicosilación sea significativamente diferente en estos dos conjuntos hipotéticos de moléculas de PrP<sup>c</sup> cuando el procesamiento de glucano tiene lugar en el aparato de Golgi, porque se sabe que la estructura tridimensional local juega un papel en la dirección su propia glicosilación ( 26 ). El trabajo anterior de Endo *et al.* ( 12) concluye que ambos sitios de glicosilación en SHa PrP 27–30 están ocupados. Nuestros datos preliminares (datos no mostrados) basados en el análisis SDS/PAGE de SHa PrP 27–30 y PrP<sup>c</sup> sugieren que no hay diferencias importantes en la ocupación del sitio entre las dos formas y que la mayoría de las glicofomas de SHa PrP contienen dos sitios de glicosilación ocupados. Por lo tanto, la ocupación selectiva del sitio y el procesamiento específico del sitio no parecen explicar los datos actuales, ni el nivel de ocupación del sitio en sí mismo es un requisito para la formación de PrP<sup>sc</sup>. Sin embargo, las variaciones en la ocupación del sitio pueden afectar la orientación neuronal de PrP<sup>c</sup> y, por lo tanto, la deposición selectiva de PrP<sup>sc</sup> ( 3 ).

Aunque el rango de oligosacáridos en PrP<sup>c</sup> y PrP 27–30 fue idéntico, las proporciones relativas de algunos glicanos fueron diferentes en las dos formas. En particular, en el resumen final , donde todos los azúcares del brazo exterior se han digerido para revelar las estructuras de los núcleos de glicano (Fig.(Figura 22 Av y Bv ; Mesa Tabla 2),2), se hizo evidente que la proporción de glucanos bisectados se redujo en un 11 % en PrP 27–30 en comparación con la de PrP<sup>c</sup>, mientras que la proporción de glucanos triantenarios y tetraantenarios aumentó en un 5 % y un 10 %, respectivamente. La proporción de glicanos bisectados a no bisectados en PrP 27–30 fue de 1,3:1 en comparación con 2:1 en PrP<sup>c</sup>. MALDI MS confirmó este hallazgo. El espectro de diferencia (Fig.(Figura 1,1, trazo inferior) destaca los cambios en la concentración de todos los glicanos de PrP 27–30 en comparación con los de

PrP<sup>C</sup> y muestra la reducción en la abundancia de azúcares bisectados y un aumento en la proporción de glicanos tri y tetraantenarios en PrP 27–30 .

Table 2  
The structures and relative proportions of the glycans in Fig. 2A and B (Fig. 2A and B)

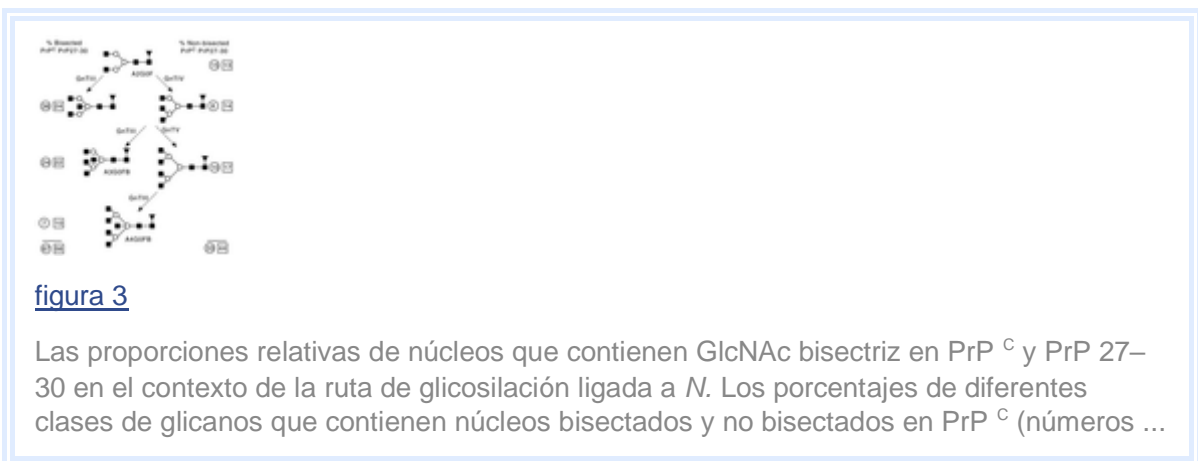
Peak	Compound	GU	% Glycan cores after SFGF digest				PrP <sup>Sc</sup> %, ±1-bisect
			PrP <sup>C</sup> , Fig. 2A		PrP 27–30, Fig. 2B		
			Total	±1-bisect	Total	±1-bisect	
A	A2G0	5.53	15.4	30	13.1	35	+5
J	A2G0B	5.85	35.3	70	24.1	65	-5
B	A3G0	5.94	8.1	25	14.1	39	+14
C	A3G0B	5.18	23.7	75	22.2	61	-14

Tabla 2

Las estructuras y proporciones relativas de los glicanos en la Fig. Figura 22 Av y Bv (Fig.(Figura 22 A y B)

Los glicanos se liberaron en dos reacciones de hidrazinólisis separadas de dos preparaciones diferentes de SHa PrP 27–30 y PrP<sup>C</sup> y por la proteína *N*-glucosidasa-F de geles SDS / PAGE siguiendo el procedimiento descrito en la ref. 17\_ No se observaron diferencias significativas en las proporciones de las poblaciones de glicoformas en la HPLC final (error inferior a ±1%) o en los perfiles MALDI. Se realizaron muchas digestiones de enzimas utilizando enzimas en matrices y de forma individual para confirmar los hallazgos. Los datos mostrados son de dos análisis representativos.

Estos resultados se explican más simplemente por una regulación a la baja de la actividad de la *N*-acetilglucosamina transferasa-III (GnTIII) en las células a partir de las cuales se formó la PrP<sup>Sc</sup>. En cualquier etapa del procesamiento de glicanos, es posible una mayor ramificación siempre que no se haya agregado un residuo de GlcNAc bisectriz en el enlace β1-4 al núcleo de pentasacárido conservado (Fig.(Fig. 3).3). Nuestros datos argumentan que una porción sustancial de PrP<sup>C</sup> se convierte en PrP<sup>Sc</sup> en células en las que se ha perturbado la maquinaria de glicosilación.



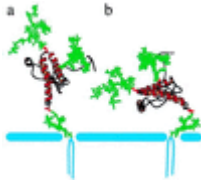
Los cambios observados en la glicosilación entre PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>Sc</sup> probablemente reflejan cambios bioquímicos que ocurren dentro de las células, quizás aquellos involucrados en la patogénesis de la neurodegeneración. Los hámsters sirios, de los que se aisló la PrP 27-30, mostraron signos clínicos de disfunción del

sistema nervioso central. Estudios anteriores mostraron que tales hámsters también muestran cambios neuropatológicos francos ( [27](#) ). Las asociaciones entre la perturbación de la maquinaria de glicosilación y la patología han sido bien documentadas en varios estados de enfermedad. Por ejemplo, en la artritis reumatoide (AR) hay una disminución en la población de azúcares IgG séricos que contienen galactosa terminal, lo que se correlaciona con la actividad de la enfermedad ( [28](#) ) y el mal pronóstico ( [29](#) ). En la PrP<sup>Sc</sup>, como en la AR, no hay glicanos asociados con el estado patológico que no estén presentes en la glicoproteína normal. En el caso de la AR, los cambios en el patrón de glicosilación de IgG pueden reflejar una disminución en la actividad de la galactosil transferasa (GTasa) ( [30](#) , [31](#) ). Curiosamente, también se observó una alteración en la actividad de GnTIII en la AR donde hubo un aumento específico de Fab en los oligosacáridos que contenían una *N*-acetilglucosamina bisectriz ( [32](#) ). Queda por determinar si la reducción de la actividad de GnTIII en las células productoras de PrP<sup>Sc</sup> se correlaciona con la gravedad de la enfermedad y si la glicosilación de otras glicoproteínas en PrP<sup>Sc</sup> Las células productoras se ven afectadas de manera similar. Asimismo, queda por determinar la causa subyacente de la regulación a la baja de la actividad de GnTIII.

La prevalencia de GnTIII en el tejido cerebral en comparación con muchos otros tejidos se ha demostrado en ratones ( [33](#) ) y muchos estudios han demostrado una asociación de niveles alterados de GlcNAc bisectriz con procesos patológicos ( [17](#) , [31-35](#) ). La regulación del gen humano GnTIII (*Mgat3*) es compleja y tiene múltiples promotores ( [34](#) ), lo que sugiere que hay muchos puntos en los que la expresión génica podría verse afectada por eventos celulares. Los ratones deficientes en GnTIII exhibieron celularidad y morfología normales en una variedad de órganos, incluido el cerebro ( [35](#) ).

En la <sup>Fig</sup> [Figura 4.4](#). Ambos *N*-glicanos están unidos a la región de la proteína con la estructura secundaria mejor definida, el motivo hélice-bucle-hélice con puente disulfuro en el extremo C terminal ( [36](#) , [37](#) ). Esta cara de la proteína tiene una carga negativa neta ( [37](#) ) y, por lo tanto, es poco probable que los glicanos cargados negativamente participen en interacciones de largo alcance con la superficie de la proteína. Los glicanos impedirán estéricamente cualquier interacción proteína-proteína directa con esta cara de la molécula, ya sea intramolecularmente, involucrando los residuos 1-90, o intermolecularmente. En promedio, los ácidos siálicos de cada glucano aportan tres cargas negativas a la glicoproteína; por lo tanto, dos glucanos aumentarán significativamente la carga negativa en esta región y, por lo tanto, aumentarán el momento dipolar general de la proteína. Los glucanos tri y tetraantenarios, de los cuales hay una mayor proporción en PrP<sup>Sc</sup>, son más grandes y más rígidos que las estructuras biantenarias ( [38](#) ). Dos orientaciones posibles se muestran en la [Fig.Figura 4,4](#), uno con la proteína extendiéndose lo más lejos posible de la membrana y otro con la proteína orientada de modo que su cara positiva esté hacia la membrana ( [37](#) ). En ambos casos, la región de la proteína que se aleja de la membrana está cubierta por un glicano y protegida de influencias externas.





**Figura 4**

Un modelo molecular de PrP<sup>C</sup>, residuos 90–231, basado en una de las estructuras de RMN de la proteína recombinante ( [36](#) ), la secuencia del ancla GPI ( [39](#) ) y el análisis de N-glicanos. Las estructuras de glicano (A3G3FBS3 en el sitio 181 y A4G4FBS4 en el sitio ...

Tanto las proteínas priónicas normales como las patogénicas muestran una amplia heterogeneidad en sus poblaciones de glicanos. El análisis de glicanos demuestra que el mismo conjunto de glicanos está presente tanto en las moléculas normales como en las enfermas y que las diferencias en las proporciones relativas de los glicanos bi-, tri- y tetraantenarios, así como la disminución de las estructuras divididas en PrP<sup>Sc</sup> pueden ser explicado por una disminución en la actividad de una enzima, GnTIII. Estos hallazgos sugieren que algunas células que forman PrP<sup>Sc</sup> experimentan un cambio que disminuye la actividad de una enzima en la ruta de glicosilación. Queda por determinar la causa y el significado de este cambio, cuyo impacto podría no limitarse a la ruta de glicosilación.

## EXPRESIONES DE GRATITUD

Agradecemos a Neil Murphy por su excelente asistencia técnica. El trabajo en el Oxford Glycobiology Institute fue apoyado por el esquema LINK del Consejo de Investigación Científica de Biotecnología y Bioquímica/Departamento de Comercio e Industria, la Comisión Europea (Grant BIO4-CT95-0138) y Oxford GlycoSciences Ltd.

## ABREVIATURAS

PrP	proteína priónica
PrP <sup>C</sup>	PrP normal
PrP <sup>Sc</sup>	confórmero causante de enfermedades PrP
sha	hámster sirio

GNT III	<i>N</i> -acetilglucosaminiltransferasa III
A(1–4)	el número de antenas GlcNAc vinculadas al núcleo de trimanosilo
G(0–4)	el número de residuos Gal en la estructura
F(1–4)	el número de residuos Fuc en la estructura
H	hexosa (Hombre, Gal)
norte	<i>N</i> -acetilhexosamina
B	bisectriz de GlcNAc
S	ácido siálico

EM MALDI-TOF ionización-desorción láser asistida por matriz-tiempo de vuelo MS

2-AB 2-aminobenzamida

## INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Proc Natl Acad Sci US A. 9 de noviembre de 1999; 96(23): 13044–13049.

doi: [10.1073/pnas.96.23.13044](https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13044)

IDPM: PMC23897

PMID: [10557270](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10557270/)

Bioquímica

[Pauline M. Rudd](#) , \* [Tama Endo](#) , † [Cristina Colominas](#) , \* [Darlene Groth](#) , ‡ [Susan F. Wheeler](#) , \* [David J. Harvey](#) , \* [Mark R. Wormald](#) , \* [Hana Serban](#) , ‡ [Stanley B. Prusiner](#) , ‡ [Akira Kobata](#) , † y [Raymond A. Dwek](#) \* §

\* Instituto de Glicobiología, Departamento de Bioquímica, Universidad de Oxford, South Parks Road, Oxford, OX1 3QU, Reino Unido; ‡ Instituto de Enfermedades Neurodegenerativas, Departamentos de

Neurología y Bioquímica y Biofísica, HSE-781, Universidad de California, San Francisco, CA 94143-0518; y † Instituto Metropolitano de Gerontología de Tokio, 35-2 Sakaecho Itabashi-ku, Tokio 173, Japón

§ A quién deben dirigirse las solicitudes de reimpresión.

Contribución de Stanley B. Prusiner

Aceptado el 17 de agosto de 1999.

[Copyright](#) © 1999, Academia Nacional de Ciencias

Los artículos de las Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América se proporcionan aquí por cortesía de **la Academia Nacional de Ciencias**.

## REFERENCIAS

1. Prusiner SB. *Ciencia*. 1991; 252 :1515–1522. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
2. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90 :10962–10966. [ [Artículo gratuito de PMC](#) ] [ [PubMed](#) ] [ [Google Scholar](#) ]
3. DeArmond SJ, Mobley WC, DeMott DL, Barry RA, Beckstead JH, Prusiner S B. *Neurología*. 1998; 50 :1271–1280. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
4. Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF. *Nature (Londres)* 1996; 383 :685–690. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
5. Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, Mastrianni J, Lugaresi E, Gambetti P, Prusiner S B. *Science*. 1996; 274 :2079–2082. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
6. Prusiner SB. *Ciencia*. 1997; 278 :245–251. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
7. Somerville RA, Chong A, Mulqueen OU, Birkett CR, Wood SC, Hope J. *Nature (Londres)* 1997; 386 :564. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
8. Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB. *Nat Med*. 1998; 4 :1157–1165. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
9. Mastrianni JA, Nixon R, Layzer R, Telling GC, Han D, DeArmond SJ, Prusiner S B. *N Engl J Med*. 1999; 340 :1630–1638. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
10. Bolton DC, Meyer RK, Prusiner S B. *J Virol*. 1985; 53 :596–606. [ [Artículo gratuito de PMC](#) ] [ [PubMed](#) ] [ [Google Scholar](#) ]
11. Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner S B. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83 :2310–2314. [ [Artículo gratuito de PMC](#) ] [ [PubMed](#) ] [ [Google Scholar](#) ]

12. Endo T, Groth D, Prusiner SB, Kobata A. *Bioquímica*. 1989; 28 :8380–8388. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
13. Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, Endo T, Groth D, Tarentino A, Borchelt DR, Teplow D, Hood L, Burlingame A, et al. *Arch Biochem Biophys*. 1989; 274 :1–13. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
14. Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, Prusiner S B. *Bioquímica*. 1993; 32 :1991–2002. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
15. Stimson E, Hope J, Chong A, Burlingame A L. *Bioquímica*. 1999; 38 :4885–4895. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
16. Prusiner SB, Groth DF, Bolton DC, Kent SB, Hood L E. *Cell*. 1984; 38 :127–134. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
17. Kuster B, Wheeler SF, Hunter AP, Dwek RA, Harvey D J. *Anal Biochem*. 1997; 250 :82–101. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
18. Bigge JC, Patel TP, Bruce JA, Goulding PN, Charles SM, Parekh R B. *Anal Biochem*. 1995; 230 :229–238. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
19. Guile GR, Rudd PM, Wing DR, Prime SB, Dwek R A. *Anal Biochem*. 1996; 240 :210–226. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
20. Guile GR, Wong SY, Dwek R A. *Anal Biochem*. 1994; 222 :231–235. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
21. Bordoli RS, Howes K, Vickers RG, Bateman RH, Harvey D J. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1994; 8 :585–589. [ [Google académico](#) ]
22. Harvey DJ. *Espectro de masas común rápido*. 1993; 7 :614–619. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
23. Kraulis PJ. *J App Crystallogr*. 1991; 24 :946–950. [ [Google académico](#) ]
24. Rudd PM, Guile GR, Kuster B, Harvey DJ, Opdenakker G, Dwek R A. *Nature (Londres)* 1997; 388 :205–207. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
25. Zamze S, Harvey DJ, Chen YJ, Guile GR, Dwek RA, Wing DR *Eur J Biochem*. 1998; 258 :243–270. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
26. Rudd PM, Wormald MR, Harvey DJ, Devashayem M, McAlister MSB, Brown MH, Davis SJ, Barclay AN, Dwek R A. *Glycobiology*. 1999; 9 :443–458. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
27. Baringer JR, Bowman KA, Prusiner S B. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1983; 42 :539–547. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]

28. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, Rademacher TW, Mizuochi T, Taniguchi K, Matsuta K, et al. *Naturaleza* (Londres) 1985; 316 :452–457. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
29. Young A, Sumar N, Bodman K, Goyal S, Sinclair H, Roitt I, Isenberg D. *Arthritis Rheumatism*. 1991; 34 :1425–1429. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
30. Axford JS, Mackenzie L, Lydyard PM, Hay FC, Isenberg DA, Roitt I M. *Lancet*. 1987; II : 1486–1488. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
31. Furukawa K, Matsuta K, Takeuchi F, Kosuge E, Miyamoto T, Kobata A. *Int Immunol*. 1990; 2 :105–112. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
32. Youngs A, Chang SC, Dwek RA, Scragg I G. *J Biol Chem*. 1996; 314 :621–630. [ [Google académico](#) ]
33. Bhaumik M, Harris T, Sundaram S, Johnson L, Guttenplan J, Rogler C, Stanley P. *Cancer Res*. 1998; 58 :2881–2887. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
34. Koyama N, Miyoshi E, Ihara Y, Kang R, Nishikawa A, Taniguchi N. *Eur J Biochem*. 1996; 238 :853–861. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
35. Priatel JJ, Sarkar M, Schachter H, Marth J D. *Glycobiology*. 1997; 7 :45–56. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
36. James TL, Liu H, Ulyanov NB, Farr Jones S, Zhang H, Donne DG, Kaneko K, Groth D, Mehlhorn I, Prusiner SB, Cohen F E. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94 :10086–10091. [ [Artículo gratuito de PMC](#) ] [ [PubMed](#) ] [ [Google Scholar](#) ]
37. Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K. *Nature* (Londres) 1996; 382 :180–182. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
38. Rutherford TJ, Neville DC, Homans SW *Bioquímica*. 1995; 34 :14131–14137. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
39. Stahl N, Baldwin MA, Hecker R, Pan KM, Burlingame AL, Prusiner S B. *Bioquímica*. 1992; 31 :5043–5053. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]
40. Petrescu AJ, Petrescu SM, Dwek RA, Wormald M R. *Glycobiology*. 1999; 9 :343–352. [ [PubMed](#) ] [ [Google Académico](#) ]

