

O gene *PRNP* codificador da proteína prion e o mal da vaca louca

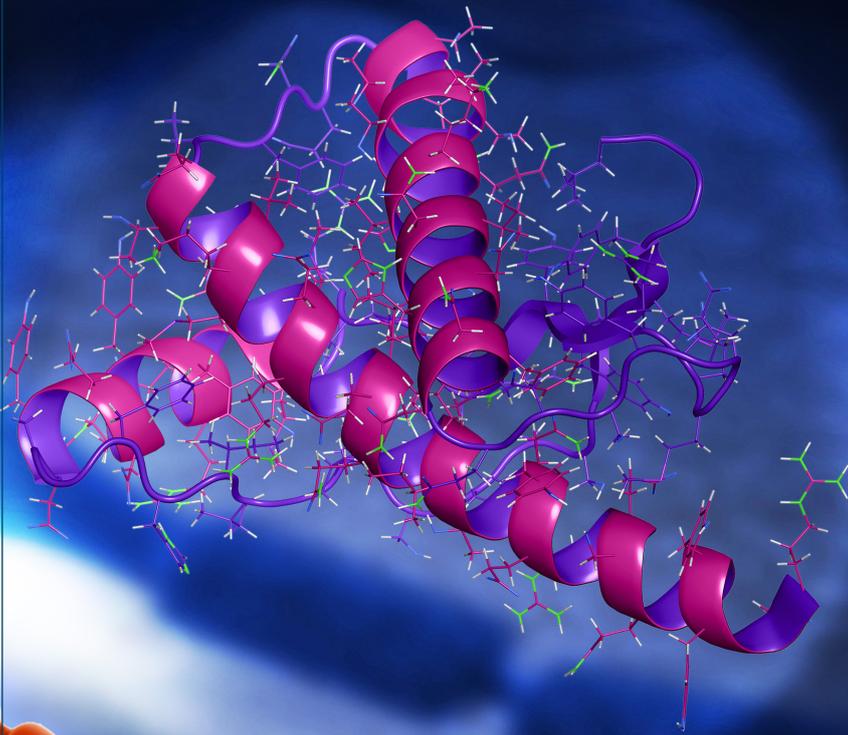
Gabriel José de Carli^{1,2}, Tiago Campos Pereira^{1,2}

¹ Depto. de Biologia, Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

² Programa de Pós-Graduação em Genética, FMRP, Universidade de São Paulo, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP

Autor para correspondência: tiagocampospereira@ffclrp.usp.br

Palavras-chave: kuru, insônia familiar fatal, doença de Creutzfeldt-Jakob, Gerstmann-Straussler-Scheinker, CJD, GSS



A proteína príon é singular na biologia e medicina devido a uma característica incrível: é capaz de se apresentar em conformações (isto é, estruturas terciárias) com propriedades biológicas totalmente diferentes. A primeira possui papel na manutenção das condições ideais para o bom funcionamento neuronal (homeostase), ao passo que a segunda é patogênica e causa um conjunto de doenças neurodegenerativas fatais com propriedades únicas: são herdáveis, transmissíveis e/ou esporádicas. Os estudos destes aspectos não convencionais da proteína príon já resultaram em dois prêmios Nobel (1976 e 1997). Este artigo apresenta o gene *PRNP*, codificador da proteína príon, suas características e como esse polipeptídeo é capaz de causar doenças devastadoras como o mal da vaca louca. Discussões sobre como essa proteína se propaga e uma inovadora forma de detecção da proteína patogênica também serão apresentadas.

A PROTEÍNA PRÍON (PRNP)

Alguns grupos de mamíferos (primatas, bovinos, ovinos, cervídeos e murinos) possuem uma proteína muito especial denominada príon (PRNP) [revisto em SARNATARO *et al.*, 2017]. Em humanos ela é naturalmente encontrada em mais de 20 diferentes órgãos/tecidos (*e.g.*, medula óssea, esôfago, coração, fígado, placenta, pele, baço, endométrio e pulmão) porém, de forma mais abundante, no cérebro e cerebelo. A príon humana é uma glicoproteína, isto é, um polipeptídeo que possui duas cadeias de oligossacarídeos ligados a ele; a outra extremidade (carboxi-terminal) é ancorada à membrana plasmática via outras modificações químicas.

Não há um consenso na comunidade científica a respeito da função fisiológica precisa da proteína príon no cérebro. Estudos em culturas de células e em diferentes espécies animais sugerem que a proteína PRNP pode atuar na diferenciação e proteção neuronal, na **transdução de sinais** e na homeostase da bainha de mielina do sistema nervoso periférico. Portanto, a proteína príon parece estar envolvida em uma série de atividades

que visam a proteger e permitir o perfeito funcionamento dos neurônios.

O GENE PRÍON (PRNP)

O gene *PRNP* humano é autossômico (localizado no cromossomo 20, banda p13) e contém 2 éxons e um íntron (este último de 12.698 pares de bases; número de acesso no GenBank: NG_009087.1), originalmente identificado no ano de 1986. Curiosamente, a região reguladora desse gene (promotor) não apresenta o domínio ultraconservado “TATA box”, mas contém o domínio “CCAAT box” e regiões ricas em “GC”. A partir desse gene podem ser geradas algumas formas variantes de mRNAs (diferindo um pouco em tamanho), mas quase todas codificam a mesma proteína príon (*major prion protein*). Na “variante 1”, que é a maior, os éxons possuem 419 e 2.380 nucleotídeos (nt) respectivamente. A região codificadora desses éxons corresponde a 762 nt, cuja tradução resulta em uma proteína de 253 resíduos de aminoácidos (Figura 1). O polipeptídeo príon celular (PrP^C- ‘C’ deriva do termo *celular*) apresenta uma **estrutura terciária** rica em hélices α e é sensível à ação de proteases.

Transdução de sinal -

conversão de um sinal físico ou químico para outro tipo de sinal. Por exemplo, conversão de luz em um sinal químico na célula.

Estrutura terciária é a

conformação tridimensional da proteína, isto é, seu enovelamento.

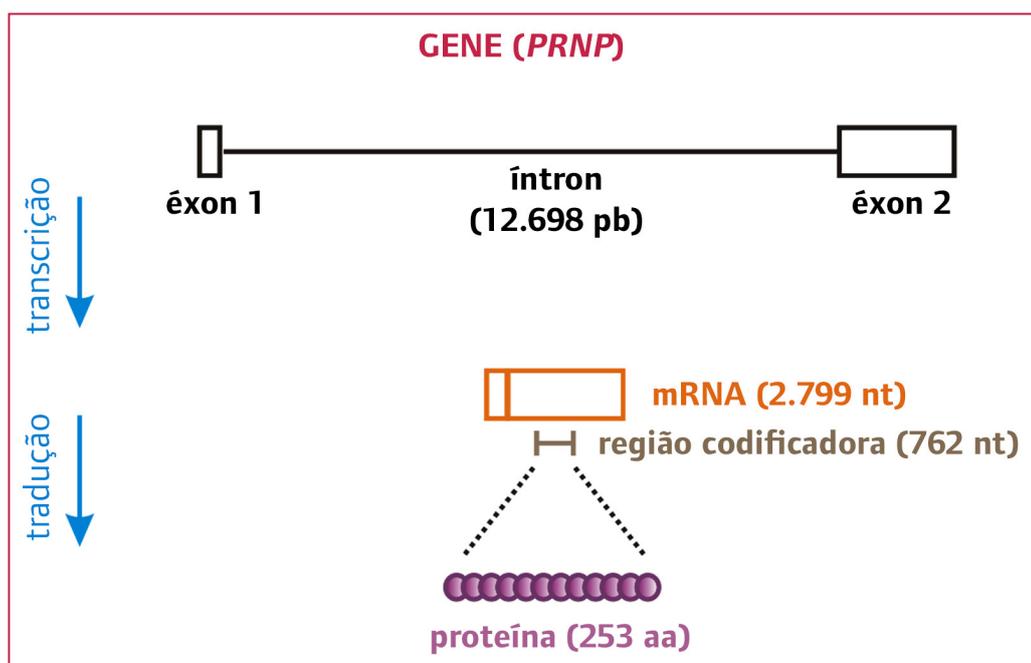


Figura 1.

A estrutura do gene *PRNP*. O gene codificador da proteína príon (*PRNP*) possui apenas dois éxons (mostrados em escala). A transcrição resulta em um RNA mensageiro de aproximadamente 2.800 nucleotídeos (desconsiderando-se a cauda de poliadenosinas). Apenas uma pequena porção do éxon dois é codificante, sendo responsável pela proteína PRNP de 253 resíduos de aminoácidos. Nota: os bancos oficiais de sequências genéticas consideram o “códon de parada” como parte integrante da “região codificadora”, por isso a proteína possui apenas 253 resíduos de aminoácidos.

MUTAÇÕES NO GENE *PRNP*

Kuru - doença causada por príons caracterizada por perda progressiva da coordenação e controle musculares.

Diversas mutações têm sido descritas no gene *PRNP* (ou seus homólogos), causando um grupo de condições neurodegenerativas denominadas conjuntamente de **encefalopatias espongiformes**. Essas doenças têm em comum um longo período de incubação, a morte de muitos neurônios, levando ao surgimento de vacúolos cerebrais que, em última instância, conferem ao cérebro um aspecto de esponja (por isso o termo *espongiforme*), resultando na morte. Exemplos de encefalopatias espongiformes em humanos são: o **Kuru**, a **doença de Creutzfeldt-Jakob** (CJD), a **síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker** (GSS) e a **Insônia Familiar Fatal** (FFI). Em animais podem ser mencionadas as encefalopatias espongiformes: bovina, felina, de mustelídeos, de ungulados exóticos, de veados e de ovelhas (esta última conhecida como *scrapie*).

Síndrome de Gerstmann-Straussler - uma doença

rara, herdável, mediada por príons, de início geralmente em adultos, caracterizada por perda de memória, demência, perda de coordenação de movimentos musculares voluntários e de equilíbrio, além de depósito de placas amiloides no cérebro.

Provavelmente, a encefalopatia espongiforme mais conhecida seja a bovina, vulgarmente conhecida como o 'mal da vaca louca', que afetou o gado do Reino Unido no início da década de 1990. A ingestão de carne contaminada promoveu um aumento dos casos de CJD em humanos no Reino Unido nos anos seguintes (devido ao longo período de incubação) e levou à incineração de grande parte do gado daquela região [BRADLEY, 1998]. Por sua vez, o gado de corte foi possivelmente infectado ao consumir ração composta por carcaças de animais mortos, como ovelhas afetadas por *scrapie*. Note, portanto, que essas encefalopatias espongiformes são transmissíveis (EETs).

Folha β é um tipo específico de padrão de enovelamento proteico, no qual seções da cadeia polipeptídica alinham-se, unidas por ligações de hidrogênio, uma ao lado da outra.

O curioso fato deve-se a uma particularidade da proteína príon: mutações no gene *PRNP* resultam em uma forma alterada da proteína denominada PrP^{Sc} ('Sc' deriva do termo *scrapie*). Esta versão proteica é rica em **folhas β** , resistente a proteases, acumulam-se no ambiente extracelular (em total contraposição à versão celular) e capaz de converter a forma PrP^C em PrP^{Sc}, processo este que pode ser interpretado como a propagação da PrP^{Sc}. Assim, a introdução de uma proteína PrP^{Sc} em uma célula sadia, rica em PrP^C, resultará na modificação de PrP^C em PrP^{Sc}. Esta última é propensa a formar agregados celulares (fibrilas), as quais crescem e estariam relacionadas com a morte neuronal.

Portanto, se um indivíduo tiver uma mutação no gene *PRNP*, pode desenvolver a doença de *Creutzfeldt-Jakob*. Mas, mesmo que ele não tenha a mutação, pode apresentar a doença se consumir carne bovina contaminada (e.g., animal com a doença da vaca louca). Considera-se que a príon bovina ingerida não seja degradada após a ingestão (por ser resistente a proteases) e por fim atinge o tecido nervoso humano, causando a CJD por converter a proteína PrP^C em PrP^{Sc}, desencadeando assim a doença. O fenômeno de conversão (amplificação ou replicação) confere à proteína príon o status de *agente patogênico* desprovido de ácido nucleico - algo singular na biologia.

Doença de Creutzfeldt-Jakob - doença causada

por príons, caracterizada por problemas de memória, nervosismo e que progride para movimentos bruscos e trêmulos das mãos, perda de expressão facial e marcha instável.

Insônia Familiar Fatal

- uma doença causada por príons, caracterizada por insônia, alucinações, delírios e disautonomia precedendo deterioração motora e cognitiva.

Por fim, mesmo não apresentando mutações no gene *PRNP*, nem ingerindo carne contaminada, uma pessoa pode desenvolver doença de *Creutzfeldt-Jakob*, pois a PrP^C pode espontaneamente se converter em PrP^{Sc} . Isso é possível porque, durante o processo de tradução, uma cadeia polipeptídica nascente (emergindo do ribossomo) começa a enovelar-se (procurando uma conformação tridimensional termodinamicamente estável). Erros nesse processo podem ocorrer: a PrP^C pode acidentalmente enovelar-se em PrP^{Sc} ,

que é termodinamicamente mais estável. Portanto, EETs podem surgir por três mecanismos diferentes: herança genética (forma herdável da doença, devido a mutações no gene *PRNP*), contaminação (exposição a PrP^{Sc} , evidenciando a transmissibilidade da doença) ou espontaneamente (forma esporádica da doença, devido ao enovelamento incorreto da proteína príon, na ausência de mutação no gene) (Figura 2). Novamente, esse intrigante aspecto rende a essas encefalopatias uma posição ímpar na medicina.

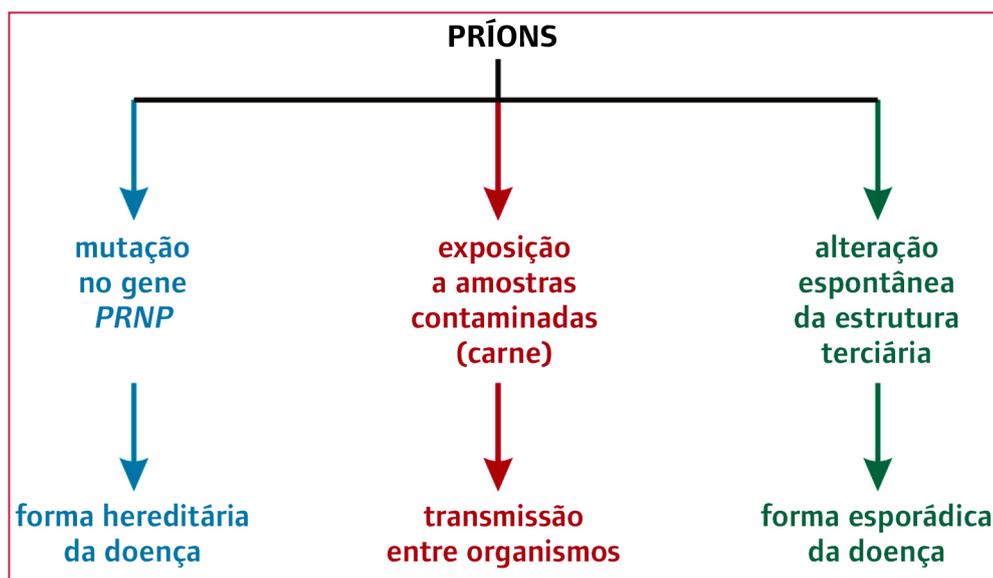


Figura 2. Os três modos de desenvolvimento das encefalopatias espongiformes transmissíveis. De maneira não convencional, as doenças caracterizadas pelo enovelamento errôneo da proteína príon podem emergir de três maneiras. Mutações no gene *PRNP* podem alterar a sequência de aminoácidos da proteína príon, levando ao dobramento errado da proteína (PrP^{Sc}). Indivíduos sem a mutação também podem apresentar a doença, caso sejam expostos a amostras contaminadas com PrP^{Sc} , ou por meio de um enovelamento errôneo espontâneo da proteína príon celular.

CORRELAÇÕES GENÓTIPO-FENÓTIPO

A vasta maioria das mutações identificadas no gene *PRNP* está associada a uma entre as diferentes encefalopatias espongiformes anteriormente elencadas. Por exemplo, indivíduos com CJD apresentam mutações do tipo **VAL180ILE**, **VAL210ILE** e **GLU211GLN**. Já indivíduos com GSS frequentemente apresentam mutações como **PRO102LEU**, **ALA133VAL** e **GLN227TER**. Aparentemente não há uma relação direta entre mutações em uma determinada região da proteína e uma encefalopatia específica.

Curiosamente, algumas mutações podem estar associadas a mais de uma doença, por exemplo, mutações na região correspondente aos aminoácidos 51 e 91 podem gerar CJD/

GSS. Já mutações do tipo **MET129VAL**, **ASP178ASN** e **GLU200LYS** podem resultar em CJD/FFI. Uma possível explicação para o fato de uma mesma mutação causar doenças distintas (apesar de intimamente relacionadas) deve-se a outros aspectos genéticos e ao ambiente a que cada indivíduo é exposto.

Por fim, algumas mutações conferem proteção a algumas encefalopatias espongiformes. Por exemplo, a mutação **GLY127VAL** confere resistência a Kuru, isto é, indivíduos com tal genótipo não adquirem a doença. Adicionalmente, a deleção completa do gene *PRNP* em animais deixa-os resistentes a encefalopatias. Isso se deve ao fato de que sem a PrP^C , PrP^{Sc} , simplesmente não consegue replicar-se. Assim, estratégias que possibilitem a redução temporária da produção da

VAL180ILE – as mutações aqui indicadas estão representadas de acordo com o seguinte padrão: **VAL180ILE** – o aminoácido Valina na posição 180 da cadeia polipeptídica foi substituído pelo aminoácido Isoleucina. **TER**: códon de terminação.

proteína príon celular poderiam, em tese, funcionar como prevenção/terapia contra encefalopatias espongiformes em animais e humanos. Contudo, não se sabe ainda se essa eventual redução da proteína príon celular poderia trazer algum dano ao paciente.

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISSÍVEIS

O diagnóstico de doenças causadas por príons é baseado em vários critérios e envolvem desde testes moleculares para identificação de mutações no gene *PRNP* (sequenciamento, apenas para os casos hereditários), até exames clínicos como eletroencefalografia e ressonância magnética de imagem (mas que são informativos apenas nos estágios avançados da doença).

Uma técnica molecular vem se destacando como uma estratégia rápida e eficiente para

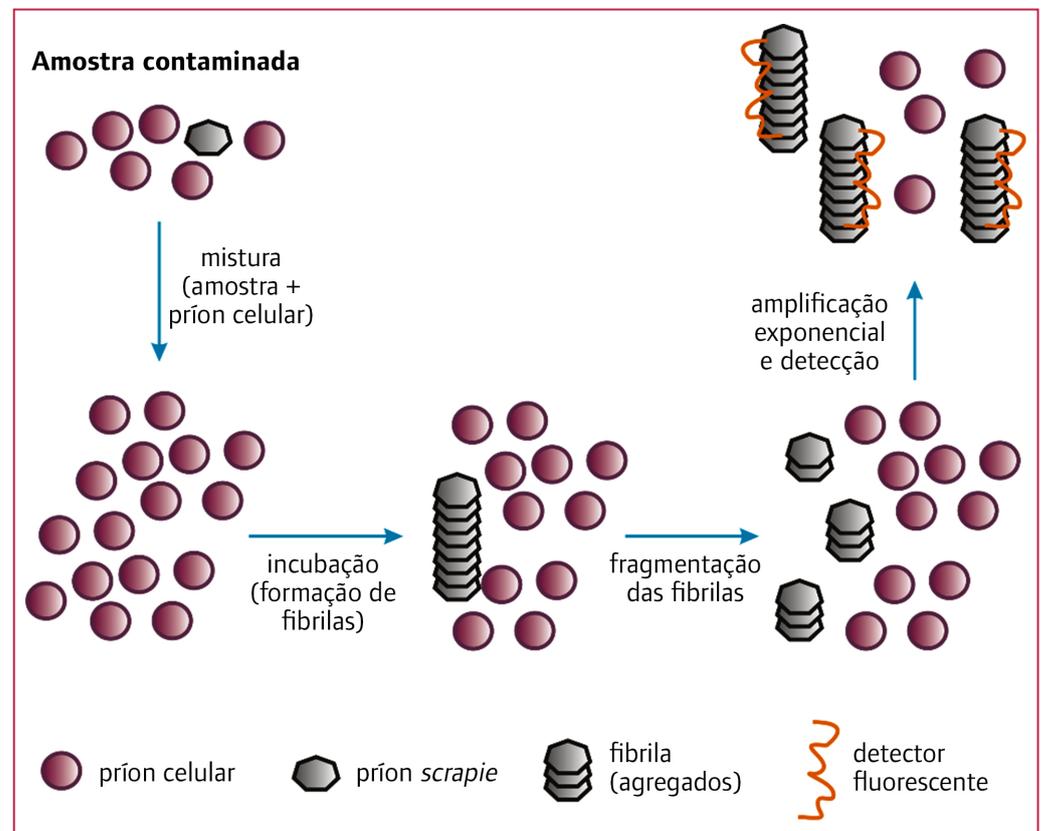
deteção de PrP^{Sc} ainda nos estágios precoces da doença, em todas as suas formas (hereditária, transmissível ou espontânea). Trata-se da RT-QuIC (*real time quaking-induced conversion* ou conversão induzida por tremor em tempo real, em tradução livre) [KANG *et al.*, 2017], que visa a mimetizar a amplificação de PrP^{Sc} observada em indivíduos doentes. Essa técnica baseia-se em coletar uma amostra do paciente (e.g., fluido cerebrospinal ou amostras do assoalho olfatório) e misturá-las a PrP^C em um tubo de ensaio, passando por ciclos de incubação e agitação. Durante a incubação, as eventuais PrP^{Sc} do paciente convertem a PrP^C em PrP^{Sc}, formando agregados fibrilares. Durante a agitação as fibrilas são fragmentadas, aumentando assim em número. Por serem compostas de PrP^{Sc}, estas fibrilas também convertem PrP^C em PrP^{Sc}, tornando a amplificação de PrP^{Sc} um processo exponencial. Ao se adicionar um **detector fluorescente de fibrilas amiloides**, é possível o acompanhamento da amplificação em tempo real (Figura 3).

Detector fluorescente de fibrilas amiloides - o

detector é uma molécula capaz de se ligar de maneira específica às estruturas tipicamente encontradas nas encefalopatias espongiformes transmissíveis (fibrilas amiloides) e emitir um sinal visível (fluorescente).

Figura 3.

O método RT-QuIC. A detecção de PrP^{Sc} pode ser feita por meio de uma técnica que simula a conversão de PrP^C em PrP^{Sc} *in vitro*. Amostras biológicas suspeitas de conterem PrP^{Sc} são misturadas a PrP^C em um tubo de ensaio. Os eventuais PrP^{Sc} irão converter PrP^C em PrP^{Sc}, formando agregados fibrilares (fibrilas). A fragmentação aumenta o número de fibrilas disponíveis no meio, tornando exponencial o processo de conversão PrP^C → PrP^{Sc}. Moléculas fluorescentes capazes de se ligar exclusivamente aos agregados fibrilares permitem a detecção.



CONCLUSÕES

A proteína príon reúne em si um conjunto de propriedades extraordinárias. Príon pode se enovelar como uma proteína celular funcional ou como um patógeno. O produto codificado pelo alelo mutado (PrP^{Sc}) apresenta uma forma de interação alélica sobre a proteína do alelo selvagem (PrP^C) denominada *dominância negativa*. Isso é, PrP^{Sc} é não funcional e consegue inibir a ação de PrP^C (por convertê-la em PrP^{Sc} e formar agregados). Em conjunto, tais características tornam príon capaz de causar doenças herdáveis, transmissíveis ou esporádicas. No entanto, o mais impressionante talvez se refira ao fato de que esse conceito de “proteína patogênica” não se limite apenas à proteína príon em si, mas a uma diversa gama de outras proteínas

humanas com essas mesmas propriedades: transição de sua forma funcional para formas estruturalmente alternativas, com capacidade de agregação e de alteração do fenótipo. Essas novas “proteínas patogênicas” seriam responsáveis pelas doenças atualmente denominadas *prionicas* (também conhecidas como “Desordens de Enovelamento Incorreto”): Huntington, Alzheimer, Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica [SUPATTAPONE, 2015].

Por fim, curiosamente, em leveduras, as proteínas com características priônicas promovem alterações não deletérias (*i.e.*, não causam doenças), mas sim modificações fenotípicas viáveis. Esse fenótipo pode ser transmitido pelas gerações seguintes na ausência de mutações, tornando assim os príons mediadores



Efeitos epigenéticos

- alterações herdáveis e reversíveis no fenótipo que não são mediados por mutações no DNA. Tais efeitos são devidos a mecanismos, como: modificações nas histonas, metilação do DNA e alterações no enovelamento de proteínas (e.g., proteína prion).

de **efeitos epigenéticos**. Por exemplo, na levedura *Saccharomyces cerevisiae* a proteína Sup35p atua como um fator de terminação de tradução, levando o ribossomo a finalizar a tradução quando um códon de parada é encontrado nos RNAs mensageiros. Contudo, Sup35p tem propriedades de prion, podendo apresentar uma estrutura terciária alternativa denominada PSI⁺. Esta, por sua vez, não é funcional, fazendo com que o ribossomo possa ler RNAs mensageiros além do códon de parada, gerando assim proteínas modificadas e alterando o fenótipo da célula. Uma vez que PSI⁺ é naturalmente transmitida para as próximas gerações e é capaz de converter Sup35p em PSI⁺, ela atua como um mediador epigenético. Todos esses novos fatos provavelmente renderão um terceiro

prêmio Nobel referente aos príons e suas impressionantes facetas.

REFERÊNCIAS

- SARNATARO, D., PEPE, A., ZURZOLO, C. Cell Biology of Prion Protein Ed LEGNAME, G., VANNI, S. *Prog Mol Biol Transl Sciv.*, p. 57-82, 2017.
- BRADLEY, R. An overview of the BSE epidemic in the UK. *Dev Biol Stand*; v., 93, p.65-72, 1998.
- KANG, H-E., MO, Y., RAHIM, R. A., LEE, H-M., RYOU, C. Prion Diagonis: Application of Real-Time Quaking-Induced Conversion. *BioMed Res Int* 2017; 5413936 doi: 10.1155/2017/5413936.
- SUPATTAPONE, S. Expanding the prion disease repertoire. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 112, n.38, p.11748-9, 2015.

