

# Priones: ¡una "locura" de proteína!

Luis Scolaro

Laboratorio de Virología - Departamento de Química Biológica FCEyN - UBA

Recibido:

**Recibido en:** 25/10/2002

| Aceptado:

**Aceptado en:** 20/11/2002

Contacto: Luis Scolaro - lscolaro@qb.fcen.uba.ar

Los priones (prion: proteinaceous infectious particle) (17) son los agentes causales de las enfermedades de mamíferos conocidas como encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE: transmissible spongiform encephalopathies) (Cuadro 1). Estas enfermedades se caracterizan por presentar alteraciones neurológicas y afectar a distintas zonas del sistema nervioso central produciendo vacuolización neuronal y una gliosis muy marcada lo que confiere al tejido neural un aspecto espongiforme (13). Todas ellas son de desarrollo lento y de desenlace fatal. Las TSE presentan la particularidad de ser infecciosas (transmisibles) y a su vez estar asociadas también a factores genéticos (formas familiares - hereditarias) y aleatorios (formas esporádicas). Luego de tiempos de incubación prolongados, las TSE producen trastornos neurológicos que pueden incluir alteraciones cerebelosas (ataxia, temblores, pérdida del equilibrio, discapacidad motora, etc), demencia, trastornos psiquiátricos, cambios comportamentales, insomnio, pérdida de la capacidad autonómica, etc. En estas enfermedades no se detectan procesos inflamatorios ni respuesta del sistema inmune (15).

**Cuadro 1.** Encefalopatías espongiformes transmisibles.

Enfermedad	Hospedador	Mecanismo de patogénesis	
		Aparición	Transmisión
Kuru	hombre (tribu de Nueva Guinea)	¿caso esporádico de CJD aparecido en la tribu?	infeccioso; por canibalismo
Creutzfeld - Jakob esporádica (sCJD)	hombre	mutación somática ocurrida al azar	-

CJD iatrogénica (iCJD)	hombre	contaminación con material infeccioso a través de una vía traumática	infeccioso; por tratamiento con hormona de crecimiento, trasplante de duramadre, utilización de electrodos contaminados con CJD
CJD familiar (fCJD)	hombre	genética	hereditaria; potencialmente infeccioso
CJD variante (vCJD)	hombre	¿infección por ingestión de alimentos contaminados con BSE?	-
Gerstman Straussler Scheinker (GSS)	hombre	genética	hereditaria; potencialmente infeccioso
Insomnio fatal familiar (FFI)	hombre	genética	hereditaria; potencialmente infeccioso
Insomnio fatalesporádico (FSI)	hombre	mutación somática ocurrida al azar	-
Scrapie (prurito lumbar)	oveja y cabra	?	infeccioso; ingestión de pasturas contaminadas, de madre a hijo, etc
Encefalopatía espongiforme bovina (BSE) “mal de la vaca loca”	vaca	infección por ingestión de alimentos contaminados con scrapie	infeccioso

Encefalopatía transmisible del visón (TME)	visones de criadero	infección por ingestión de alimentos contaminados con scrapie	infeccioso; por mordeduras en peleas, de madre a hijo, etc
Encefalopatía de ungulados exóticos (EUE)	antílopes de zoológico	infección de alimentos contaminados con BSE	-
Enfermedad del agotamiento crónico (CWD)	renos en cautiverio	?	infeccioso
Encefalopatía espongiforme felina (FSE)	gatos domésticos	infección por ingestión de alimentos contaminados con BSE	infeccioso

### La proteína del prion: PrP

Si bien aún se discute si la estructura de los priones resulta asimilable a la de un agente infeccioso convencional, es decir constituidos por un genoma propio y proteínas específicas, en la actualidad se acepta la hipótesis que postula el hecho de que están formados solamente por una proteína, denominada PrPSc de 33-35 kDa (PrP por proteína del prion y Sc por scrapie, en una generalización para el resto de las enfermedades) careciendo, en consecuencia, de un ácido nucleico propio y convirtiéndose entonces en sinónimos los términos prión y proteína del prion. Se ha observado que una proteína similar a PrPSc está presente en las membranas de células de tejidos no infectados (normales) y que se encuentra codificada en el genoma celular del hospedador susceptible. Por el momento, las funciones de dicha proteína, denominada PrPc (PrP por proteína del prion y c por celular), son temas de especulación; a diferencia de PrPSc, posee la capacidad de unir Cu<sup>2+</sup> (21) y funcionaría como una superóxido dismutasa (3); se ha comprobado también su participación en la transducción de señales en neuronas (22) y asimismo, no se descarta que esta proteína cumpla varios tipos de funciones en el sistema nervioso (23). Cabe destacar que recientemente se ha encontrado una proteína similar a PrPc, denominada Doppel (Dpl), cuyas funciones parecen ser la contraparte de las correspondientes a la proteína del prion (24).

Dentro de la fisiología de PrPc, se ha postulado que un cambio a nivel conformacional induciría a esta proteína, también de 33-35 kDa, a adquirir un plegamiento alterado y transformarse, de esta manera, en PrPSc. PrPc y PrPSc son idénticas en su secuencia aminoacídica y difieren solamente a nivel de su estructura secundaria y terciaria. A diferencia de PrPc, PrPSc presenta un tiempo de síntesis y un "turn over" mucho más prolongado que su contraparte celular no infectiva, debido a su mayor resistencia a la degradación proteolítica, acumulándose de esta manera dentro de las neuronas y causando la muerte de las mismas. El tratamiento moderado de PrPSc y PrPc (ambas de 209 residuos aminoacídicos) con proteinasa K lleva a la pérdida de 67 aminoácidos del extremo NH<sub>2</sub> terminal de PrPSc generándose PrP27-30, de 27-30 kDa, y a la hidrólisis total de PrPc. Tanto PrPSc como PrP27-30 son capaces de provocar

infección. Como requerimiento para que esto ocurra es necesaria la presencia de PrPSc o PrP27-30 en la membrana celular, ya que la proteína normal “copia” la conformación patológica a partir de la proteína anómala cuando ambas se encuentran en dicho contexto (5). La endocitosis de PrPSc, luego de adsorberse al receptor de laminina (9), llevaría a la acumulación de la misma dentro de los lisosomas secundarios debido a su resistencia a la proteólisis llevando al estallido de los mismos con la consecuente muerte neuronal. La acumulación de PrPSc fuera de la célula en forma de agregados se observa en cortes histológicos como “placas amiloïdes”, acúmulos proteicos que se tiñen intensamente con el colorante rojo Congo, característicos de las TSE. La transformación de la proteína normal en la patológica podría estar mediada por secuencias específicas de ADN celular que se unirían a estas proteínas facilitando su interacción (6).

Este tipo de hipótesis explicaría la naturaleza infecciosa de los priones ya que la presencia de PrPSc en la célula nerviosa sería suficiente para inducir la aparición exponencial de dicha proteína por conversión de la PrPc existente, la cual utilizaría como molde para plegarse a PrPSc . Por otro lado, una mutación espontánea a nivel del gen de PrPc en cualquier célula somática, podría llevar a la síntesis de una proteína con tendencia a plegarse de manera incorrecta. Una vez formada la proteína anómala, su cantidad aumentaría exponencialmente ya que podría ser usada como molde por PrPc para plegarse de manera similar. Este último mecanismo explicaría los casos esporádicos de CJD. En las TSE con un componente hereditario se han comprobado mutaciones específicas en el gen de PrPc que llevarían a la síntesis de una proteína anómala. Las TSE hereditarias podrían haber surgido a partir de una mutación espontánea en el gen de PrPc en una célula de la línea germinal.

El gen humano que codifica a PrP, denominado Prnp, está situado en el brazo corto del cromosoma 20. Posee un solo exón a diferencia de los correspondientes a ratones, vacas y ovejas que tienen 3 intrones. Los promotores de los genes de hamster y de ratón poseen varias copias de secuencias repetidas ricas en G+C pero carecen de TATA box. El ARNm de PrP se expresa de manera constitutiva y diferencial en distintas regiones del cerebro de animales adultos y sus niveles más elevados se encuentran en las neuronas (17).

### **Estructura molecular de PrP**

La traducción del ARNm para PrP da como resultado un polipéptido de 254 aa, el cual sufre distintas modificaciones. En primer término se cliva la porción del extremo NH<sub>2</sub> terminal (22 aa) que actúa como señal para que la proteína que se comienza a sintetizar ingrese al retículo endoplásmico. Dentro del RE, la proteína forma un puente -S-S- entre las Cys 179 y 214. Allí también ocurre la glicosilación en los residuos Asn 181 y Asn 197. A nivel de la Ser 231 se agrega un grupo glicosilfosfatidil inositol (GPI) que actúa como anclaje a la membrana celular, eliminándose la cola COOH terminal correspondiente (17). Esta descripción corresponde tanto para PrPc como para PrPSc, ya que ambas poseen la misma secuencia aminoacídica. Sin embargo, ambas formas difieren marcadamente a nivel conformacional en cuanto al contenido de estructuras de hélice α (mayor en el caso de PrPc) y hoja plegada β (predominante en PrPSc). PrPc presenta 4 regiones con estructura de hélice α denominadas H1, H2, H3 y H4 que se vuelven a plegar adquiriendo la estructura de hoja plegada β, fundamentalmente entre los residuos 90 y 140, cuando se transforma en PrPSc (14). Los estudios realizados con la proteína del prion han abierto un campo nuevo en la investigación del plegamiento de proteínas y su funcionalidad, relegando conceptos de secuencia aminoacídica y destacando la participación de los distintos estados energéticos de las mismas (25).

### **Genética molecular de PrP**

La obtención de ratones knock out o transgénicos para el gen de PrP ha demostrado que dichos animales se desarrollan y sobreviven normalmente, por lo que el rol de PrP aún sigue desconocido. Dichos ratones, denominados Prnp0/0, resultan inmunes a la infección con priones (17). Si bien la mayoría de las TSE pueden ser reproducidas en distintos hospedadores, por ejemplo la inoculación con priones de CJD a ovejas y cabras produce una enfermedad indistinguible del scrapie, en la mayoría de los casos cuando los priones inoculados provienen de una especie distinta de la que se inocula, se observa que se prolonga el tiempo de incubación de la enfermedad. Estas observaciones se confirmaron cuando ratones transgénicos para PrP de hamster (ratonesTgSHaPrP) inoculados con priones de hamster presentaron tiempos de incubación más cortos que los ratones normales, aunque más prolongados que cuando los animales eran inoculados con priones de ratón o que cuando los hamsters eran inoculados con priones de hamster. Los ratones TgSHaPrP inoculados con priones de ratón o de hamster producían priones de ratón o de hamster, respectivamente, pero no una mezcla de ambos (16). Los ratones TgSHaPrP y además knock out para el gen de PrP de ratón (TgSHaPrP Prnp0/0), no se infectaban con priones de ratón pero sí lo hacían con priones de hamster, con tiempos de incubación tan cortos como lo hacían los mismos hamsters. Estos resultados que demostraban que la barrera de especie podía sortearse mediante el empleo de animales transgénicos para PrP también llevaron a postular la existencia de una proteína, denominada X, que reconocería a PrPc y mediaría su conversión PrPSc. En los ratones normales, PrPc estaría asociada a X y este complejo reconocería fácilmente a los priones de ratón pero no a los de hamster. En los ratones TgSHaPrP, los cuales producen tanto PrPc de ratón como de hamster, la proteína X estaría asociada mayoritariamente a la proteína de ratón y por este motivo, si bien son capaces de enfermarse con priones de hamster, los tiempos de incubación son algo mayores a los de hamsters inoculados con priones de hamster. Por otro lado, en los ratones TgSHaPrP Prnp0/0, los cuales carecen de PrPc de ratón, toda la proteína X estaría asociada a la PrPc de hamster y por consiguiente al ser inoculados con priones de hamster desarrollan la enfermedad tan rápidamente como los propios hamsters.

### **Características biológicas y físico-químicas de los priones:**

Muchas de las características biológicas de los priones son similares a aquellas correspondientes a los virus. Sin embargo, se distinguen de los mismos debido a la marcada resistencia que presentan frente a los agentes inactivantes como el calor y las radiaciones.

### **Propiedades físico - químicas:**

- Filtrables (tamaño de poro: 0.22 μm)
- No presentan estructuras de partículas definidas al microscopio electrónico
- Resistentes a: autoclavado, formol, radiaciones, etanol, agua oxigenada, nucleasas, parcialmente resistentes a proteasas.

### **Propiedades biológicas:**

- Prolongado período de incubación
- No inducen respuesta inmune en el hospedador infectado
- Existencia de cepas
- Composición proteica exclusivamente: proteína del prión (PrP)

- Presentan barrera de especie

La inusual resistencia de los priones frente a la mayoría de los agentes inactivantes plantea un grave problema a la hora de decidir qué procedimientos pueden asegurar la destrucción de la infectividad. Los procedimientos que logran reducir el título de la infectividad a valores razonables incluyen:

- - hipoclorito de sodio 10% (1 hora)
- - hidróxido de sodio 2 M
- - permanganato de potasio 0,002 M
- - fenol 90%
- - autoclavado a 134°C, 30 min
- - cloroformo
- - éter
- - acetona
- - urea 6 M

A pesar de que los procedimientos anteriores aseguran la disminución de la infectividad de materiales contaminados por priones, existen evidencias que materiales sometidos a una temperatura de 600°C, a la cual la materia orgánica ya se ha descompuesto, aún conservan restos de infectividad. Este hecho asombroso podría explicarse considerando que debido a la carbonización que sufre la materia orgánica a esa temperatura, se podrían formar "moldes" de carbón sobre las moléculas de PrPSc y esos moldes inorgánicos serían los que inducirían a PrPc a plegarse de manera incorrecta.

Además de los hospedadores naturales, los priones pueden multiplicar en cultivos celulares exhibiendo características similares a la multiplicación *in vivo* en lo que respecta a susceptibilidad y barrera de especie (2).

## Mecanismos de transmisión de las TSE

Las TSE pueden adquirirse de manera espontánea, hereditaria o infecciosa. La consecuencia directa de estos tres mecanismos es la aparición de PrPSc dentro del hospedador, lo que conduce a una probabilidad (factible en mayor o menor grado) de la conversión de PrPc a la forma aberrante y resistente, utilizando como modelo de plegado dicha forma aberrante y resistente.

La aparición espontánea de PrPSc involucraría una mutación somática producida a nivel del gen de PrPc, cuyo producto sería una proteína con una predisposición al plegamiento erróneo. Una vez producida PrPSc, la conversión de PrPc a PrPSc es exponencial. Para esta conversión existen dos modelos propuestos, en uno de ellos la etapa limitante es la conversión de PrPc a PrPSc (modelo de plegado asistido por templado) donde PrPc formaría una especie intermediaria que luego se transformaría en PrPSc, la cual se agregaría rápidamente. En el otro modelo (modelo de formación de agregados) la conversión de PrPc a PrPSc es rápida pero la formación del núcleo del agregado es lenta, una vez formado el agregado la transformación de PrPc por contacto con el agregado es rápida (18). En la interpretación de cada modelo debe considerarse que recientemente se ha demostrado que para que ocurra transformación de PrPc a PrPSc es condición necesaria que ambas proteínas se encuentren formando parte de la misma

membrana (4).

En los casos hereditarios, el gen de PrPc posee cambios específicos y propios de cada tipo de TSE familiar, el que produciría una proteína con una marcada tendencia al plegamiento defectuoso. Estos cambios se encuentran en todas las células del individuo a diferencia de lo que ocurre con la forma esporádica, en donde el cambio aparece sólo en una célula del hospedador (17).

En la forma infecciosa, PrPSc ingresa al organismo por ingestión o de manera iatrogénica (cirugías o tratamientos invasivos). La ingestión ocurre en el caso del scrapie (las ovejas se infectan por consumir pasturas contaminadas con scrapie), del BSE y TME (las vacas y visones de criadero se infectan por consumir alimentos elaborados con restos de ovejas infectadas con scrapie), del vCJD, FSE y EUE (la infección aparece por consumo de derivados bovinos contaminados con BSE). El modo iatrogénico de infección se da en el caso del iCJD (colocación de electrodos infectados, tratamiento con hormona de crecimiento extraída de materiales infectados, accidentes de cirugía, transplantes de duramadre, transplante de córneas, etc) y del TME (mordeduras entre animales). Recientemente se ha demostrado que es posible prevenir la llegada de los priones al cerebro y bazo de ratones transgénicos que expresan anticuerpos anti PrP inoculados por vía intraperitoneal, estrategia que podría emplearse para evitar la dispersión del agente infeccioso y su llegada al órgano blanco (cerebro) (10).

### **El “mal de la vaca loca” y su importancia epidemiológica**

Durante los últimos años se han detectado en Reino Unido una forma nueva de CJD que se denominó CJD variante (vCJD) que, a diferencia de la sCJD, ocurre en personas jóvenes. Si bien en un principio se subestimó la posibilidad de un contagio del mal de la vaca loca a humanos, debido a que nunca se había detectado transmisión de este tipo de enfermedades por consumo de ovejas con scrapie, se comprobó que esta variante apareció como consecuencia de la ingesta de derivados bovinos contaminados con BSE, ya que la caracterización bioquímica de PrPSc, aislada de cerebros de pacientes con vCJD, demostró su similitud con la PrPSc del BSE y no con la del sCJD ni la del scrapie (12). Debido a la facilidad con que los priones bovinos infectaron al hombre, el mayor problema que se enfrenta en estos momentos en dicha región es la posibilidad de que parte del ganado ovino también se encuentre infectado con BSE (1), desarrollando una enfermedad con sintomatología indistinguible del scrapie (8) pero con un potencial de contagio al humano mucho mayor (7). Más aún si se considera que la legislación vigente prohíbe el empleo para el consumo humano de vacas con BSE pero no así de ovejas con scrapie. Es probable que un alto porcentaje de la población del Reino Unido haya consumido carne con BSE y si bien hasta el momento el número de personas que desarrollaron vCJD no supera las 130, no puede descartarse que no se hayan infectado. Estas personas infectadas, pero no enfermas, podrían albergar el agente infeccioso tal como se ha comprobado en el caso de ratones infectados experimentalmente con dosis altas de priones de scrapie provenientes de hamster. Dichos animales no desarrollan la enfermedad aunque resulta posible aislar infectividad de sus cerebros durante toda su vida (19).

Si bien la mayor cantidad de infectividad se encuentra el tejido nervioso y linfático, ha sido posible transmitir la enfermedad a ratones inoculados por vía intracerebral con tejido muscular de vacas infectadas con BSE. Recientemente se ha comprobado que la transfusión de sangre de ovejas infectadas experimentalmente con BSE a ovejas sanas es capaz de transmitir la enfermedad (11). Como medida preventiva en USA está prohibido la donación de sangre de ciudadanos ingleses o personas que hayan permanecido por un lapso de tiempo prolongado en Reino Unido. Esto es así ya que hasta el momento no se dispone de un test que permita detectar a PrPSc en sangre. Por el contrario, cuando se trata de tejido nervioso se dispone de un

kit diagnóstico que se basa en la detección de PrPSc por tratamiento con proteasas del material sospechoso y posterior detección de la proteína infectiva por la técnica de western-blot (20). En la Argentina no se han detectado casos de BSE y el país ha sido declarado libre de la enfermedad.

## Bibliografía

1. Balter M. On the hunt for a wolf in sheep's clothing. *Science* 287:1906-1908, 2000.
2. Bosque PJ, Prusiner SB. Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection. *J Virol* 74:4377-4386, 2000.
3. Brown DR. Copper and prion disease. *Brain Res Bull* 55:165-173, 2001.
4. Caughey B, Baron GS. Factors affecting interactions between prion protein isoforms. *Biochem Soc Trans* 30:565-569, 2002.
5. Caughey B, Raymond GJ, Priola SA, Kocisko DA, Race RE, Bessen RA, Lansbury PT Jr, Chesebro B. Methods for studying prion protein (PrP) metabolism and the formation of protease-resistantPrP in cell culture and cell free systems. An update. *Mol Biotechnol* 13:45-55, 1999.
6. Cordeiro Y, Machado F, Juliano Neto L, Juliano MA, Brentani RR, Foguel D, Silva JL. DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. *J Biol Chem* 276:49400-49409, 2001.
7. Dormont D. Prion diseases: pathogenesis and public health concerns. *FEBS Lett* 529:17, 2002.
8. Foster JD, Parnham DW, Hunter N, Bruce M. Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *J Gen Virol* 82:2319-2326, 2001.
9. Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, Leucht C, Hundt C, Rieger R, Kraseman S, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, Weiss S. The 37 kDa/67 kDa laminin receptor acts as the cell surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J* 20:5863-5875, 2001.
10. Heppner FL, Musahl C, Arrighi I, Klein MA, Rulicke T, Oesch B, Zinkernagel RM, Kalinke U, Aguzzi A. Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science* 294:178-182, 2001.
11. Hunter N, Foster J, Chong A, McCutcheon S, Parnham D, Eaton S, McKenzie C, Houston F. *J Gen Virol* 83:2897-2905, 2002.
12. Ironside JW, Head MW, Bell JE, McCardle L, Will RG. Laboratory diagnosis of variant Creutzfeld-Jakob disease. *Histopathology* 37:1-9, 2000.
13. Kordek R. The diagnosis of human prion diseases. *Folia Neuropathol* 38:151-160, 2000.
14. Liu H, Farr Jones S, Ulyanov N, Llinas M, Marquesee S, Groth D, Cohen F, Prusiner S, James T. Solution structure of syrian hamster prion protein rPrP(90-231). *Biochemistry* 38:5362-5377, 1999.
15. Mabbott NA, Bruce ME. The immunobiology of TSE diseases. *J Gen Virol* 82:2307-2318, 2001.
16. Prusiner SB. Molecular Biology of prion diseases. *Science* 252:1515-1522, 1991.
17. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci* 95:13363-13383, 1998.
18. Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, Cohen FE. Prion Protein Biology. *Cell* 93:337-348, 1998.
19. Race R, Raines A, Raymond GJ, Caughey B, Chesebro B. Long-term subclinical carrier state precedes scrapie replication and adaptation in a resistant species: analogies to bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *J Virol* 75:10106-10112, 2001.
20. Schaller O, Fatzer R, Stack M, Clark J, Cooley W, Biffinger K, Egli S, Doherr M, Van develde M, Heim D, Oesch B, Moser M. Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrPSc detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol (Berl)* 98:437-443, 1999.
21. Shaked Y, Rosenmann H, Hijazi N, Halimi M, Gabizon R. Copper binding to the PrP isoforms: a putative marker of their conformation and function. *J Virol* 75:7872-7874, 2001.
22. Spielhaupter C, Schatzl HM. PrP<sup>c</sup> directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J Biol Chem* 276:44604-44612, 2001.
23. Wechselberger C, Wurm S, Pfarr W, Hoglinger O. The physiological functions of prion protein. *xp Cell Res* 281:1-8, 2002.
24. Westaway D, Carlson GA. Mammalian prion proteins: enigma, variation and vaccination. *Trens Biochem Sci* 27:301-307, 2002.
25. Yon JM. Protein folding in the post-genomic era. *J Cell Mol Med* 6:307-327, 2002.

