

Manifestações Endócrinas das Mutações da Proteína $G_s\alpha$ e do Imprinting do Gene *GNAS1*

Maria Candida
B. Villares Fragoso

Laboratório de Hormônios e Genética Molecular – LIM/42, Disciplina de Endocrinologia, Departamento de Clínica Médica, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP

RESUMO

Esta revisão resume o papel da patogênese molecular das mutações do gene da proteína $G_s\alpha$ em doenças endócrinas. As proteínas G transmitem o sinal celular de receptores de membrana 7TM. Este sistema pode ser ativado por fotons de luz, odorantes e hormônios (LH, FSH, TSH, PTH, etc). Seu efetor é a adenilato-ciclase que induz a formação de AMPc. A proteína G inativa é heterotrimérica e associada ao GDT. Receptores que ativam a proteína $G_s\alpha$ dissociam o GDT para GTP, enquanto a atividade intrínseca GTPase hidrolisa o GTP, mantendo a proteína $G_s\alpha$ no estado inativo, ligado ao GDP. Mutações no gene *GNAS1*, que codifica a proteína $G_s\alpha$, alteram sítios altamente conservados (Arg²⁰¹ e Gln²²⁷), críticos para a atividade GTPase, levando à ativação constitutiva do sinal celular. Tais mutações são encontradas em raros tumores endócrinos, na fibrodissplasia óssea e na síndrome de McCune Albright. Ao contrário, mutações inativadoras podem levar à osteodistrofia hereditária de Albright, se transmitidas pelo alelo paterno e pseudohipoparatiroidismo tipo Ia, se transmitidas pelo alelo materno. Em ratas com *knockout*, o gene *Gnas* sofre o fenômeno de *imprinting* tecido específico. Em tumores de hipófise, o gene *GNAS1* também sofre *imprinting* com expressão preferencial do alelo materno. No pseudohipoparatiroidismo tipo Ib, um defeito do *imprinting* na região promotora do exon 1A do gene *GNAS1* parece justificar a resistência renal isolada ao PTH. Estes exemplos ilustram como defeitos da proteína $G_s\alpha$ podem ser responsáveis pela patogênese molecular de diferentes doenças endócrinas. (Arq Bras Endocrinol Metab 2002;46/4:372-380)

Descritores: Proteína $G_s\alpha$; Gene *GNAS1*; Mutações; Imprinting

ABSTRACT

***Gsa* Protein Mutations and Imprinting of the *GNAS1* Gene.**

This review summarizes the role of the molecular pathogenesis of $G_s\alpha$ protein gene in endocrine disease. G proteins transmit the cellular signal of 7 transmembrane receptors (7TM). Agonists as light photons, odorants and hormones (LH, FSH, TSH, PTH, etc) can activate the system. The effector of $G_s\alpha$ protein is adenylyl-cyclase, which induces the formation of cAMP. The receptors that activate $G_s\alpha$ protein dissociates GDT into GTP, while the intrinsic GTPase activity hydrolyses GTP, keeping $G_s\alpha$ protein in its inactive state, bound to GDP. Mutations in the *GNAS1* gene, which codifies the $G_s\alpha$ protein, alter highly conserved sites (Arg²⁰¹ and Gln²²⁷) that are critical for GTPase activity, leading to the constitutive activation of cell signaling. Such mutations are found in rare endocrine tumors, bone fibrodysplasia and McCune Albright syndrome. Conversely, inactivating mutations can lead to Albright hereditary osteodystrophy or pseudohypoparathyroidism type Ia, when transmitted by the paternal or maternal alleles, respectively. In *knockout* female mice the *Gnas* gene exhibits the phenomenon of tissue-specific *imprinting*. In pituitary tumors the *GNAS1* gene also undergoes *imprinting*, when expressed preferably by the maternal allele. In pseudohypoparathyroidism type Ib, a defect of *imprinting* in the promoter region of exon 1A of *GNAS1* gene appears to

Recebido em 02/07/2002
Revisado em 25/07/2002
Aceito em 30/07/2002

justify the isolated renal resistance to PTH. These examples illustrate how defects in $G_s\alpha$ protein can be responsible for the molecular pathogenesis of different endocrine disorders. (Arq Bras Endocrinol Metab 2002;46/4:372-380)

Keywords: $G_s\alpha$ protein; *GNAS1* gene; Mutations; Imprinting

EM 1969, FOI SUGERIDO por Martin Rodbell e cols (1,2) que uma série de hormônios atuavam através de receptores específicos denominados de “discriminadores”, os quais estimulavam a adenilato-ciclase e amplificavam o sinal celular, num sistema denominado de “transdutor”. O “transdutor” comum a todos estes hormônios foi posteriormente caracterizado como sendo a família das proteínas ligadas ao nucleotídeo guanina, genericamente conhecidas como proteínas G (1,2).

Os receptores que transmitem o sinal celular via proteínas G possuem algumas características comuns em relação à sua estrutura. Apresentam uma região amino-terminal extracelular, uma região transmembrana com 7 domínios hidrofóbicos (α -hélices) ligados por 3 alças extracitoplasmáticas e 3 alças intracitoplasmáticas. Por apresentarem sete domínios transmembrana são também conhecidos como receptores 7TM. Estes receptores formam a maior família de proteínas do organismo com mais de 1000 diferentes membros identificados, participando juntamente com as proteínas G de um sofisticado sistema de transdução do sinal celular (3-6). Existem inúmeros ligantes extracelulares que podem causar uma mudança na conformação do receptor, expondo as α -hélices e ativando as proteínas G, tais como: fóton de luz, odorantes, hormônios, neurotransmissores, nucleotídeos, proteases e íons. Os efetores celulares, regulados via proteínas G são: adenilato-ciclase, as isoformas de fosfatidilinositol, fosfolipase C β , fosfodiesterases dependentes de GMPc e canais iônicos (Na⁺ K⁺, Ca²⁺) (7).

Apresentaremos nesta revisão alguns aspectos da estrutura e função das proteínas G, bem como doenças endócrinas causadas por mutações ativadoras e inativadoras no gene *GNAS1*, que codifica a proteína *Gsa*, e o mecanismo de *imprinting* deste gene.

Classificação das proteínas G

As proteínas G, fazem parte de uma superfamília com mais de 50 membros descritos, e representam a chave intermediária do sinal celular dos receptores de membrana 7TM (8,9). Elas podem ser divididas em dois grupos com base no seu peso molecular: um grupo de

baixo peso molecular, entre 20 e 50Kd, presente em todas as células eucariontes, melhor representada pela família do protooncogene *ras* e um grupo de alto peso molecular entre 80 e 90Kd relacionado à transdução do sinal celular (9). Todas as proteínas G de alto peso molecular são heterotriméricas constituindo-se de três polipeptídeos distintos: as subunidades α , β e γ , em ordem decrescente de peso molecular. As subunidades α ligam-se ao nucleotídeo guanina com alta afinidade e especificidade, interagem com os receptores, com os efetores, com o complexo $\beta\gamma$ e possuem atividade intrínseca GTPase (10-12).

As subunidades α são altamente conservadas entre os mamíferos (> 95%), sendo as proteínas G classificadas de acordo com a seqüência estrutural e/ou homologia funcional das subunidades α em quatro subfamílias: $G_s\alpha$, $G_q\alpha$, $G_i\alpha$, $G_{12}\alpha$ e cada subfamília é composta de vários membros. Na classe dos mamíferos, cerca de 16 genes codificam a subunidade α e mais de 20 diferentes subunidades α já foram identificadas. A subunidade α contém cinco regiões distintas altamente conservadas (G1-G5). G1, G4 e G5 são importantes para a ligação ao GTP enquanto G2 e G3 determinam a atividade GTPase. As subunidades β e γ são menos conservadas entre as espécies e estão fortemente associadas por ligação não covalente, formando um dímero funcional $\beta\gamma$ extremamente estável; entretanto cada subunidade do dímero também pode funcionar como um homodímero. Cerca de 6 genes codificam as subunidades β e 12 codificam as subunidades γ . O complexo $\beta\gamma$ quando associado à subunidade α , mantém a proteína G em seu estado heterotrimérico inativo (11-13).

Transdução do sinal celular dos hormônios que utilizam os receptores acoplados às proteínas G

A característica principal dos hormônios é sua habilidade em interagir com receptores altamente seletivos localizados na superfície ou no interior das células, cuja função é modificar o funcionamento ou o comportamento das células-alvo. Os receptores possuem alta afinidade e especificidade pelo seu ligante (hormônio), o que previne reações biológicas não específicas do hormônio. Os hormônios ativam uma série de eventos moleculares no interior das células induzindo alteração da transcrição gênica resultando numa resposta fisiológica. Transdução é o nome dado ao processo de ativação desses eventos intracelulares pelos estímulos externos. A primeira etapa do sinal celular é o acoplamento do ligante ao seu receptor. Os ligantes que podem ativar os receptores 7TM são diversos, varian-

do desde pequenas moléculas (aminas biogênicas, odorantes), pequenos peptídeos (vasopressina), grandes peptídeos (paratormônio) e até grandes proteínas como os hormônios glicoprotéicos (14).

O mecanismo da transdução do sinal celular consiste de fosforilações e defosforilações seqüenciais dos resíduos das proteínas intracelulares. Estes eventos de fosforilação e defosforilação ocorrem após a ligação dos hormônios aos seus receptores de membrana 7TM, que vão ativar as proteínas G e gerar um segundo mensageiro, tais como AMPc, diacilglicerol, ou íons cálcio (15-16).

O segundo mensageiro, AMPc, ativa a quinase protéica dependente de AMPc resultando na fosforilação do substrato serina. A fosforilação consiste na transferência de um grupo fosfato, a partir da adenosina trifosfato, para resíduos específicos de aminoácidos, usualmente serina, mas algumas vezes também treonina ou tirosina. A fosforilação é determinada pela atividade das enzimas quinases protéicas, e a defosforilação pelas fosfoproteínas fosfatases.

A quinase protéica dependente de AMPc consiste de quatro subunidades, duas subunidades catalíticas e um dímero regulatório, o qual se liga à molécula de AMPc. Desta forma ocorre a dissociação da proteína quinase, subunidade regulatória da subunidade ativa catalítica. A subunidade ativa da proteína quinase catalisa a fosforilação de certas proteínas intracelulares (fatores de transcrição) que atuam na ativação e inativação gênica. O exato mecanismo pelo qual as proteínas fosforiladas ativam a transcrição gênica ainda não está bem estabelecido (17-18).

Ciclo GTPase

Todas as subunidades α possuem uma característica funcional comum que é a atividade GTPase, que determina o término do sinal celular.

As proteínas G em seu estado inativo encontram-se na sua forma heterotrimérica ($\alpha\beta\gamma$) ligadas ao GDP. Quando o receptor é ativado por um ligante químico ou físico, ocorre uma alteração na sua conformação estrutural, expondo as α -hélices e sítios fundamentais para a ligação às proteínas G, o que acarreta uma mudança da conformação da subunidade α , diminuindo a sua afinidade pelo GDP.

A concentração molar intracelular do GTP é 10 vezes mais elevada do que o GDP, ocorrendo sua substituição após a dissociação do GDP da subunidade α . Uma vez que o GTP está acoplado à subunidade α , esta assume sua conformação ativa, dissociando-se do receptor e do complexo $\beta\gamma$ e ligando-se posteriormente ao seu respectivo efetor, que irá desencadear a

cascata de eventos intracelulares para ativar ou inativar os mensageiros secundários, tais como o AMPc, o diacilglicerol e canais de cálcio. A atividade GTPase controla o término do sinal celular, através da clivagem do γ -fosfato terminal do GTP para GDP. Desta forma a subunidade α se dissocia do efetor, liga-se novamente ao complexo $\beta\gamma$ e ao receptor. Assim a proteína G assume sua forma heterotrimérica inativa, podendo receber um novo estímulo e reiniciar outro ciclo (figura 1). A atividade GTPase é um dos mecanismos que controla a duração da resposta celular. A razão de hidrólise do GTP é acelerada pela interação com certos efetores (adenilato-ciclase isoforma 5) ou com membros de uma nova família de proteínas, RGS, conhecidas como reguladoras da atividade GTPase das proteínas G_i , G_q e G_{12} (*Regulator of G protein Signaling*) (19-21).

Efeito da toxina da bactéria *Vibrio cholerae* na proteína $G_s\alpha$

As primeiras evidências de que uma ativação inapropriada da proteína $G_s\alpha$ pudesse ter conseqüências patológicas foram observadas em estudos com o *Vibrio cholerae*. A toxina colérica, secretada pelo *Vibrio cholerae*, interage com as proteínas $G_s\alpha$, e alteram os níveis celulares de AMPc. A toxina colérica ativa de forma irreversível a adenilato-ciclase nas células epiteliais do intestino, elevando os níveis de AMPc. Parte da toxina que é uma enzima penetra no citosol onde catalisa a adição covalente do grupo adenosina difosfato-ribosil

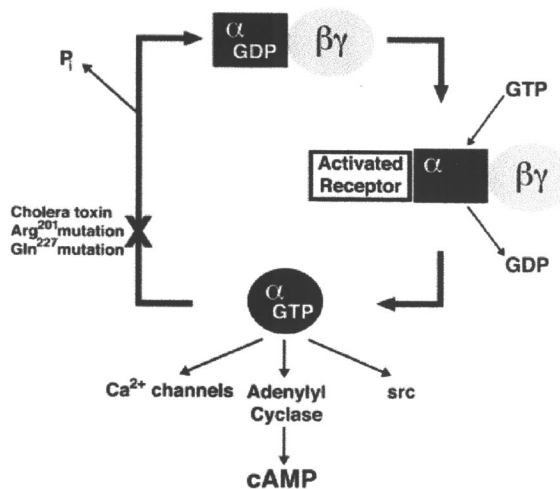


Figura 1: Representação esquemática da transmissão do sinal celular do receptor 7TM via proteína $G_s\alpha$. A ribosilação da exotoxina colérica no codon da Arg²⁰¹ e as mutações somáticas no codon da Arg²⁰¹ ou Gln²²⁷ inibem a atividade GTPase e ativam constitutivamente a adenilato ciclase, com incremento dos níveis de AMPc, favorecendo a transcrição gênica dependente de AMPc. (Lania Andrea European Journal of Endocrinology 145:543-59,2001)

(ribosilação), proveniente do grupo nicotinamida adenina dinucleotídeo no aminoácido arginina (Arg²⁰¹) da proteína *G_sα*, que é crítico para a atividade GTPase. Esta proteína alterada pode ativar a adenilato-ciclase normalmente, porém não pode hidrolisar GTP para GDP, ou seja perde a atividade GTPase. A proteína *G_sα* permanece constitutivamente ativada, aumentando em 100 vezes ou mais os níveis de AMPc nas células epiteliais do intestino. Desta forma ocorre a passagem maciça de água do sangue para a luz intestinal, causando diarreia e desidratação (22).

Anormalidade da transdução do sinal celular da proteína *G_sα*

Tem sido proposto que os componentes da sinalização celular são possíveis alvos de mutações que podem levar ao desenvolvimento de doenças. A anormalidade da transdução do sinal celular pode ser devida a alterações do receptor 7TM, da proteína G, ou de seus efetores.

Na última década, os avanços na biologia molecular possibilitaram a identificação de mutações no gene *GNAS1* (*Guanine Nucleotide binding Alpha-subunit 1*), que codifica a proteína *G_sα*. As mutações ativadoras e inativadoras descritas estão associadas a alterações da transdução do sinal celular. Mutações da proteína *G_sα* podem causar perda ou ganho de função por inativação ou ativação do sinal celular com apresentação clínica de excesso ou falta hormonal respectivamente. A expressão fenotípica destas mutações depende se elas ocorrem nas células germinativas, afetando todas as células em que o gene é expresso, ou se elas ocorrem nas células somáticas, com manifestações focais da doença (tabela 1).

Mutações ativadoras descritas nos exons 8 e 9 do gene *GNAS1* são somáticas, pontuais em heterozigose e alteram codons altamente conservados

(R²⁰¹ e Q²²⁷), envolvidos na atividade GTPase. Estudos através de cristalografia e experimentos com mutagênese *in vitro* indicam que a arginina 201 e a glutamina 227 funcionam como um anel para estabilizar o γ -fosfato do GTP. Estas mutações denominadas *gsp* (*G stimulatory protein*) levam a mudanças estruturais da proteína *G_sα* diminuindo a hidrólise do γ -fosfato do GTP, mantendo constitutivamente o sinal celular (23,24). As mutações inativadoras têm sido detectadas em todos os exons do gene *GNAS1*, exceto no exon 3, sendo 20% das mutações presentes no exon 7. As mutações inativadoras são germinativas, em heterozigose caracterizadas por pequenas deleções, inserções, mutações pontuais *missense* e *stop* codon prematuro. Ensaio bioquímico que mediram a produção hormonal após a reconstituição de membranas de pacientes com PHP Ia que apresentavam mutação inativadora da proteína *G_sα* demonstraram uma deficiência parcial da atividade da proteína *G_sα* em vários tipos celulares, tais como: eritrócitos, fibroblastos, linfócitos e células renais. Estudos subsequentes mostraram decréscimo da expressão do RNA mensageiro e da proteína *G_sα* (25).

Estrutura e localização do gene *GNAS1*

O gene *GNAS1* humano foi clonado em 1988 por Kosaza e cols., possui 20Kb e localiza-se no braço longo do cromossomo 20 na região 13.1-13.2. Inicialmente a sequência de pares de base estava distribuída em 13 exons com 4 *splicing* alternativos localizados nos exons 3 e 4 (26). Atualmente sabe-se que o gene *GNAS1* e seu homólogo em ratos (*Gnas*) apresentam alta complexidade com múltiplos *splicing* alternativos formando transcritos que codificam várias proteínas e transcritos não traduzidos. Utilizando promotores alternativos, os principais produtos transcritos pelo gene *GNAS1* são: a conhecida proteína *G_sα*, a

Tabela 1. Doenças endócrinas associadas a alterações da proteína *G_sα*.

<i>G_sα</i>		Linhagem
Perda de função		
Pseudohipoparatiroidismo tipo Ia	Mutações pontuais, deleções, inserções do <i>GNAS1</i>	Germinativa
Pseudohipoparatiroidismo tipo Ib	Alterações no locus do imprinting do <i>GNAS1</i>	Germinativa
Ganho de função		
Adenomas de hipófise e tireóide	Mutação pontual Arg ²⁰¹ ou Gln ²²⁷ inibe GTPase	Somática
Tumor de célula de Leydig	Mutação pontual Arg ²⁰¹ inibe GTPase	Somática
Síndrome de McCune Albright	Mutação pontual Arg ²⁰¹ inibe GTPase	Somática
Ganho e Perda de função		
Testotoxicose e Pseudohipoparatiroidismo tipo Ia	Mutação pontual Arg ³⁸⁵ Ser, aceleração da dissociação do GDP e ativação do sinal a 34°C (testículo) e inativação da <i>Gsα</i> a 37°C (paratireóide)	Germinativa

NESP 55 (*neuroendocrine secretory protein 55*), que é uma proteína semelhante à cromogranina com expressão em tecidos neuroendócrinos (medula adrenal, hipófise, hipotálamo, e outras regiões do cérebro); as XL α s (XLN1a e XLN1b), isoformas longas da G α , também apresentam expressão em tecidos neuroendócrinos (pituitária, adrenal, coração, pâncreas) com funções biológicas ainda não determinadas (27-29) (figura 2).

Em humanos e ratos a região promotora da proteína NESP55 está metilada somente no alelo paterno, sendo o alelo materno transcrito e contrariamente a região promotora da XL α s está metilada no alelo materno com transcritos somente do alelo paterno. Estudos do padrão de metilação em ratos e fetos humanos, da região promotora da proteína G α , mostraram que essa região parece constituir a marca do *imprinting*. A expressão da proteína é bialélica em alguns tecidos (ossos), e monoalélica em outros (túbulo proximal do nefron) com *imprinting* paterno e expressão do alelo materno (25).

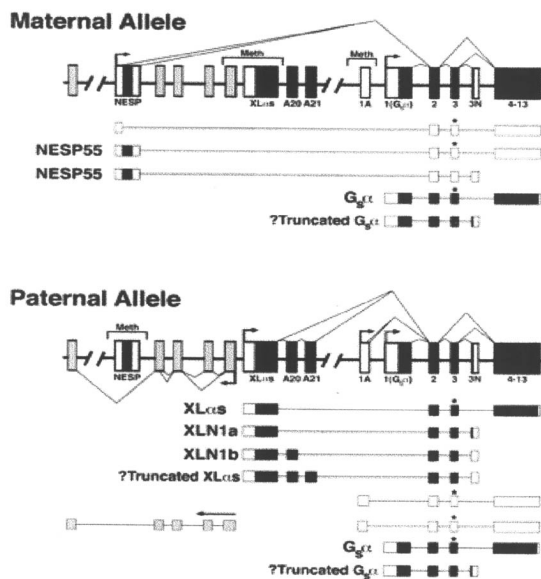


Figura 2: Organização e padrão de *imprinting* do GNAS1 no alelo materno (acima) e no alelo paterno (abaixo). Os exons com transcritos *sense* são mostrados através de caixas (regiões codificadas em preto, e regiões não codificadas em branco). Os exons de 4 a 13 estão numa caixa única. Os cinco exons com transcritos *antisense* da NESP55 são mostrados em caixas cinzas. A20 e A21 são *spliced* alternativos que incluem um pequeno número de transcritos da região promotora da XL α s. O exon 3N é um exon terminal alternativo que leva à geração de uma forma truncada da XL α s (XLN1a) e possivelmente uma forma truncada da proteína G α . (ref. 25) (Lee Weinstein Endocrine Reviews 22(5): 675-705 2001)

Doenças associadas às mutações ativadoras no gene GNAS1

Mutações do gene GNAS1 foram descritas primeiramente em 40% dos adenomas pituitários somatotróficos e 30% dos adenomas autônomos da tireóide. Estas mutações resultaram em hiperplasia celular e hipersecreção de hormônio de crescimento e hormônios da tireóide. A persistente ativação da adenilato-ciclase por deficiência da enzima GTPase mantém níveis elevados de AMPc, que estimula a secreção hormonal e o crescimento destes tecidos, o suficiente para levar aos fenótipos de acromegalia e hipertireoidismo respectivamente. Tais mutações ativadoras no codon da arginina 201 também foram detectadas em alguns tumores de células de Leydig em ovário e testículo, em neoplasias diferenciadas da tireóide e raramente em outros tumores endócrinos (30-33) (tabela 1).

A mesma mutação somática do gene GNAS1 é a base molecular da síndrome de McCune Albright, que acarreta a substituição da arginina 201 (CGT), principalmente por histidina (CAT) ou por cisteína (TGT). Esta síndrome descrita por McCune e Albright em 1930 é uma doença esporádica classicamente definida pela presença de displasia óssea fibropoliostótica, manchas "café au lait" e puberdade precoce. Variações clínicas desta tríade clássica podem ocorrer, associadas a outras endocrinopatias, tais como: hipertireoidismo, acromegalia, prolactinoma e síndrome de Cushing (34,35).

Alguns órgãos não endócrinos também podem ser afetados, incrementando o risco de mortalidade e morbidade desta patologia. Estes órgãos incluem: fígado, rim, timo, baço, trato gastrointestinal e cérebro. As anormalidades cardíacas incluem cardiomegalia, taquicardia, hipertrofia muscular associada à morte súbita. Outras raras alterações são: hiperplasia do timo, pólio gastrointestinal, pancreatite, câncer de mama e microcefalia. As manifestações clínicas da síndrome de McCune Albright são explicadas pelo padrão mosaico de distribuição das células que carregam o alelo mutado, caracterizando uma mutação pós zigótica, em heterozigose, que ocorre nas primeiras fases da embriogênese no gene GNAS1 (35).

Doenças associadas às mutações inativadoras do gene GNAS1

Inúmeras mutações inativadoras no gene GNAS1 têm sido identificadas com padrão autossômico dominante de herança, e variável manifestação clínica nos casos de osteodistrofia hereditária de Albright (AHO) e pseudohipoparatiroidismo tipo Ia (PPH Ia).

Pseudohipoparatiroidismo (PHP) é uma doença hereditária cujo defeito se localiza na transdução do sinal celular. Os pacientes com PHP apresentam sinais de hipoparatiroidismo, com níveis elevados do paratormônio (PTH) e resposta alterada ao PTH exógeno, indicando resistência ao PTH. Esta doença tem sido subdividida em vários subtipos, que apresentam diferentes etiologias (tabela 2). Pacientes com PPH Ia apresentam algumas características somáticas que incluem: baixa estatura, ossificação subcutânea, obesidade centrípeta, fâcies arredondada, nariz em sela, hipertelorismo e déficit mental variável. Estas anormalidades são denominadas de osteodistrofia hereditária de Albright. Bracodactilia envolvendo o terceiro, quarto e quinto metacarpo, com padrão simétrico ou assimétrico é relativamente específica da AHO. As manifestações esqueléticas da AHO não são secundárias à hipocalcemia, hiperfosfatemia ou aos níveis elevados de PTH, pois estes parâmetros bioquímicos estão presentes em pacientes com hipoparatiroidismo e com ausência de manifestações ósseas. O PPH Ia apresenta as mesmas características clínicas e bioquímicas da AHO associada à resistência dos seguintes hormônios: TSH, LH, e FSH. A maioria das mutações inativadoras descritas são: deleções ou inserções, que produzem *frameshifts* e *stop* codons prematuros. Algumas mutações interrompem a expressão do RNA mensageiro e conseqüentemente da proteína $G_s\alpha$, por desestabilizar a ligação da subunidade- α com o nucleotídeo guanina ou substituírem aminoácidos da região carboxiterminal levando ao não acoplamento da proteína $G_s\alpha$ ao receptor 7TM. Mutações mais raras aumentam a atividade GTPase, diminuindo a ligação do GTP à subunidade- α , e conseqüentemente diminuindo a quantidade de proteína produzida. Estas mutações têm sido descritas em pacientes com osteodistrofia hereditária de Albright (AHO) e pseudohipoparatiroidismo tipo Ia (PPH Ia) (36). Uma intrigante mutação *missense* (Ala366Ser) localizada na região G5 da proteína $G_s\alpha$ foi identificada em dois pacientes não correlacionados com PHP Ia e testotoxicose. Esta substituição leva à ativação constitutiva da adenilato ciclase devido ao incremento da

razão de dissociação do GDP, favorecendo a ligação ao GTP- $G_s\alpha$. Porém a proteína à 37°C é muito instável, levando a uma perda de expressão e um fenótipo de PPH Ia. Entretanto, em temperaturas mais baixas, como no testículo, a proteína permanece mais estável e constitutivamente ativa favorecendo a produção hormonal de testosterona e o quadro clínico de puberdade precoce independente de gonadotrofinas (37).

Imprinting do gene *GNAS1*

O *imprinting* genômico é um fenômeno epigenético que afeta um pequeno número de genes autossômicos. Neste evento bioquímico que pode ser reversível, existe uma modificação no genoma parental, que leva a uma diferença funcional nas células somáticas da prole, onde um dos alelos parentais não é expresso e o outro é transcrito (38).

As principais características dos genes que sofrem *imprinting* são:

- Cerca de 80% destes genes estão fisicamente ligados em *clusters* com outros genes que sofrem *imprinting* e são ricos em ilhas CpGs;
- Apresentam regiões que sofrem metilação denominadas de DMRs (*Differentially Methylated Regions*);
- Geralmente formam transcritos anti-*sense*, não traduzidos com função regulatória do gene.

A precisa natureza do *imprinting*, e sua determinação durante o desenvolvimento, ainda não está totalmente elucidada. Um dos mecanismos favoráveis ao *imprinting* é a adição do grupo metil na posição 5', principalmente nas regiões ricas em CpGs (metilação) (39).

A hipótese de *imprinting* do gene *GNAS1* tem sido aventada para explicar a patogênese molecular da Osteodistrofia hereditária de Albright (AHO), e pseudohipoparatiroidismo tipo Ia (PHP Ia). Estudos clínicos genéticos de pacientes com AHO revelaram a presença de mutações inativadoras em heterozigose no gene *GNAS1*, determinando fenótipos diferentes conforme a herança do alelo mutado fosse transmitido via materna ou paterna.

Tabela 2. Classificação do pseudohipoparatiroidismo.

	Característica de AHO	Resistência hormonal	Defeito no gene <i>GNAS1</i>
PHP Ia	Sim	Múltiplos	Sim
PPHP	Sim	Nenhuma	Sim
PHP Ib	Não	PTH	Sim
PHP Ic	Sim	Múltiplos	Não
PHP II	Não	PTH	Não

Os pacientes com herança materna da AHO apresentam-se com PHP Ia. A resistência renal ao PTH nestes pacientes se manifesta por: hipocalcemia, hiperfosfatemia, níveis séricos baixos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e elevados de PTH. A resistência aos hormônios glicoprotéicos TSH, LH e FSH caracteriza-se clinicamente por hipotireoidismo e infertilidade respectivamente.

Frente a estes dados, algumas questões têm sido formuladas sobre a patogênese molecular da AHO e PHPIA.

1) Por que a resistência hormonal não engloba todos os hormônios que utilizam o sistema do receptor 7TM e proteínas G na transdução do sinal celular?

2) Por que familiares com a mesma mutação inativadora apresentam-se fenotipicamente diferentes de acordo com a origem parental do alelo mutado?

Algumas hipóteses têm sido aventadas para explicar tais questões. As de Farfel e cols. podem ser resumidas nos seguintes tópicos (40).

No tecido ósseo a expressão do gene *GNASI* é bi-alélica, com ausência do *imprinting*. Quando ocorre uma mutação inativadora neste gene, tanto no alelo materno quanto no alelo paterno, a quantidade de proteína produzida é insuficiente para uma função normal do tecido ósseo. Isto caracteriza uma haploinsuficiência tecido-específica e ausência do *imprinting* com fenótipo de AHO.

Em células do túbulo renal proximal a expressão do gene *GNASI* é monoalélica, por *imprinting* paterno, havendo expressão somente do alelo materno. Se a mutação estiver presente no alelo paterno (não expresso), não há alteração fenotípica, ou seja, ausência de resistência ao PTH. Se a mutação estiver presente no alelo expresso materno, a função da proteína estará comprometida, acarretando resistência ao PTH. Isto caracteriza uma haplossuficiência com *imprinting* paterno tecido específico.

Em outros tecidos a expressão do gene é bi-alélica, porém haplossuficiente, e não ocorre o fenômeno do *imprinting*. Se a mutação inativadora estiver presente no alelo materno ou no alelo paterno não acarretará alteração da função, o que explica a falta de resistência a outros hormônios que utilizam a mesma via da proteína $G_s\alpha$ para a transdução do sinal celular.

A natureza tecido-específica do *imprinting* do *GNASI* pode explicar porque os pacientes com PHP Ia não apresentam resistência a outros hormônios que ativam a proteína $G_s\alpha$, bem como a manutenção de resposta ao PTH no nefron distal. Estes pacientes apre-

sentam reabsorção adequada de cálcio no tubo ascendente, onde possivelmente o *imprinting* não ocorre.

Em vários tecidos humanos, como tecido fetal, cultura de fibroblastos e tecido ovariano, nenhuma evidência de *imprinting* genômico foi encontrada, no entanto, em tecido hipofisário, pode-se estabelecer um padrão materno de expressão da proteína $G_s\alpha$. Estes dados sugerem que o *imprinting* do gene *GNASI* ocorre com padrão tecido específico (41,42).

Defeito do Imprinting do gene GNASI no pseudohipoparatiroidismo tipo Ib (PHP Ib)

PHP Ib é definido pela resistência renal ao PTH, ausência de AHO ou resistência a outros hormônios. A maioria dos casos é esporádica, porém há relatos de casos familiares. Estudos recentes têm demonstrado resistência ao PTH, somente quando a herança é materna semelhante aos casos de PHP Ia. Em quatro pacientes o mapeamento genético associou a doença à região 20q1.3 que abriga o gene *GNASI* (43-44). Nenhuma mutação foi descrita no receptor do PTH e uma única mutação foi descrita no exon 13 do gene *GNASI*, responsável pela interação da proteína $G_s\alpha$ com o receptor, em três irmãos com PHP Ib. A mesma mutação clinicamente silenciosa foi detectada na mãe e avô materno destes irmãos (45).

Um recente estudo examinando o *imprinting* do *GNASI* em 18 pacientes revelou que o exon 1A não estava metilado em ambos alelos com transcritos bialelicamente expressos. Estes achados sugerem que o exon 1A é importante para estabelecer e/ou manter o padrão de *imprinting* tecido específico do gene *GNASI*. Um modelo hipotético criado por Lee Weinstein e cols. (46) sugere que o exon 1A contém um elemento silenciador, o qual se liga a um repressor que é expresso somente em alguns tecidos, como o túbulo renal proximal. Neste tecido o repressor se liga no alelo paterno e inibe a transcrição do RNAm da $G_s\alpha$, mas é incapaz de ligar-se ao alelo materno pois este sítio está metilado. A transcrição do RNAm da $G_s\alpha$ é via alelo materno expresso e não metilado. Na maioria dos tecidos o padrão anormal de metilação não tem impacto porque o repressor não está presente, explicando desta forma os níveis normais da expressão da proteína $G_s\alpha$ e ausência do fenótipo da AHO. Este modelo assume que a expressão do RNAm da proteína $G_s\alpha$ é expressa exclusivamente pelo alelo materno no túbulo proximal renal, sítio de ação do PTH no rim. Estas evidências foram comprovadas em tecido renal de ratos e hipófise humana, mas não há evidências destes achados em túbulos renais de

humanos. Zheng e cols. tentaram resolver estas questões utilizando tecidos de feto humano para estudo com RT-PCR e observar se a expressão dos transcritos do gene *GNAS1* seria mono ou bialélica. NESP55, XLas e exon 1A eram monoalelicamente expressos em todos os tecidos estudados. Entretanto, $G_s\alpha$ foi bialelicamente expresso nas amostras de córtex renal. Baseados nesta informação os autores concluem que $G_s\alpha$ não sofre *imprinting* no córtex renal e a resistência ao PTH no PHP Ib e provavelmente PHP Ia não é devida à perda de expressão da $G_s\alpha$ no túbulo renal proximal. Weinstein e cols. questionaram estes resultados em seu editorial, devido a possíveis contaminações com estruturas mais distais do nefron, que em ratos sabe-se que a expressão da $G_s\alpha$ é bialélica. Outra possível explicação para não detecção do *imprinting* é que as células do córtex renal fetal não têm a mesma maturidade do córtex formado, e o *imprinting* pode se estabelecer somente nas células maduras. De fato, pacientes com PHP Ia não desenvolvem resistência renal ao PTH ao nascimento, mas só posteriormente aos primeiros anos de vida (46,47).

CONCLUSÕES

Mutações do gene *GNAS1* têm sido identificadas em diferentes doenças endócrinas, com características esporádicas e familiares. Mutações ativadoras e inativadoras são a base da patogênese molecular da síndrome de McCune Albright, OHA-PPH Ia respectivamente. O gene *GNAS1* apresenta alta complexidade na sua estrutura e função. Alteração no padrão de *imprinting* e raramente mutação inativadora deste gene podem estar associados ao PPH Ib O mecanismo que estabelece e mantém o *imprinting* do gene *GNAS1* ainda é um enigma a ser esclarecido. Recentes evidências sugerem que o *imprinting* do gene *GNAS1* pode também ter um efeito nas manifestações clínicas em pacientes com mutações ativadoras. Hayward e cols. mostraram que em 21 de 22 tumores hipofisários secretores de GH, a mutação *gsp* encontrava-se no alelo materno. Em pacientes com síndrome de McCune-Albright, poderíamos esperar que a expressão da atividade constitutiva nos tecidos que sofrem *imprinting* pode ser muito maior quando a mutação estiver presente no alelo materno ativo.

Estudos futuros em animais e em humanos, podem esclarecer o mecanismo complexo do *imprinting* do gene *GNAS1* e o seu envolvimento na patogênese molecular dos PHP Ia e PHP Ib e das doenças associadas ao oncogene *gsp*.

REFERÊNCIAS

1. Rodbell M, Krans HM, Pohl SL, Birnbaumer L. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. Effects of guanylnucleotides on binding of 125 I-glucagon. **J Biol Chem** 1971;246:1872-6.
2. Rodbell M, Birnbaumer L, Pohl SL, Krans HM. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. **J Biol Chem** 1971; 246:1877-82.
3. Spiegel AM, Shenker A, Weinstein LS. Receptor-effector coupling by G-proteins: implications for normal and abnormal signal transduction **Endocr Rev** 1992; 13:536-65.
4. Spiegel AM, Weinstein LS, Shenker A. Abnormalities in G protein-coupled signal transduction pathways in human disease **J Clin Invest** 1993;92:1119-25.
5. Wess J. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. **Pharmacol Ther** 1998;80:231-364.
6. Gether U. Uncovering molecular mechanism involved in activation of G-protein-coupled receptors. **Endocr Rev** 2000;21:90-1132.
7. Felig P, Baxter JD, Frohman LA. **Endocrinology and Metabolism** 3rd ed. New York: Atlas Graphycs & Design, 1995.
8. Spiegel AM. Signal transduction by guanine nucleotide binding proteins. **Mol Cell Endocrinol** 1987;49:1-16.
9. Hepler JR, Gilman AG. G-proteins. **Trends Biochem Sci** 1992;17:383-7.
10. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: Conserved structure and molecular mechanism. **Nature** 1991;349:117-27.
11. Birnbaumer L. Receptor-to-effector signaling through G protein: roles for $\beta\gamma$ dimers as well as α subunits. **Cell** 1992;71:1069-72.
12. Conklin BR, Bourne HR. Structural elements of $G\alpha$ subunits that interact with G $\beta\gamma$, receptors, and effectors. **Cell** 1993;73:631-41.
13. Clapham DE, Neer EJ. New roles for G protein $\beta\gamma$ dimers in transmembrane signaling. **Nature** 1993;365:403-6.
14. Dohlman HG, Thorner J, Caron MC, Lefkowitz RJ. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. **Ann Rev Biochem** 1991;60:653-88.
15. Neer EJ. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. **Cell** 1995;80:249-57.
16. Gautam N, Downes GB, Yan K, Kisslev O. The G-protein complex. **Cell Signal** 1998;10:447-55.
17. Habener JF, Miller CP, Vallejo M. Cyclic AMP-dependent regulation of gene transcription by CREB and CREM. **Vitam Horm** 1995;51:1-57.
18. Habener JF. Cyclic AMP second messenger signaling pathway. In De Groot LJ, et al eds. **Endocrinology** 3rd ed 1995;1:77-921.
19. Watson N, Linders ME, Druey KM, Kehrl JH, Blumer KJ. RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein α -subunit. **Nature** 1996;383:172-5.

20. Hunt TW, Fields TA, Casey PJ, Peralta EG. RGS10 is a selective activator of G $\beta\gamma$ GTPase activity. **Nature** 1996;383:175-7.
21. Ross EM, Wilkie TM. GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-proteins: regulators of G-protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. **An Rev Biochem** 2000;69:795-827.
22. Bornancin F, Chabre M. Cholera toxin ADP-ribosylates transducin only when it is bound to photoexcited rhodopsin and depleted of its nucleotide. **FESB Lett** 1991;291:273-5.
23. Van Biesen T, Luttrell LM, Hawes BE, Lefkowitz RJ. Mitogenic signaling via G-protein coupled receptors. **Endocr Rev** 1996;17:698-714.
24. Dhanasekaram N, Tsim ST, Dermott JM, Onesime D. Regulation of cell proliferation by G-proteins. **Oncogene** 1998;17:1383-4.
25. Weinstein LS, Yu S, Warner DR, Liu J. Endocrine manifestations on stimulatory G-protein α -subunit. Mutations and the role of genomic imprinting. **Endocrine Reviews** 2001;22(5):675-705.
26. Kozasa T, Itoh H, Tsukamoto T, Kaziro Y. Isolation and characterization of human G α gene. **Proc Natl Acad Sci USA** 1988;85:2081-5.
27. Hayward BE, Moran V, Strain L, Bonthron DT. Bidirectional imprinting of a single gene: *GNAS1* encodes maternally, paternally and biallelically derived proteins. **PNAS** 1998;95:15475-80.
28. Hayward BE, Bonthron DT. An imprinted antisense transcript at the human *GNAS1* locus. **Hum Mol Genet** 2000;9:835-41.
29. Pasolli HA, Klemke M, Kehlenbach RH, Wang Y, Huntner WB. Characterization of the extra large G protein α -subunit XL α s. Tissue distribution and subcellular localization. **J Biol Chem** 2000;275:33622-32.
30. Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L. GTPase inhibiting mutations activate the α chain of G $\beta\gamma$ and stimulate adenyl cyclase in human pituitary tumors. **Nature** 1989;340:692-6.
31. Suarez HG, du Villard JA, Caillou B, Schlumberg M, Parmentier C, Monier R. gsp mutations in human thyroid tumors. **Oncogene** 1991;6:677-9.
32. Lyons J, Landis CA, Harsh G, Vallar L, Grunewald K, Feichtinger H et al. Two G-protein oncogenes in human endocrine tumors. **Science** 1990;249:655-9.
33. Fragoso MCBV, Latronico AC, Zerbini MC, Carvalho FM, Frazzatto ET, Lando VS et al. Activating mutation of the stimulatory G-protein *gsp* as a putative cause of ovarian and testicular human stromal Leydig cell tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83:2074-8.
34. Ringel MD, Schwindinger WF, Levine MA. Clinical implications of genetics defects in G-proteins. The molecular basis of McCune Albright syndrome and Albright hereditary osteodystrophy. **Medicine (Baltimore)** 1996;75:171-84.
35. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM. Activating mutations of the stimulatory G-protein in the McCune-Albright syndrome. **N Engl J Med** 1991;325:1688-95.
36. Simon A, Koppeschaar HPF, Roijers JFM, Höppener CJM. Pseudohypoparathyroidism type Ia. Albright hereditary osteodystrophy: a model for research on G protein-coupled receptors and genomic imprinting. **Neth J Med** 2000;56:100-9.
37. Iiri T, Herzmark P, Nakamoto JM, van-Dop C, Bourne HR. Rapid GDP release from Gs alpha in patients with gain and loss of endocrine function. **Nature** 1994;371:164-8.
38. Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. **Nat Rev Genet** 2001;2:21-32.
39. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. **Nature** 1986;321:209-13.
40. Farfel Z, Bourne HR, Iiri T. The expanding spectrum of G protein diseases. **N Engl J Med** 1999;340:1012-20.
41. Weinstein LS, Yu S. The role of genomic imprinting of G α in the pathogenesis of Albright hereditary osteodystrophy. **Trends Endocrinol Metab** 1999;10:81-5.
42. Hayward BE, Barlier A, Korbonits M, Grossman AB, Jacquet P, Enjalbert A. Imprinting of the G(s) alpha gene *GNAS1* in the pathogenesis of acromegaly. **J Clin Invest** 2001;107:31-6.
43. Liu J, Litman D, Rosemberg MJ, Yu S, Biesscker LG, Weinstein LS. A *GNAS1* imprinting defect in pseudohypoparathyroidism type Ib. **J Clin Invest** 2000;106:1167-74.
44. Juppner H, Shipani E, Bastep M, Cole DE, Lawson ML, Mannstadt M. The gene responsible for pseudohypoparathyroidism type Ib is paternally imprinted and maps in four unrelated kindreds to chromosome 20q13.3. **PNAS** 1998;95:11798-803.
45. Wu WJ, Schwindinger WF, Aparicio LF, Levine MA. Selective resistance to parathyroid hormone caused by a novel uncoupling mutation in the carboxyl terminus of G α : a cause of pseudohypoparathyroidism type Ib. **J Bio Chem** 2001;276:165-71.
46. Weinstein LS. Editorial: The stimulatory G protein α -subunit gene: Mutations and imprinting lead to complex phenotypes. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86:4622-6.
47. Zheng H, Radeva G, McCann JA, Hendy GN, Goodyer CG. G α transcripts are biallelically expressed in the human kidney cortex: Implications for pseudohypoparathyroidism type 1b. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86:4627-9.

Endereço para correspondência:

Maria Candida Barisson Villares Fragoso
Laboratório de Hormônios e Genética Molecular
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 155
Prédio dos Ambulatórios (PAMB), 2º andar, Bloco 6
05403-900 São Paulo, SP
Fax: (011) 3083-0626
e.mail: mariafragoso@uol.com.br