

PRÍONS, HOMEOSTASE PROTEICA E A DIVERSIDADE FENOTÍPICA

PRIONS, HOMEOSTASIS OF PROTEINS AND PHENOTYPIC DIVERSITY

ALIANDRA PARREIRA¹, ANA CLARA FERRAZ¹, ARILTON JANUÁRIO BACELAR JÚNIOR^{2*}, CLÉBER ISAC DE ALMEIDA¹, CLEUNICE SOARES¹, FERNANDA OLIVEIRA¹, GISELE CRISTINA ATAÍDE¹, IANARA REIS¹, JORGINO JÚLIO CÉSAR³, VILMÁRIO JIMMY CARTER¹

1. Alunos do curso de Farmácia da Faculdade Única de Ipatinga; 2. Professor do Curso de Farmácia e Coordenador do curso de Farmácia da Faculdade Única de Ipatinga; 3. Professor do curso de Farmácia da Faculdade Única de Ipatinga.

* Rua Salermo nº 299, Bairro Betânia, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil. CEP: 35160-241 dr.arilton@gmail.com

Recebido em 25/06/2015. Aceito para publicação em 16/08/2015

RESUMO

Grandes fenômenos de agregação proteica, os príons são muitas vezes incompreendidos. A associação desta proteína a algumas doenças tem contribuído para o ofuscamento de um atributo importantíssimo: A sua capacidade de criar memórias moleculares com base em proteína. Nos fungos, os príons tem contribuído para a diversificação de população clonais a partir da alteração entre genótipo e fenótipo de uma maneira hereditária. Os resultados das mais recentes pesquisas apontam para os príons como assunto mais comum do que o que se pensava antes. Segundo estes resultados, os príons, guias fenotípicos, podem aumentar sua diversidade conforme o stress a que é exposto, podendo ser amplificado pela maturação dinâmica dos estados de iniciação do prion. Nossa argumentação e questionamento é até que ponto essas qualidades permitem os príons atuarem como dispositivos que facilitam a adaptação da levedura para ambientes estressantes, permitindo acelerar a evolução de novas características, e o ponto em que traduz risco real à saúde tanto humana quanto animal.

PALAVRAS-CHAVE: Proteína, Hereditariedade, Diversidade Fenotípica.

ABSTRACT

Major phenomena of protein aggregation, prions are often misunderstood. The association of this protein to some diseases has contributed to the blurring of an important attribute: Your ability to create molecular memory based on protein. In fungi, prions has contributed to the diversification of clonal population from the changes between genotype and phenotype in a hereditary way. The results of the latest research points to the prions as more common issue than previously thought. According to these results, prions, phenotypic guides, can increase their diversity according to the stress to which it is exposed, may be amplified by the dynamic maturation of prion initiation states. Our argument and questioning is to what extent these qualities allow prions act as devices that facilitate the adaptation of yeast to stressful environments, allowing accelerate the development of new features, and the point at which translates real health risk to both human and animal.

KEYWORDS: Protein, Heredity, Phenotypic Diversity.

1. INTRODUÇÃO

O fenômeno Prion (*Proteinaceous Infectious Only particle*), ou doenças priônicas não é um tema recente. Há descrição desta patologia datada do século XVIII na Inglaterra, na época conhecido como o mal da vaca louca. Esta descrição foi publicada no Diário das Câmara do Reino Unido. Apesar da publicação, o assunto foi relegado a segundo plano, tendo ficado esquecido por mais de 200 anos. Entretanto o assunto voltou a ganhar força no mundo científico nos meados dos anos 60, quando o físico Thykave Alper e o matemático Jhon Stanley desenvolveram uma teoria de que o mal da vaca louca, ou, a encefalopatia espongiforme que ataca os animais bovinos, era causado por um tipo de proteína infecciosa que não possuía DNA nem RNA; a estas proteínas foi dado o nome de príons (*Proteinaceous Infectious Only particle*). Eles chegaram a esta conclusão a partir de testes com irradiação para determinar o organismo patogênico que causava a doença. Nestes testes descobriram que o agente patogênico causador da doença era muito menor que um vírus. A partir de então verificaram que este agente patogênico era muito sensível à radiações de 280 nm. Este pico de absorção corresponde ao pico de absorção das proteínas. Com esta informação focaram o estudo na atividade proteica e apresentaram ao mundo a forma deformada da proteína prion. Somente em 1967, que a natureza do agente patogênico do Prions foi identificado e decifrado¹.

Em um estudo realizado em uma tribo dos montes Fore em Papua, Nova Guiné, em 1995, a desordem neurológica que era caracterizada por movimentos oculares anormais, tremores e demência, dava conta de que a Encefalopatia Espongiforme Bovina havia atingido os humanos, com uma forma atípica da doença Creutzfeldt-Jakob, que atingia pessoa menores que 30 anos de idade. Agora não era apenas o reino animal que era atingido pela letal ação priônica. O nome dado à patologia causada pela ação dos príons foi **Kuru**, que significa

arrepio. Nesta época, uma população de 35.000 indivíduos sofreu baixa de 3000, mortos pelo ataque príon².

2. MATERIAL E MÉTODOS

Como o assunto ainda é escasso em nível nacional, com poucas informações há a respeito do tema proposto, a pesquisa foi baseada em estudos elaborados pelas Universidade de Yale e Berkeley, por intermédio de websites, e-mails e vídeo-aulas das respectivas universidades. Foram utilizados os métodos de pesquisas em livros e revistas científicas, artigos e literaturas monográficas existentes sobre esta temática. As palavras-chave utilizadas: Proteína, Hereditariedade e Diversidade Fenotípica. A busca resultou na utilização de 16 estudos, compreendendo o período de 1997 à 2010.

3. DESENVOLVIMENTO

A proteína príon celular

Também conhecida como PrP (*Prion Protein*), a proteína príon celular está localizada na membrana plasmática neuronal, sendo ela uma das constituintes das células cerebrais. Sua codificação (apresenta 253 aminoácido) é feita por um gene de dois éxons, presente no cromossomo 20, sendo que estes genes são ativados pelos próprios neurônios dos seres humanos³.

Como toda e qualquer proteína, o príon também precisa passar pelo processo de maturação para se tornar funcional. Nesta sua maturação, o resíduo N-terminal exibidor do grupamento amino (uma sequência de 22 aminoácidos) da proteína é perdido, ficando apenas o grupo carboxila, que seguido de glicosilamento é endereçada para seu local de ação. No local em que foi perdido o grupamento amino é adicionado uma GPI (âncora glicosil-fosfatidilinositol) que serve para fazer a ligação da proteína na membrana celular, no lado externo da célula. Assim sendo, a proteína está pronta, na sua conformação³ (Figura 1).

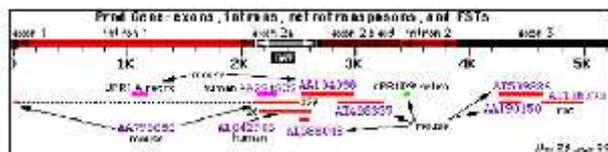


Figura 1. Prion codificado por gene de dois éxons. Fonte: http://www.mad-cow.org/00/doppel_alleles.html

A formação Prion

Os príons são entidades autorreplicantes de proteínas que estão na base da propagação de uma doença neurodegenerativa de mamíferos, com denominações como Kuru, scrapie, e encefalopatia espongiforme bovina, em seres humanos, ovelhas e vacas, respectivamente. No entanto, a maioria dos príons foram descobertos em organismos inferiores e, em particular, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*⁴.

Uma recente pesquisa liderada por cientistas brasileiros aponta que a PrPC, ou proteína celular príon, tem importante participação em muitas funções neurológicas, exercendo o papel de proteção do neurônio contra a morte celular e garantindo a plasticidade destas células, além de cooperar nos prolongamentos dos neurônios (Neuritos).

Apesar das afirmativas de que os príons são doenças, muitas linhas de evidência sugerem que esses elementos misteriosos são geralmente benignos e, de fato, em alguns casos benéficos. Em fungos, os príons atuam como elementos epigenéticos que aumentam a diversidade fenotípica de uma forma hereditária e também pode aumentar a sobrevivência em diversas condições ambientais⁵.

Em organismos superiores, príons podem até ser um mecanismo para manter estados fisiológicos de longo prazo, como sugerido para a *Aplysia californica* (lesma do mar) isoforma neuronal da proteína de poliadenilação citoplasmática (CPEB). A forma desta proteína príon parece ser responsável pela criação de sinapses estáveis no cérebro. Esta proteína é proeminentemente o primeiro exemplo do que pode ser um grande grupo de interruptores fisiológicos príon; esta peça vai se concentrar em príons como elementos à base de proteínas genéticas - a sua capacidade de conduzir comutação reversível em diversos fenótipos, e da maneira que a comutação pode promover a evolução da novidade fenotípica⁶.

O estado de replicação dos príons é mais bioquimicamente caracterizado como amilóide, fibrilas proteicas que se estendem aos tecidos (epitelial, ósseo, muscular, etc.) prejudicando a função de vários órgãos causando a amiloidose (Figura 2), embora outros tipos de conformações de proteínas autopropagáveis podem também dar origem a fenômenos príon. Amilóide é um agregado proteico fibrilar altamente ordenado, com um conjunto único de características biofísicas que facilitam a propagação príon: extrema estabilidade, montagem por polimerização nucleadas, e um alto grau de especificidade de templates⁷.

A propagação príon são rendimentos de um único evento de nucleação que ocorre dentro de uma população intracelular de outra forma estável não príon. O núcleo é então alongado para uma espécie fibrilar tomando conversão conformacional. Estas proteínas podem servir como elementos genéticos através da adoção de estados físicos e funcionais distintos que são as características de autopropagação e hereditárias. A região crítica de uma proteína príon, Sup35, inicialmente é desestruturada tomando forma de solução e, em seguida forma fibras amiloides (fibrilas proteicas que podem se auto depositar em vários tecidos (epitelial, ósseo, muscular, etc.), prejudicando a função de órgãos), autoreplicativas, se diferenciando entre príon normal e príon patológico⁸ (Figura 3).

Estruturalmente complexos oligoméricos e fluido intermediários parecem ser cruciais na formação de novo

núcleo amiloide.

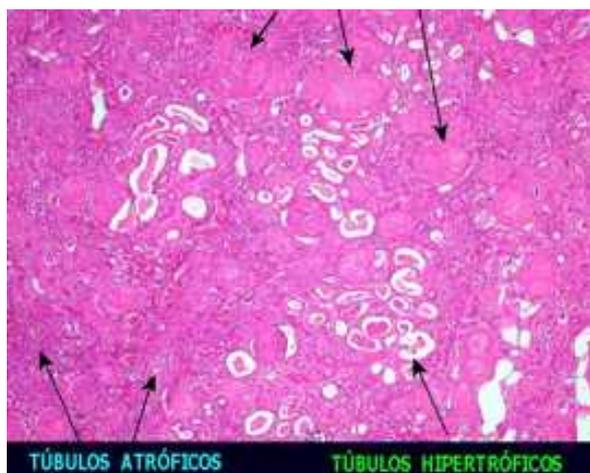


Figura 2. Glomérulos com Amiloidose.

Fonte: <http://anatpat.unicamp.br/lamuro6.html>

Montagem rápida resulta quando estes complexos conformacionalmente converter mediante associação com núcleos. Este modelo para replicar informações genéticas à base de proteínas, pode ser aplicável a outros processos de montagem de proteínas⁸.

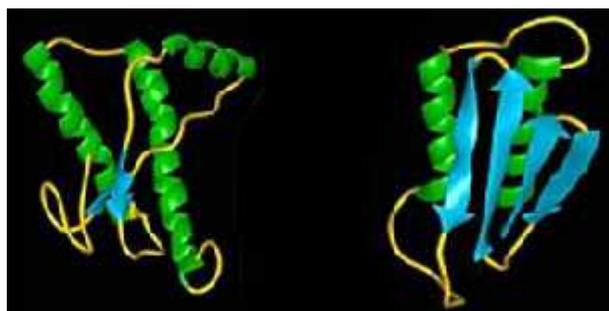


Figura 3. Estruturas de proteína príon normal PrP^c ou PrP^{sen} (esquerda) e patológico PrP^{Sc} ou PrP^{res} (direita). Fonte: <http://autoclave-certoclav.blogspot.com>

Os príons de *Saccharomyces cerevisiae* são demonstrados, sendo que eles podem causar mudanças hereditárias no fenótipo. Neste fundo genético particular, o príon [PSI⁺] pode ser apresentar coloração branca e prototrofia de adenina devido a leitura translacional de uma mutação sem sentido no gene ADE1. No entanto, a variação genética crítica que pode ser revelado por príons de *Saccharomyces cerevisiae* resultante, é inerentemente polimórfica em uma ampla variedade de fenótipos (específica da estirpe PSI⁺)⁹.

Geralmente os fenótipos fúngicos são causados por uma redução da atividade celular normal da proteína do príon. *In vivo*, a agregação e perda de função parcial da proteína príon, pode ser observada pela presença de Sup35-GFP focos em células PSI⁺. Estes focos são compostos por agregados de príons autorreplicáveis de que são transmitidos no citoplasma durante a divisão celular⁹.

A proteína príon purificada preenche um estado solúvel por um período prolongado de tempo, então polimeriza exponencialmente após o aparecimento de núcleos de amiloide. A fase de retardamento pode ser eliminada através da adição de pequenas quantidades de agregados pré-formadas, demonstrando assim a propriedade bioquímica subjacente ao estado de príon autopropagável⁹.

A conformação príon de autopropagação é amiloide, ou seja, são fibrilas proteicas que podem depositar em vários tecidos, prejudicando a função de vários órgãos. A sua aparência é fibrilar de agregados de domínio príon visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. Sendo amiloide é um polímero de proteína unidimensional, as suas extremidades livres modelam uma reação de dobramento de proteínas que incorporam novas subunidades promovendo a regeneração do modelo ativo com cada adição⁹.

Os fragmentos de fibras de proteína que crescem em entidades propagando menores, que são, em última análise disseminadas para as células filhas. Porque a mudança na conformação da proteína provoca uma alteração na função, estas alterações conformacionais autopropagam criando fenótipos hereditários únicos para o determinante proteico e os antecedentes genéticos. As propriedades genéticas que surgem são distintas das da maioria das mutações codificado-nucleares: fenótipos príons são dominantes em cruzamentos genéticos e exibem padrões de herança não-mendeliana. Daí elementos genéticos baseados em príons são indicados com letras maiúsculas e entre parênteses - "(PRÍON)"¹⁰.

Príons: vantagens e possíveis benefícios

Um príon de terminação Sup35 é um príon fúngico. Príons fúngico ocorrem naturalmente, e são proteínas que podem alternar entre várias conformações distintas estruturalmente, com características de autopropagação e transmissível a outras proteínas. Esta transmissão de estado proteico representa um fenômeno epigenético onde a informação priônica é codificada na própria estrutura da proteína, em vez de em ácidos nucleicos. Inúmeras proteínas foram identificadas em fungos, como proteínas formadoras de príon, principalmente na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Estes príons fúngicos são geralmente considerados benignos, e, em alguns casos, até mesmo conferem algumas vantagens para o organismo¹¹.

A primeira proteína de príon proposto para aumentar a sobrevivência em ambientes de flutuação é o fator de terminação da tradução Sup35, que constitui um estado chamado príon (PSI⁺). Isto reduz a atividade do príon Sup35 em relação ao não-príon [PSI⁻], criando, assim, uma variedade de fenótipos relacionados à alteração de tradução. A surpreendentemente grande fração dos fenótipos (~ 25%) são vantajosos sob condições de cresci-

mento particulares. Enquanto reduzida fidelidade da tradução não pode, no longo prazo, ser vantajoso para o crescimento, a curto prazo as mudanças na expressão gênica trazidas pela [PSI⁺] pode permitir que as células a crescer na presença de antibióticos, metais e outras condições tóxicas ou com diferentes fontes de carbono ou azoto, dependendo do fundo genético. Como as células obtém espontaneamente o prion, com uma frequência considerável (10^{-7} a 10^{-6}), em qualquer momento uma grande população de células de levedura conterá alguns estados que já ligado. Se o ambiente é tal que [PSI⁺] é benéfico, essas células, então, tem uma chance maior de sobreviver nesse ambiente. É importante notar que o estado do prion pode ser revertido pela sua perda ocasional durante a divisão celular (com frequências ainda indeterminada), resultando em progenitores com o original (PSI⁻) fenótipo. Se, após um período de crescimento, as mudanças de ambiente para um estado onde (PSI⁺) não é vantajoso, aquelas poucas células que tenham perdido espontaneamente o prion então têm uma vantagem de sobrevivência. De um ponto de vista central gênico, o efeito desta mudança no fenótipo, é o genótipo comum compartilhado por ambos (PSI⁺) e (PSI⁻). Mesmo se os interruptores raros para o (PSI⁺) estado são geralmente desvantajoso, (PSI⁺) poderia melhorar dramaticamente a aptidão em longo prazo de um genótipo. Fenômenos de mudança fenotípica relacionadas, parecem constituir estratégias de redução de risco do ambiente otimizado⁹.

Prions como doenças

Quando o assunto entra no campo da levedura, o prion se encontra em uma controvérsia: estes elementos a base de proteína herdada são doenças ou servem apenas de funções biológicas importantes?¹².

Os prions como agregados autorreplicáveis

Os fatores de remodelação de proteína entre outros mecanismos de controle de qualidade proteicas interagem com os prions a cada passo detalhado de sua propagação. Estes prions impulsionam os interruptores fenotípicos modulados pelas condições ambientais produzindo uma espécie de perturbação da homeostase proteica, comprometendo todo o equilíbrio do proteoma, da síntese de proteína até os processos de degradação. A partir desta perturbação, os prions assumem o controle da constituição à resposta biológica ao stress do organismo perturbado. A relação entre a proteína prion e homeostase proteica rende prions em dispositivos sofisticados de cobertura de aposta evolutivas. Este fator explicita as características intrigantes da biologia prion que defendem um papel geral de prions na adaptação a novos ambientes, e, assim, a evolução de novas características¹³ (TYEDMERS,2008).

Os prions como dispositivos bet-hedging (cobertura de aposta)

Os prions possuem o poder de permitir que organismos simples provoquem mudanças espontaneamente entre os estados fenotípicas distintas. Por esta razão, os prions podem ser considerados como dispositivos de cobertura que aumentar a aptidão reprodutiva dos organismos que vivem em ambientes flutuante, criando as subpopulações variantes com estados distintos fenotípicas¹⁴.

A expressão “cobertura de aposta” é a que melhor explica o termo *bet-hedging*, uma expressão relacionada diretamente com a teoria da seleção natural das coisas. Isto abre uma discussão explicativa a respeito da multiplicação priônica fazendo com que seja doença em certos tecidos vivos, e benefício em outros; levando a crer que a seleção fenotípica da multiplicação será fruto da reação enzimática do organismo hospedeiro¹⁴.

Heterogeneidade fenotípica e estratégias de cobertura de aposta em microorganismos

As células individuais em culturas microbianas isogênicas geralmente exibem um elevado grau de heterogeneidade fenotípica em condições de cultura homogêneas. Alguns dos melhores exemplos caracterizados de fenótipos de expressão heterogênea incluem a diferenciação celular em *Bacillus subtilis*, a utilização da lactose, quimiotaxia e persistência de antibióticos na *E. coli*, a expressão antígeno de superfície do parasita da malária *Plasmodium falciparum*, e a expressão de adesinas da parede celular que controlam o crescimento invasivo de floculação na levedura de padeiro. Os ruídos na expressão gênica, geralmente se acredita ser uma contribuição importante para a individualidade celular, mas outros fatores responsáveis pela heterogeneidade fenotípica têm sido propostos, incluindo o ciclo celular, o envelhecimento, ritmos biológicos, taxas de crescimento de células individuais e mudanças epigenéticas herdadas¹⁵.

Essa heterogeneidade de nível populacional pode aumentar a capacidade de um organismo para sobreviver em ambientes extracelular flutuante, que pode estar envolvido o microambiente e, ou o microambiente externo, e até mesmo o ambiente celular interno¹⁶.

A heterogeneidade fenotípica é um resultado inevitável do ruído biológico, mas também pode resultar de variação fenotípica adaptativa, ou "*bet-hedging*". Exemplos clássicos de *bet-hedging* incluem decisões de crescimento como a dormência das sementes, mas a comutação estocástica entre os fenótipos em micróbios pode aumentar de forma semelhante da aptidão média ao longo de várias gerações e, portanto, beneficia a linhagem da diversidade fenotípica genética. A cobertura de Bet pode ser uma alternativa teoricamente viável para a mudança fenotípica com base em sensoriamento ambiental, e pode experimentalmente evoluir em bactérias. O valor de co-

mutação estocástico é moldado por muitos fatores, incluindo a frequência, a previsibilidade, e da gravidade das alterações ambientais; a capacidade do organismo para responder diretamente a alterações; e a capacidade de evoluir inerente da população¹⁶.

4. CONCLUSÃO

Os príons, ou doenças priônicas indicam que a proteína PrP^{Sc}, mediado por células vizinhas consegue contaminar outras proteínas a seu redor, fazendo-a tomar características príons. Muitas décadas de estudos já se passaram e somente agora aproxima-se de um denominador comum que nos remete ao princípio dos estudos. Descobriu-se que aquilo que pensava-se ser, não o é, ou parece não ser; e o que tinha-se certeza que seria, já não mais o é. A incerteza toma conta deste assunto e todos estão voltam-se a desvendá-lo.

Conhece-se duas tipagens da doença, e sabe-se por elas que uma é patológica e letal se não tratada. Desenvolveu-se terapias anti-neurodegenerativas promotoras de receptores não específico a fim de inibir o alcance da proteína priônica.

Conclui-se que o foco extracelular A seria o objetivo principal. Agora se espera que os mecanismos tanto de absorção quanto o de interação intercelular sejam determinados para que o caminho para a farmacologia esteja cada vez mais livre e amplo na busca do fármaco que bloqueie o avanço patológico do príon.

Ainda falta passos importantes para que a luz no fim do túnel recaia sobre o assunto em suma. Precisa-se decifrar os mecanismos que tem o poder de desencadear a mudança estrutural proteica, uma vez que já se sabe que 120° não surte efeito sobre os príons com o é na proteína normal. As proteínas priônicas não sofrem ataque da protease tampouco se desnaturam com as altas temperaturas.

REFERÊNCIAS

- [1] Lledo P-M. História das vacas loucas. Instituto Piaget. 2002; 1:160
- [2] SBPC. Doença por príons. 2003; 33(194).
- [3] Étienne J. Bioquímica genética e biologia molecular. 6ª ed, Editora Santos, São Paulo, SP. 2003; p.504.
- [4] Aguzzi A, *et al.* A razão do príon indescritível de ser. *Annu Rev Neurosci.* 2008; 439-477. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18558863 Acesso em 22.mai.2015.
- [5] Wickner RB, *et al.* Os príons de fungos: herdou estruturas e funções biológicas. *Nat Rev Microbiol.* 2007. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17632572 Acesso em 27.mai.2015.
- [6] Si K, *et al.* A isoforma neuronal do CPEB tem propriedades príon. *Cell.* 2003. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14697205 Acesso em 27.mai.2015.
- [7] Glover JR, *et al.* Fibras espontâneas formadas por Sup35, o determinante de proteína [PSI +], um fator de prion-like hereditárias de *S. cerevisiae*. *Cell.* 1997; 89:811-19. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9182769> Acesso em 16.mai.2015.
- [8] Serio TR, *et al.* Conversão nucleada conformacional e a replicação de informações conformacional por um determinante prion. *Science.* 2000; 289 :. 1317-1321. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10958771 Acesso em 15.mai.2015.
- [9] Halfmann R, Alberti S, Lindquist S. Os príons, homeostase proteica e diversidade fenotípica. *Trends Cell Biol* 2010; 125-33. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2846750/#R11. Acesso em 15.mai.2015.
- [10] Shorter J, Lindquist S. Os príons como condutas adaptativas de memória e herança. *Nat Rev Genet.* 2005; 6:435-50. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15931169 Acesso em 16.mai.2015.
- [11] Bradley ME; Liebman SW. The Sup35 domains required for maintenance of weak, strong or undifferentiated yeast [PSI+] prions. *PUBMED.*2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15009892> Acessado em 10.jun.2015.
- [12] NAKAYASHIKI *et al.* Yeast prions [URE3] and [PSI+] are diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1180808/> Acesso em 27.mai.2015.
- [13] Tyedmers J, *et al.* Prion switching in response to environmental stress. *PLoS Biol.* 2008; 6:e294. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2586387/> Acessado em 27.mai.2015.
- [14] Seger J, Brockmann, HJ. What is bet-hedging? *Oxford Surv Evol Biol.* 1987. Disponível em: http://biologylabs.utah.edu/seger/Seger_Brockmann_87.pdf Acessado em 27.mai.2015.
- [15] Avery SV. Microbial cell individuality and the underlying sources of heterogeneity. *Nat Rev Microbiol.* 2006; Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16845428> Acesso 27.mai.2015.
- [16] Uptain SM, Lindquist S. Prions as protein-based genetic elements. 2002. *PUBMED.* Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12142498> Acesasdo em 08.jun.2015