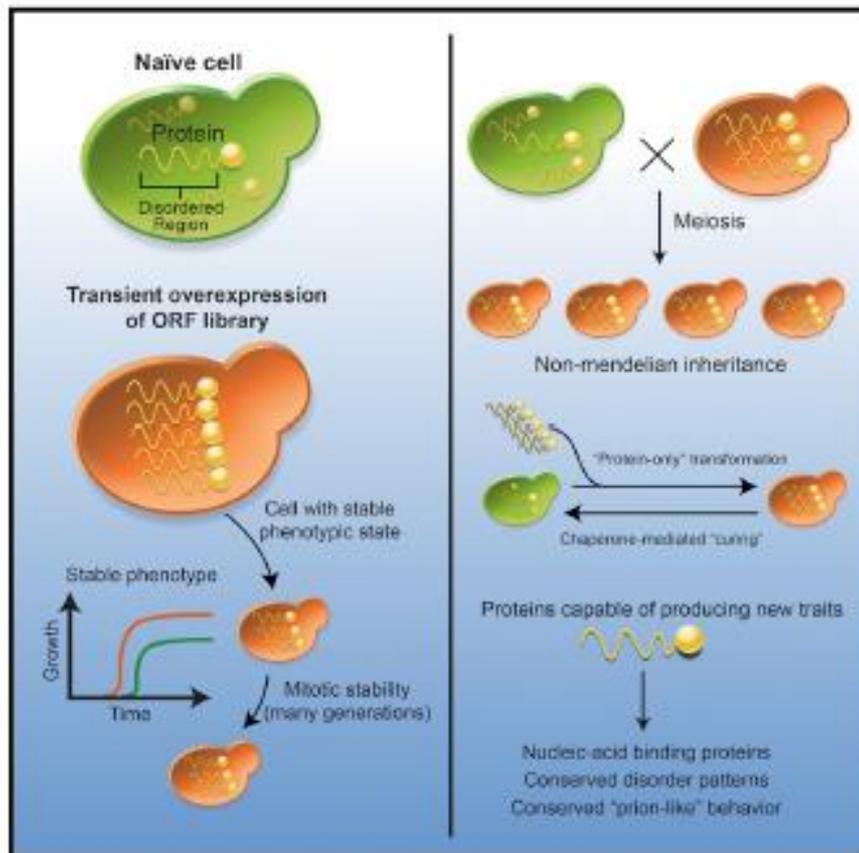


Intrinsically Disordered Proteins Drive Emergence and Inheritance of Biological Traits

Graphical Abstract



Authors

Sohini Chakrabortee, James S. Byers, Sandra Jones, ..., Brayon Fremin, Susan Lindquist, Daniel F. Jarosz

Correspondence

lindquist_admin@wi.mit.edu (S.L.),
jarosz@stanford.edu (D.F.J.)

In Brief

Intrinsically disordered proteins act in a prion-like manner to create protein-based molecular memories that drive the emergence of new, frequently adaptive traits.

Vittoria de Lima Camandona

Mestranda do Programa de Pós-graduação
Interunidades em Biotecnologia¹-USP

Prólogo: Paradoxo da evolução

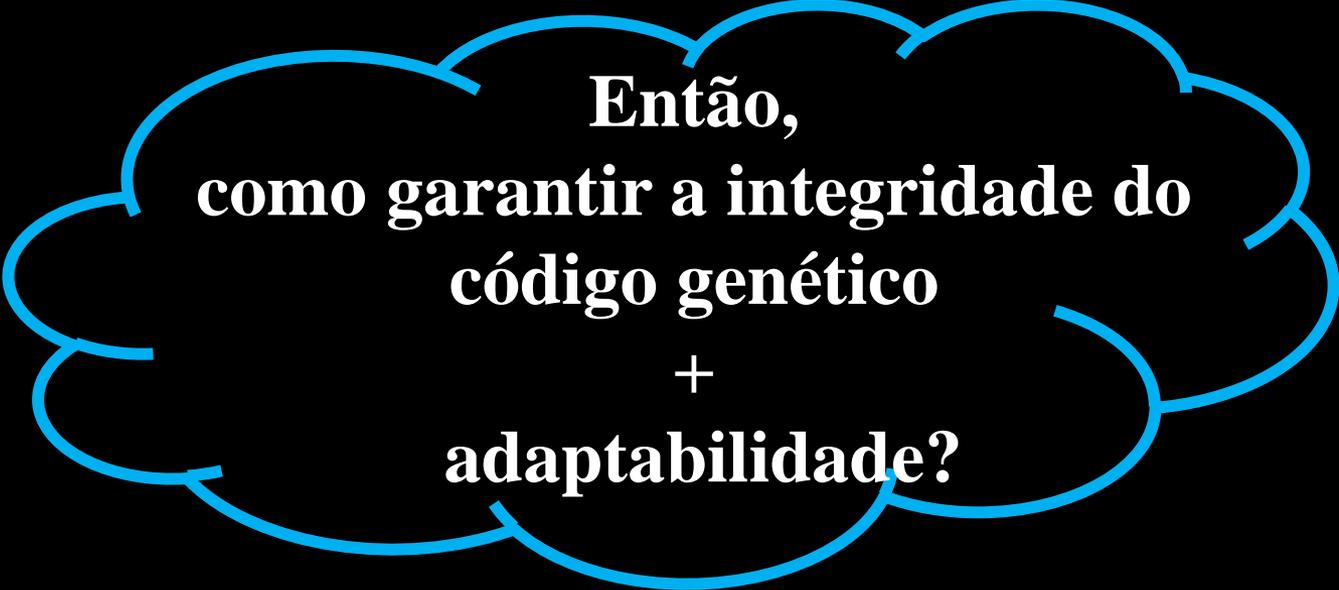
Há uma quantidade extraordinária de mecanismos para proteger a integridade do código genético, para assegurar que as informações sejam transmitidas fielmente as gerações futuras...

...Mas o sucesso evolutivo requer adaptabilidade...

Paradoxo da evolução

Há uma quantidade extraordinária de mecanismos para proteger a integridade do código genético, para assegurar que as informações sejam transmitidas fielmente as gerações futuras...

...Mas o sucesso evolutivo requer adaptabilidade...

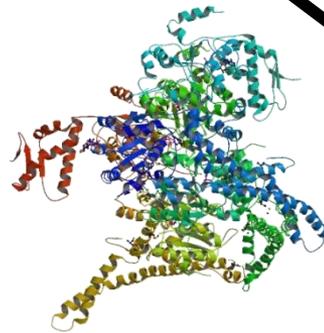


**Então,
como garantir a integridade do
código genético
+
adaptabilidade?**

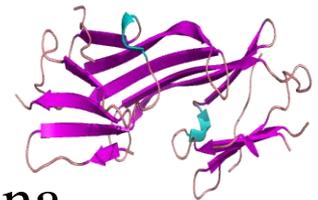
Herança



Mendeliana
(DNA)



NÃO-
Mendeliana



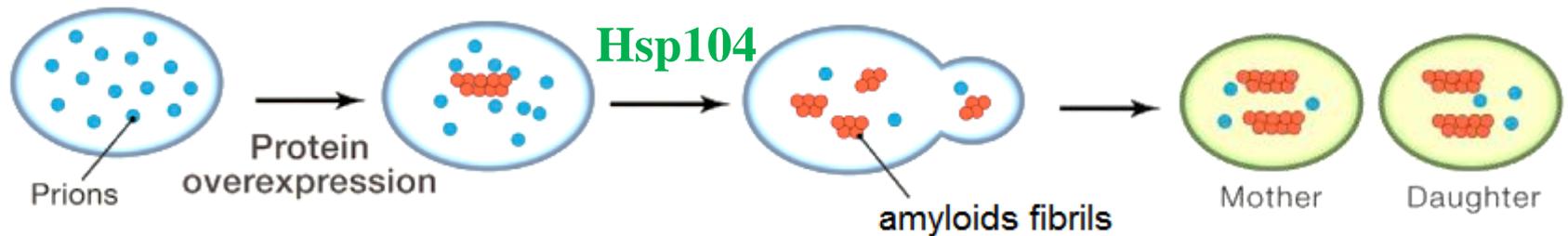
Herança baseada em proteínas

Príons



Classe de proteínas incomum -podem assumir conformações estruturais distintas, e se perpetuar

“Criar mudanças hereditárias no fenótipo como elementos genéticos baseados em proteínas”



“Eu queria saber a amplitude de herança à base de proteínas em todo o genoma de levedura.
É realmente tão raro?”

- Jarosz

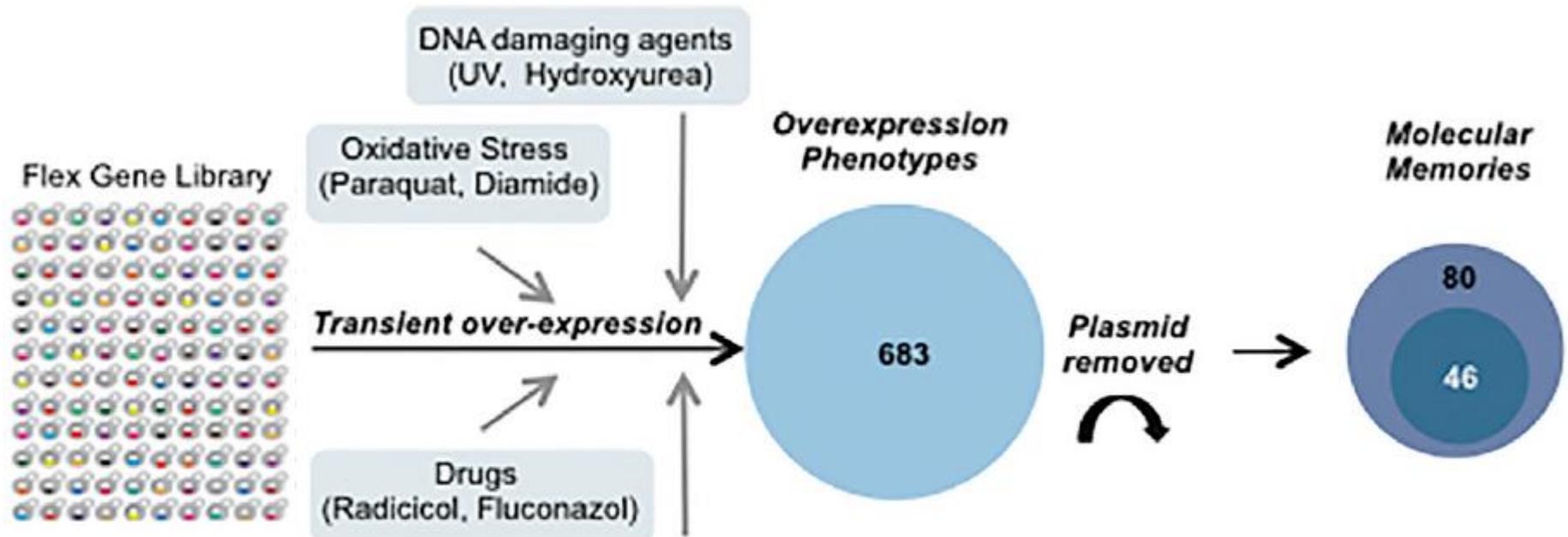


Objetivo do artigo

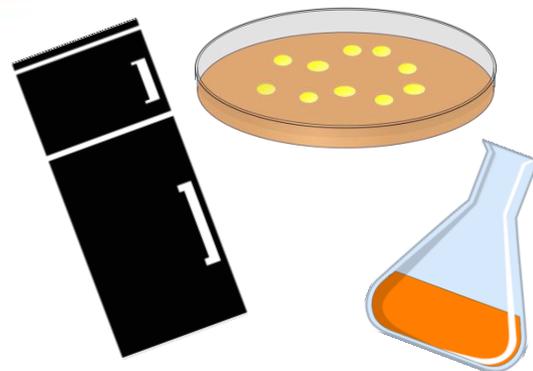
- Identificar novos príons em *Saccharomyces cerevisiae*
 - Examinaram o proteoma de *S. cerevisiae* para a capacidade de desencadear traços biológicos estáveis, induzindo de forma **transitória e individual** a expressão de praticamente todas as fases de leitura aberta (ORF) de levedura (~5300)

Elevar os níveis de qualquer uma das 5 300 proteínas de levedura, poderia desencadear uma alteração hereditária no fenótipo, mesmo após manter os níveis de expressão normal?

As alterações fenotípicas induzidas pela superexpressão de proteína não são inesperadas, mas a retenção e a transmissão dos fenótipos resultantes quando as células retornam ao estado não induzido, são.



Superexpressaram quase todos as ORF a partir de um plasmídeo de cópia única com um promotor induzível com galactose

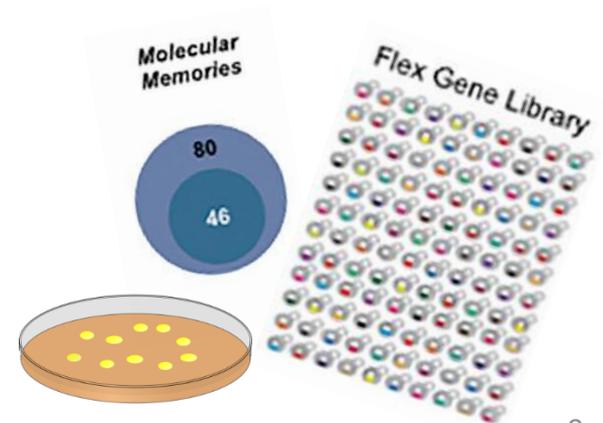


80 mantiveram-se estáveis por >10 gerações

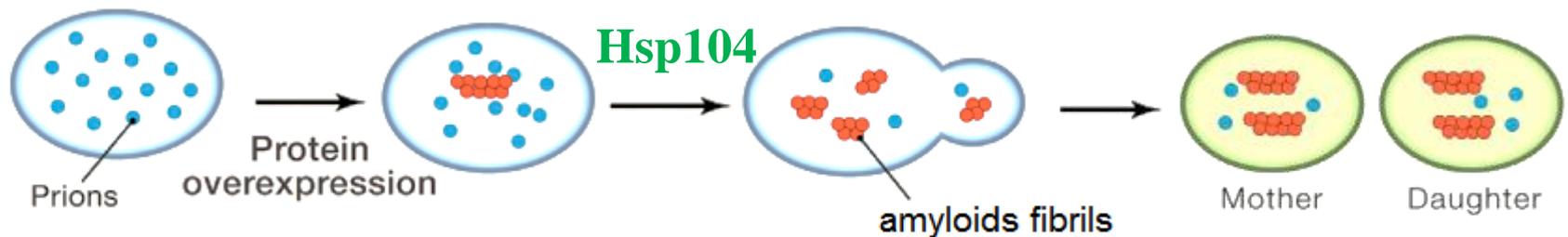
46 > 100 gerações

Conclusão

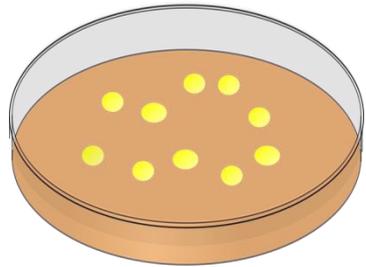
1. Surgimento de "memórias moleculares" estáveis induzidas por mudanças passadas e transitórias na abundância de proteínas
2. As proteínas capazes de efetuar esses traços foram enriquecidas em fatores que regulam o fluxo de informação, em particular, fatores de transcrição e proteínas ligadas ao RNA



Se inibirmos transitoriamente Hsp104, será que eliminamos os traços observados?



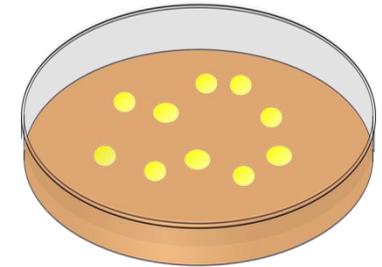
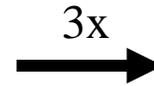
Portanto, examinaram se a inibição transitória da Hsp104 poderia eliminar os traços que surgiram



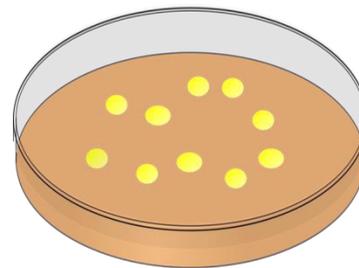
Colônias das 35 cepas independentes de Hsp104



Transformação com um plasmídeo que expressava constitutivamente Hsp70^{DN}



YPD



YPD

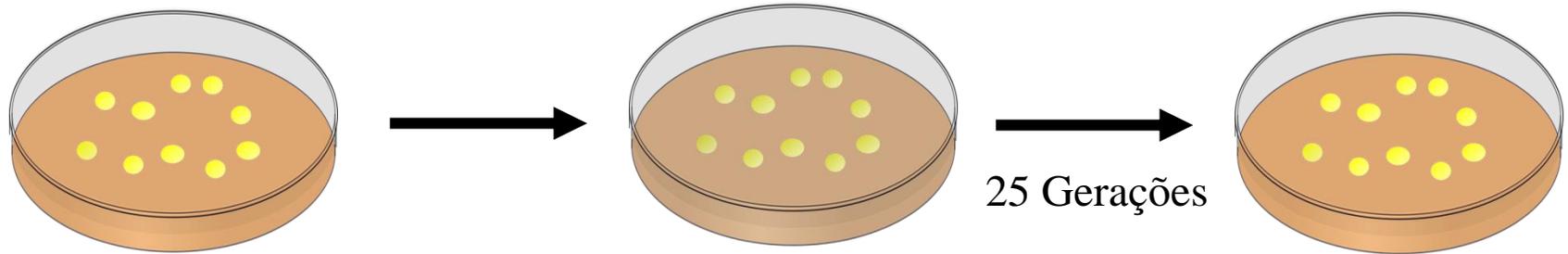
25 Gerações Eliminação do plasmídeo contendo Hsp70^{DN}



19 dependiam da Hsp70

E as outras 16 amostras?

Hsp90 é necessária para a propagação de um prion específico em plantas...



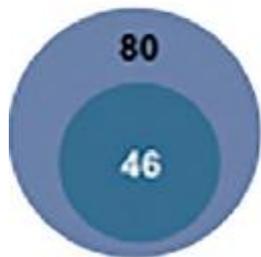
Colônias das 16 amostras

YPD + radicicol (inibidor de Hsp90)

25 Gerações

YPD

Molecular Memories



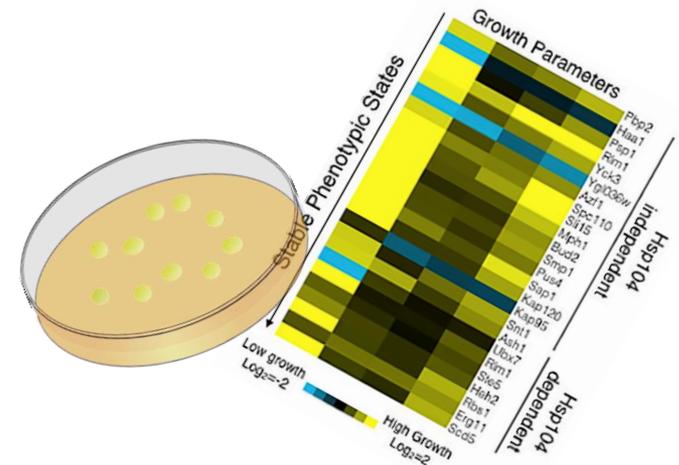
- 80 Stable for >10 generations
- 46 Stable for >100 generations
- Hsp104 – 11 memories
- Hsp70 -19 memories
- Hsp90 - 2 memories
- Unknown – 14 memories**

2 traços foram eliminados.
Logo, dependem da Hsp90

- ✓ [RNQ⁺] requer Hsp40
- ✓ [URE3] é influenciada pela co-chaperona Cpr7

Conclusão

1. A propagação das proteínas tipo príon encontradas dependem de Hsp's
2. Embora além do alcance deste trabalho, outros componentes da maquinaria da homeostase proteica também podem influenciar a herança dos 14 estados fenotípicos restantes.



Herança



Como os príons não estão ligados à segregação dos cromossomos, eles são passados para a maioria, se não todos, a progênie meiótica

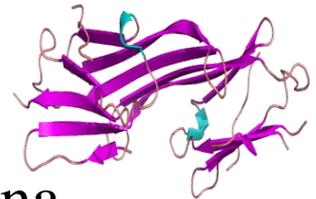
Mendeliana

2:2



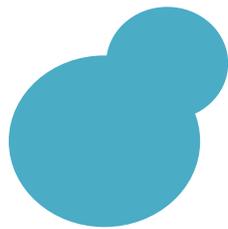
NÃO-Mendeliana

4:0 ou 3:1



Selecionamos 18 estados fenotípicos hereditários para testar outras características definidoras da biologia priônica: herança não-mendeliana

Cruzamento:



[PRION⁺]

x



Células
ingênuas

Como os traços segregam
para a progênie?



4:0 ou 3:1 em Tétrades

Os traços que surgem das mutações
do DNA se propagam para metade
de toda a progênie (2: 2)

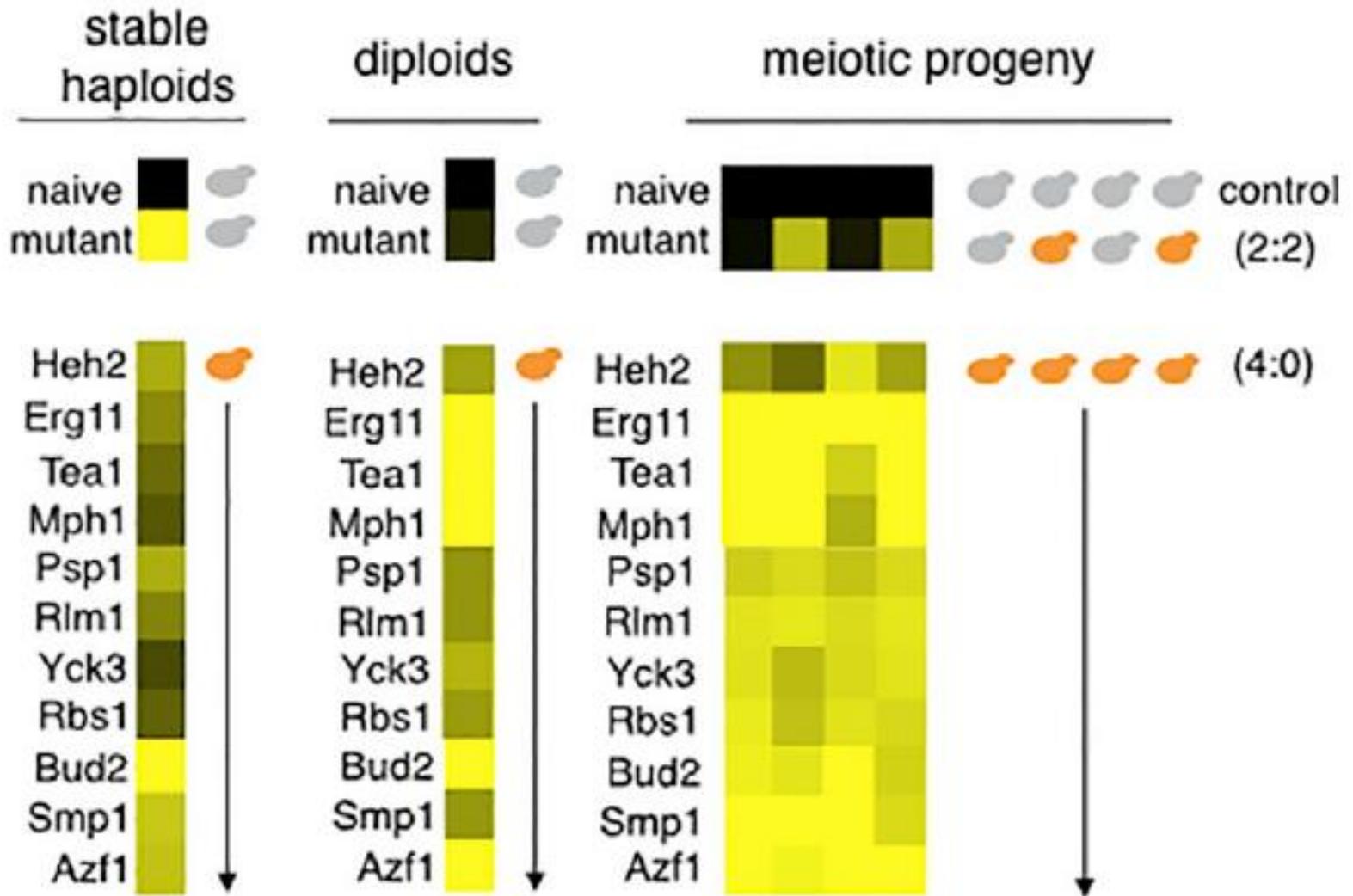
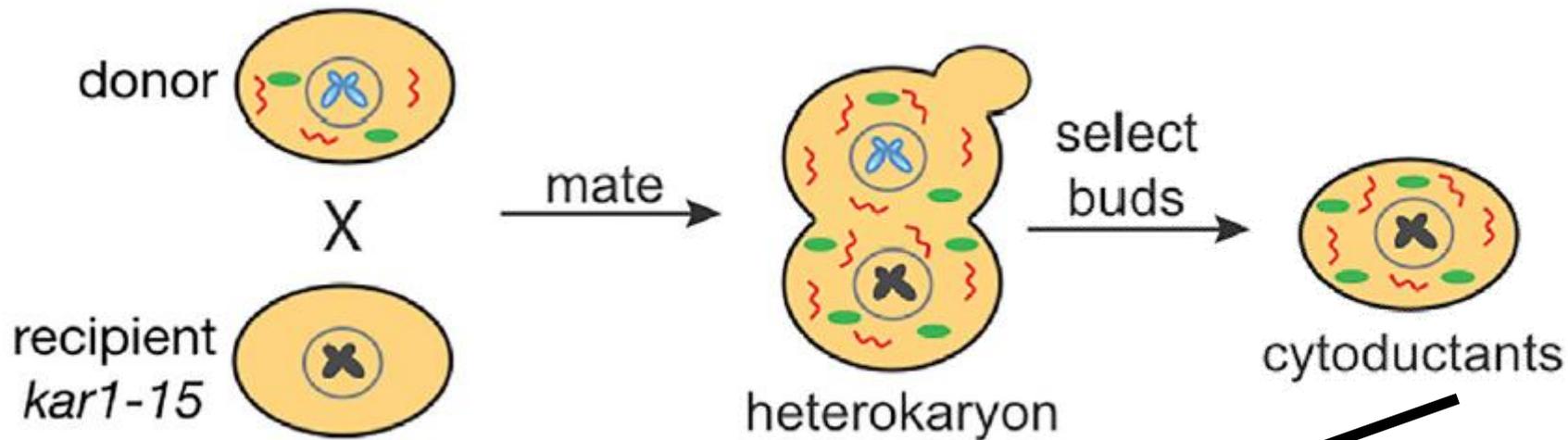
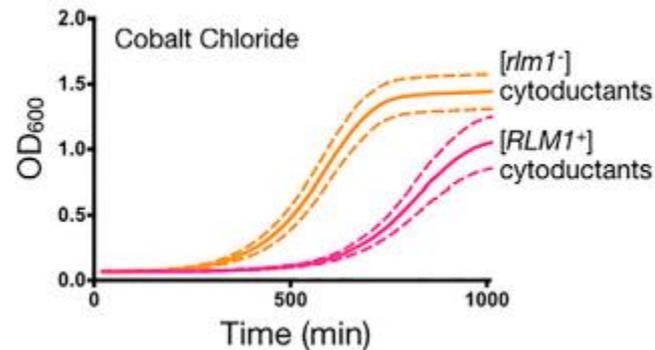
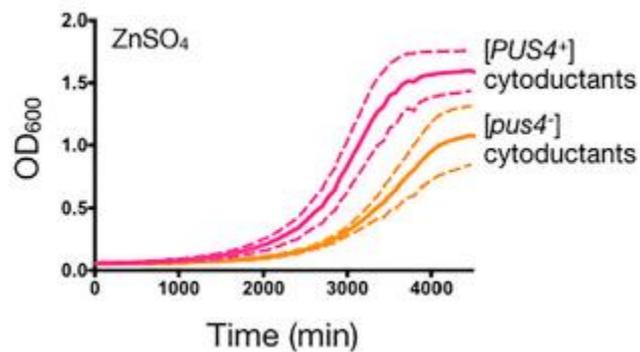


Figura 1C

✓ Confere as características de herança não mendeliana



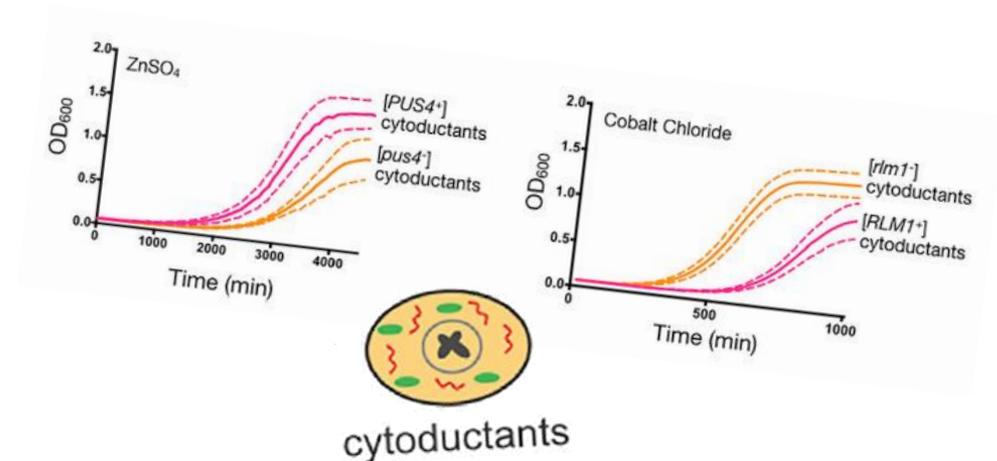
Selecionaram células com marcadores genéticos da cepa receptora, mas que haviam recebido citoplasma do doador (marcado pela função mitocondrial restaurada)



Figuras S2A e S2B, respectivamente

Conclusão

Dada a sua herança citoplasmática não-mendeliana e forte dependência da atividade de chaperona, conclui-se que muitos dos estados fenotípicos hereditários surgem de mecanismos semelhantes aos príons.



Poderiam os príons serem benéficos?

Table 1 | **Classification of the human prion diseases**

| Aetiology | Phenotype | Frequency |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sporadic | | |
| Apparently random distribution with an annual incidence of 1–2 per million worldwide | Sporadic CJD: multiple distinct prion strain types associated with distinct clinicopathological phenotypes; rarely associated with sporadic fatal insomnia | 85% |
| Inherited | | |
| Autosomal dominant with high penetrance; all are associated with <i>PRNP</i> -coding mutations | Highly variable: more than 30 mutations identified; includes GSS disease, familial CJD and fatal familial insomnia phenotypes | ~10–15% |
| Acquired | | |
| Iatrogenic exposure to human prions from medical contact with human cadaveric-derived pituitary hormones, tissue grafts or contaminated neurosurgical instruments | Iatrogenic CJD: typical CJD phenotype following direct CNS exposure; ataxic onset following peripheral infection | <5% (most patients from USA, UK, France and Japan) |
| Dietary exposure to human prions through endocannibalism | Kuru | Only in a small area of Papua New Guinea; epidemic in the 1950s, with a gradual decline after the cessation of cannibalism |
| Environmental exposure (presumed to be dietary) to the BSE prion strain | Variant CJD | Mainly in the UK (total so far ~150), 6 in France, individual patients in several other countries |

BSE, bovine spongiform encephalopathy; CJD, Creutzfeldt–Jakob disease; GSS, Gerstmann–Sträussler–Scheinker; *PRNP*, the gene that encodes the prion protein.

A maioria dos estados fenotípicos identificados foram benignos nas condições que usamos para isolá-los.

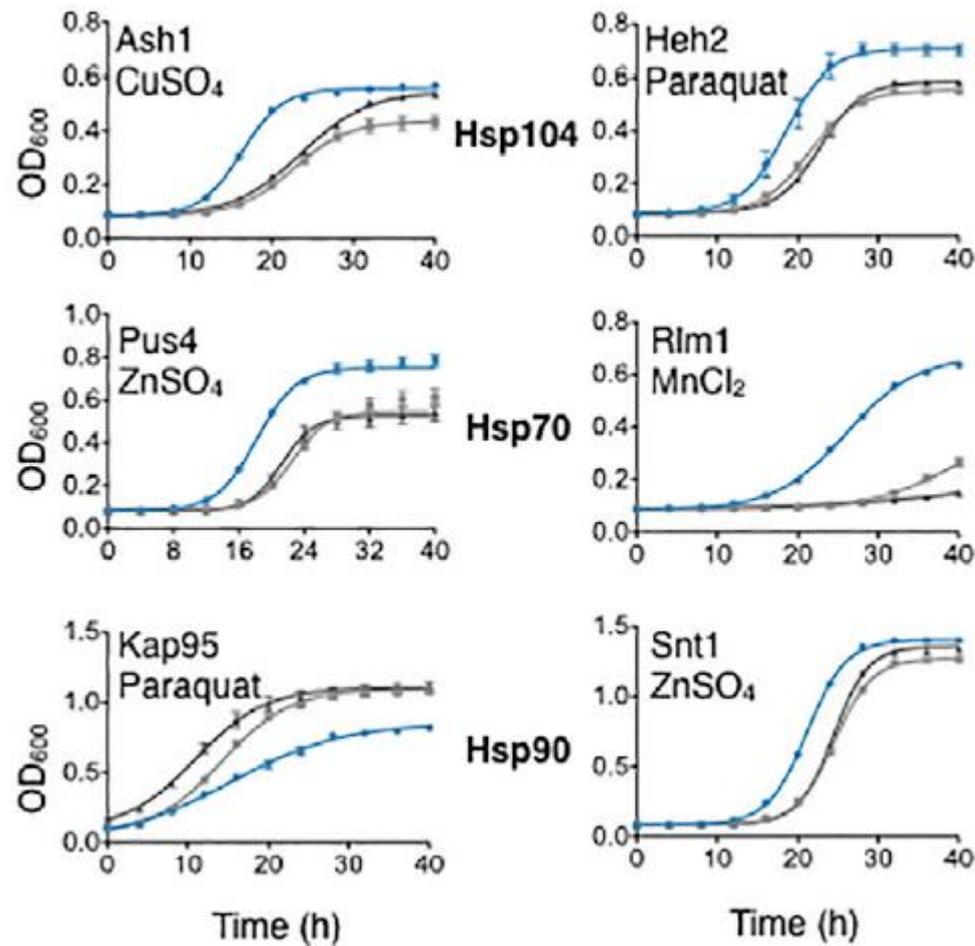


Figura 1B

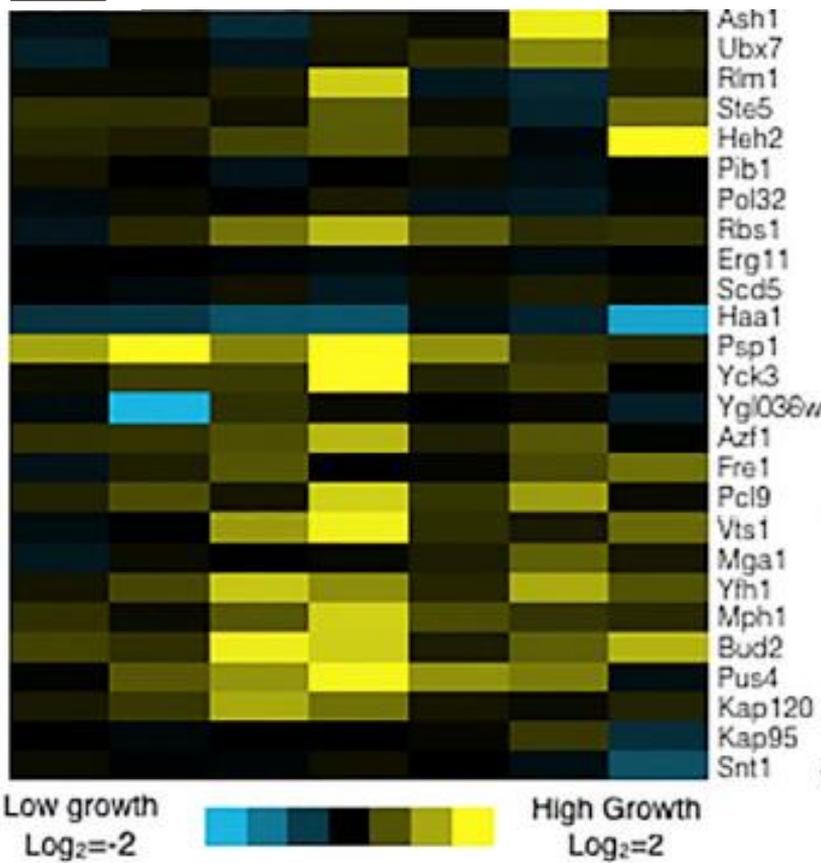
Questionou-se a possibilidade de possuírem um valor adaptativo em outros ambientes

Desafiaram as células que contêm os estados epigenéticos priônicos com seis novos estresses:

- 1) **Osmotic stress (0.5MNaCl)**
- 2) **Ethanol (5%)**
- 3) **Heat (39°C)**
- 4) **Acid stress (pH 4)**
- 5) **Basic stress (pH 9)**
- 6) **Membrane stress (1 mM cetylpyridinium chloride)**

NO
STRESS

Osmotic stress
Ethanol
Heat
Acid stress
Basic stress
Membrane stress



Stable Phenotypic States

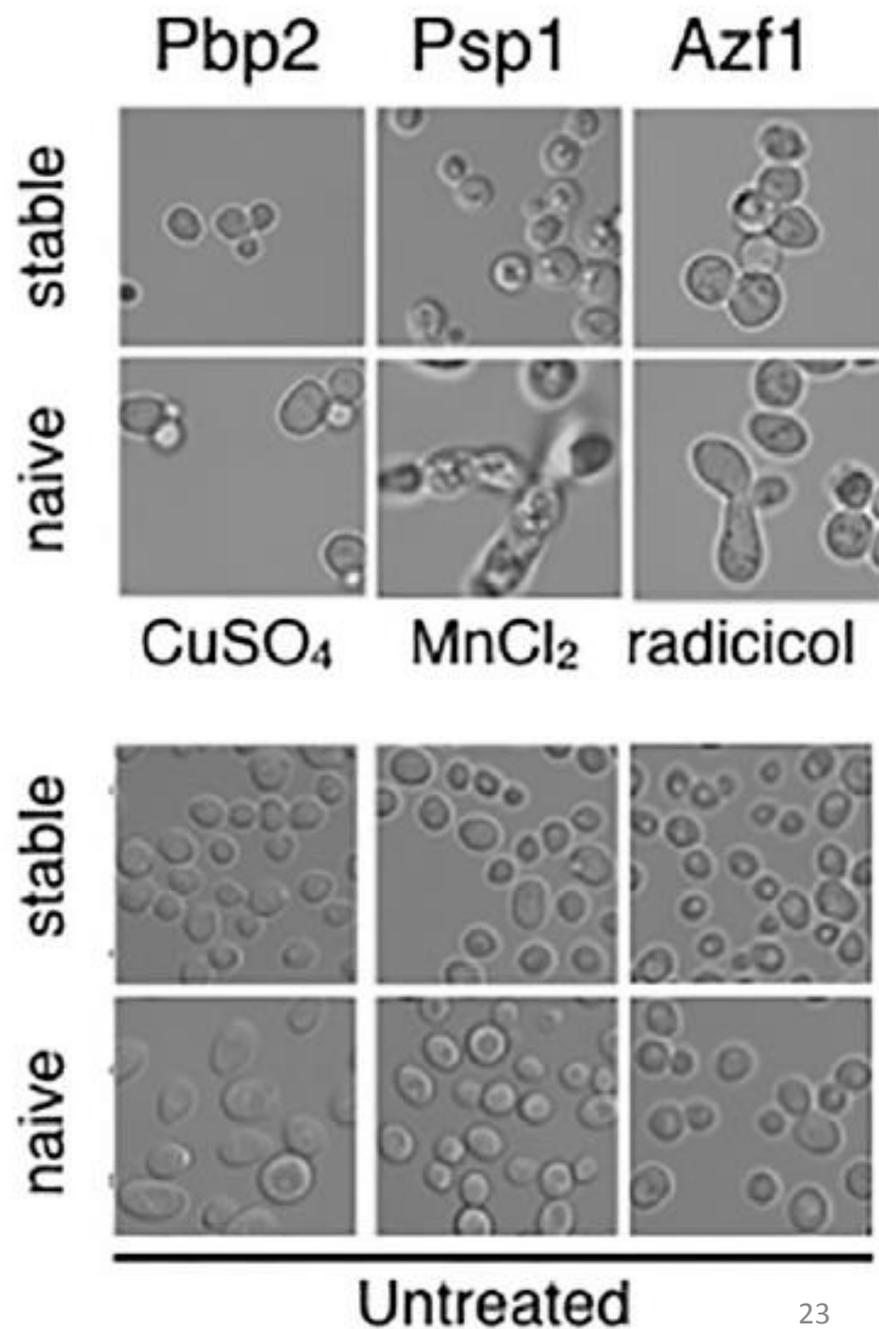
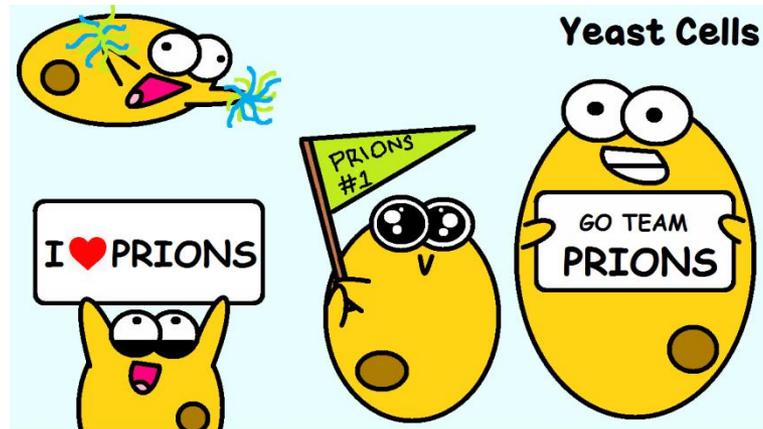


Figura 2A e 2B

Conclusão

Estados de prion foram muito benéficos as células.



CPEB e Het-s

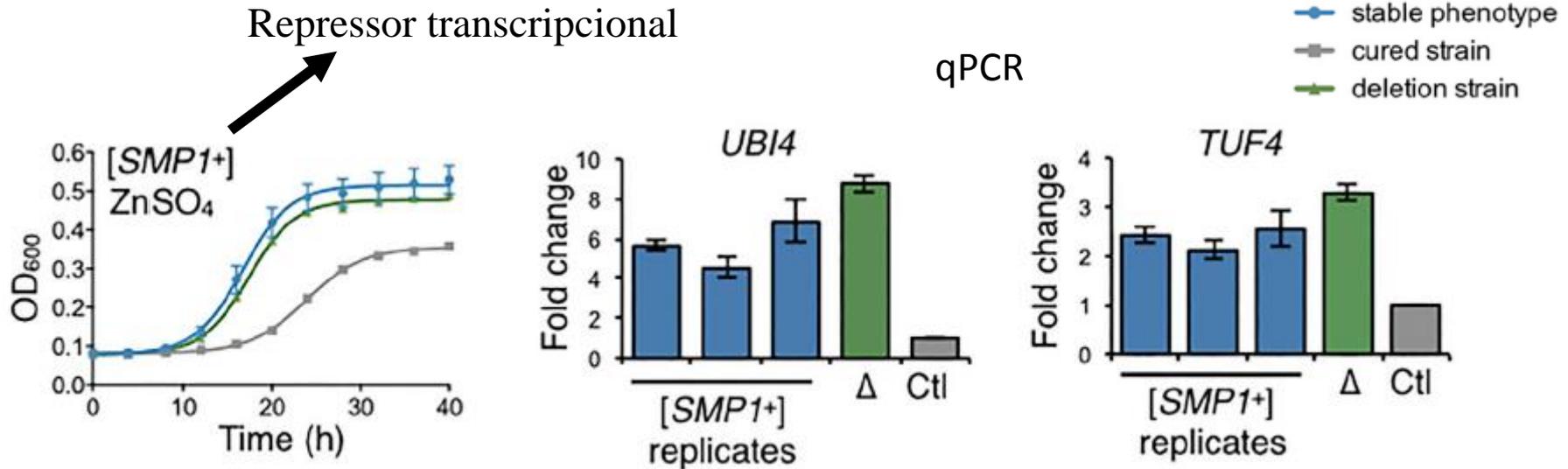
Testaram se os traços identificados foram devidos a ganhos ou perdas de função em:

células que continham estados epigenéticos tipo prion

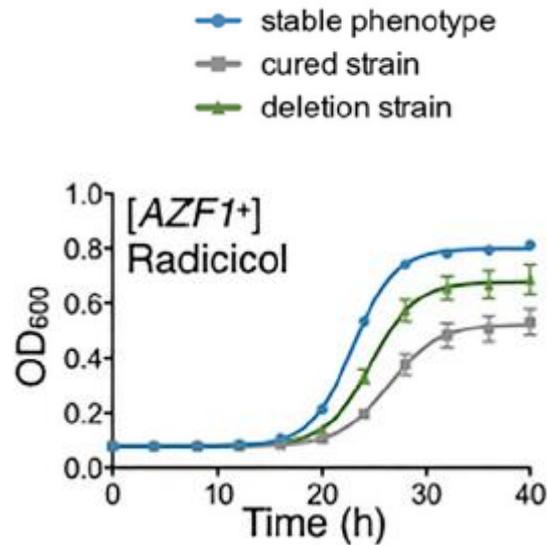
X

células que a proteína indutora foi deletada

1) Se a proteína em seu estado príon **perde sua função original**, e o fenótipo observado nessas células é semelhante a células que **não expressam a proteína**, quer dizer que o estado fenotípico foi devido a **perda de função**.



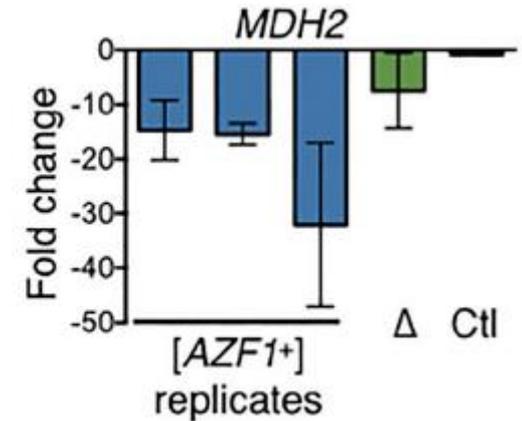
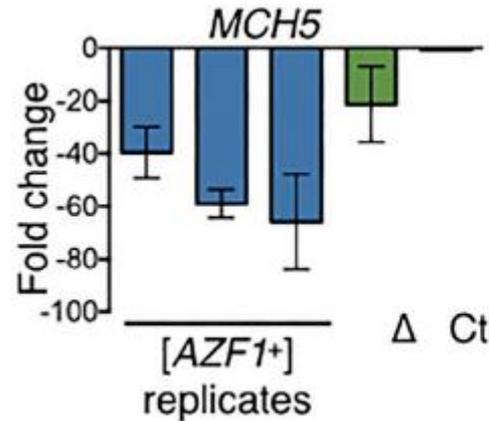
Entre as **15 deleções** das proteínas indutoras de estados epigenéticos tipo príon, **7** tiveram este comportamento (**perda de função**)



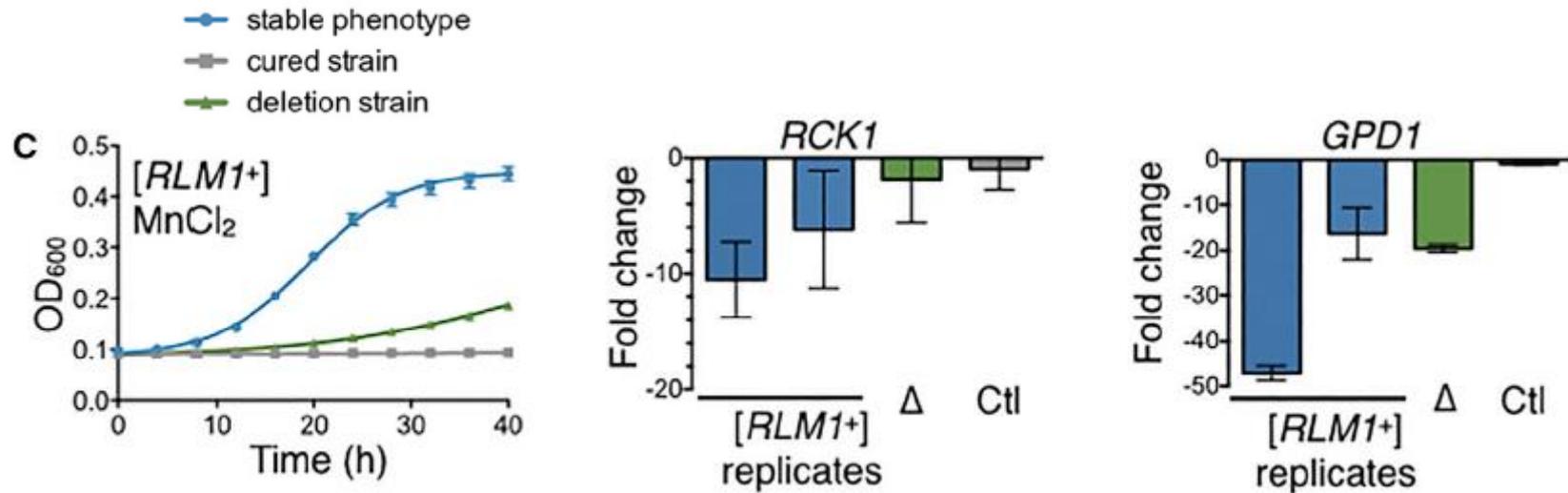
Será que o estado epigenético hereditário levou à repressão de transcrições reguladas por Azf1?



A redução nos níveis de transcrição mensurados por qPCR foi maior do que nas células $\Delta azf1$



4 foram relacionadas a (ganho de função)



Os 3 estados epigenéticos hereditários restantes produziram vantagens adaptativas não relacionadas à deleção de suas proteínas indutoras

Conclusão

Existem estados epigenéticos semelhantes a príon que conferem ganhos e outros perdas de função.

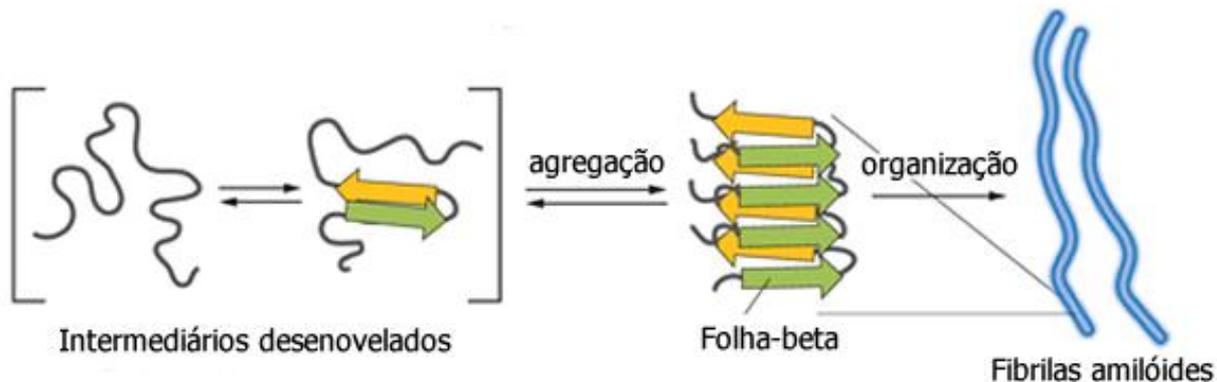
Mas a relação entre os três fenótipos restantes e as proteínas que os induzem permanecem incertas.

Como os dados estabeleceram que as proteínas superexpressadas poderiam atuar como elementos tipo prion...

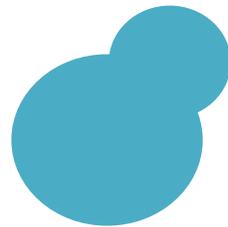
Investigou-se suas características bioquímicas



Capacidade de formar fibrilas amilóides



Marcou-se cada ORF de 8 diferentes células que continham estados representativos de prions de forma endógena com GFP no seu C terminal



[PRION+]

X



Células que expressam variantes de suas proteínas indutoras +GFP

Controle negativo



X



Células
ingênuas

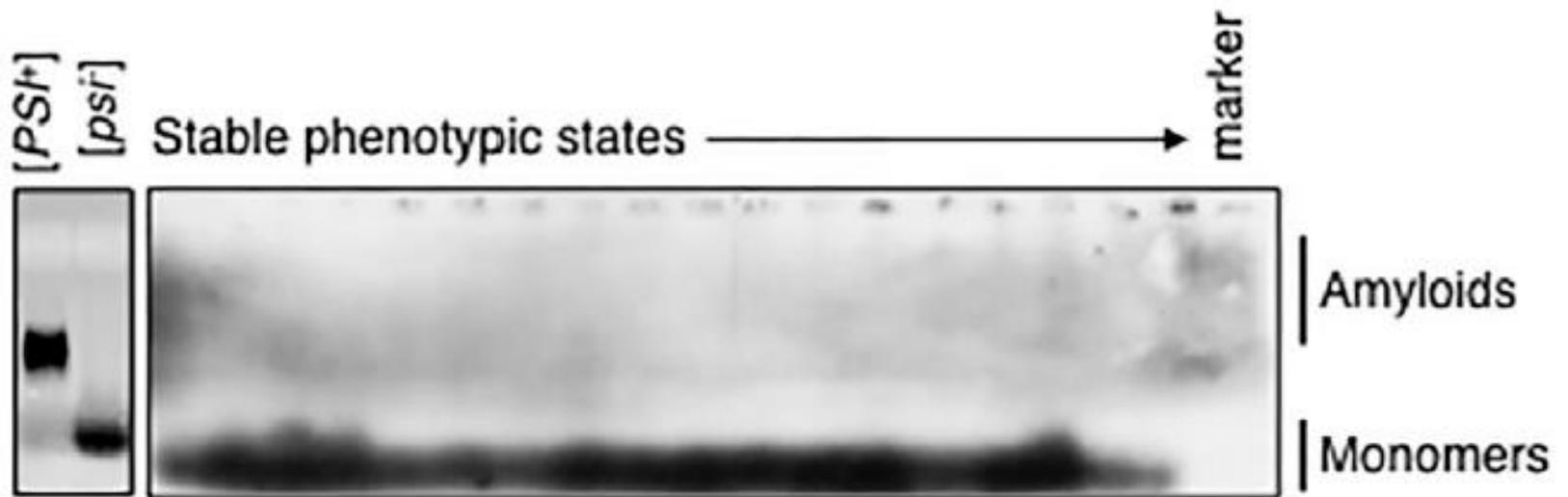


Figure 4. Proteins that Induce Phenotypic States Do Not Form Amyloid Fibers

(A) Immunoblot of SDD-AGE run of lysates from diploid cells harboring stable phenotypic states and expressing integrated GFP-tagged copies of their inducing proteins at 18 hr exposure. $[PSI^+]$ shows robust signal (at 30 min exposure). The first three lanes of the blot contain three independent isolates of the $[PSP1^+]$ prion, followed by $[psp1^-]$, $[SPC110^+]$, $[spc110^-]$, $[HAA1^+]$, $[haa1^-]$, $[HEH2^+]$, $[heh2^-]$, $[BUD2^+]$, $[bud2^-]$, $[RBS1^+]$, $[rbs1^-]$, $[VTS1^+]$, $[vts1^-]$, $[MPH1^+]$, and $[mph1^-]$.

Localização das proteínas de fusão GFP em diploides que continham os estados semelhantes a príons

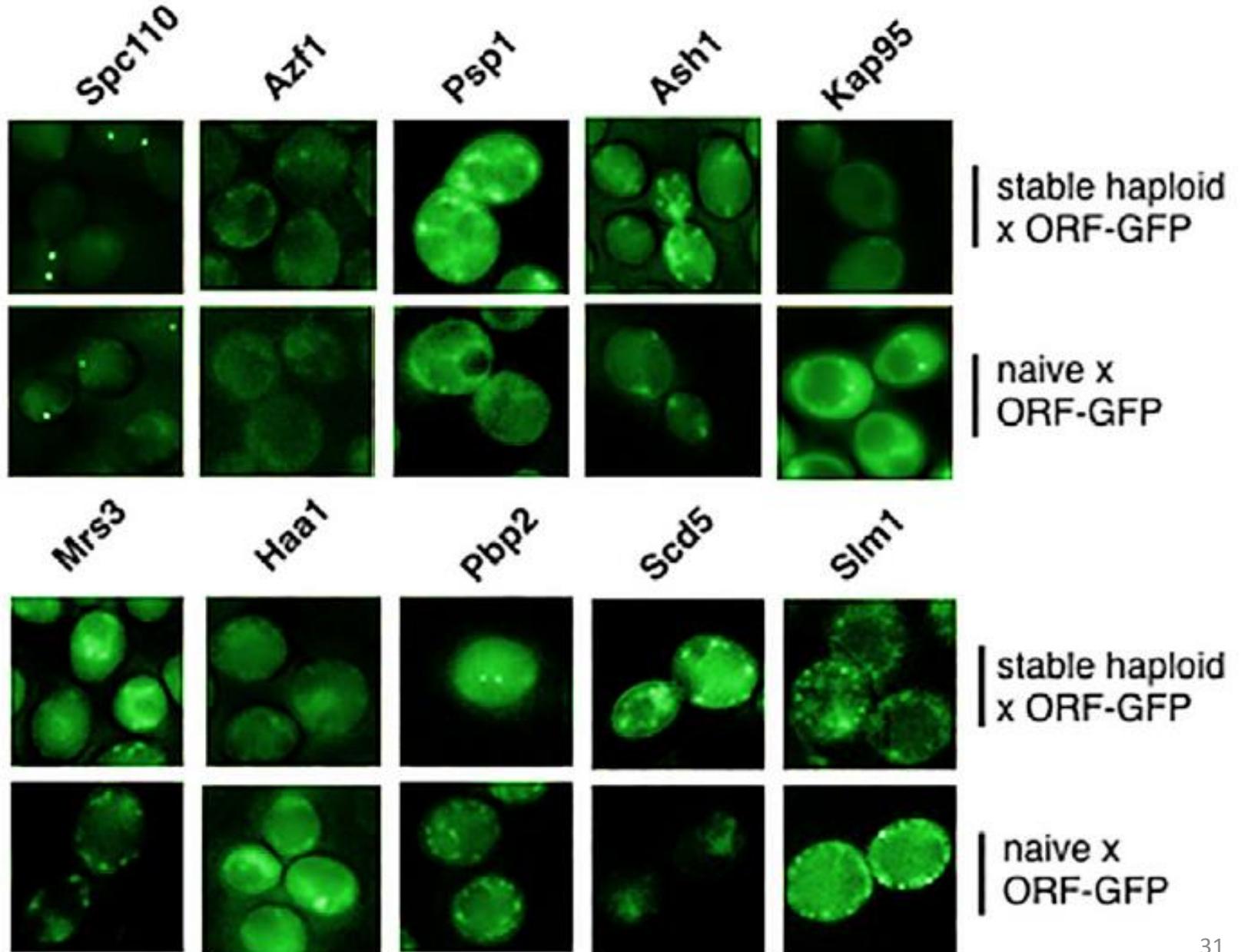
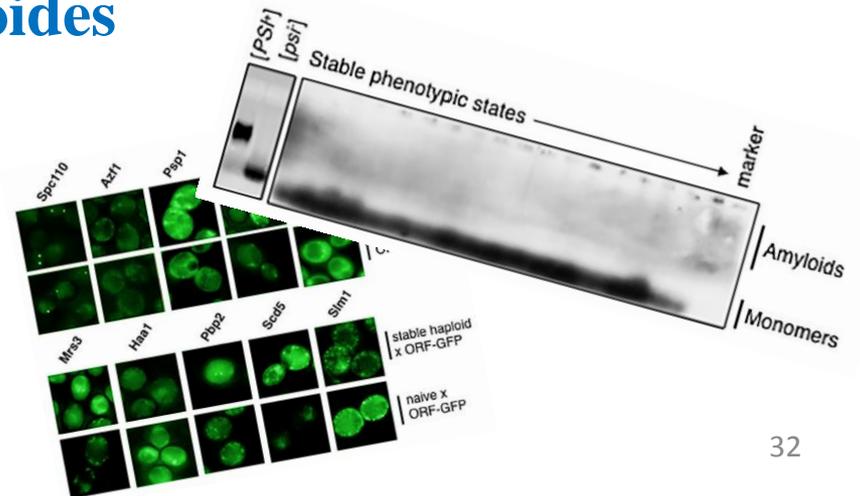


Figura 4B

Conclusão

- Nenhuma célula que continha estados fenotípicos tipo prion apresentou amilóides
- No entanto, muitos apresentaram sinal ou localização de proteínas alterado em comparação aos controles ingênuos

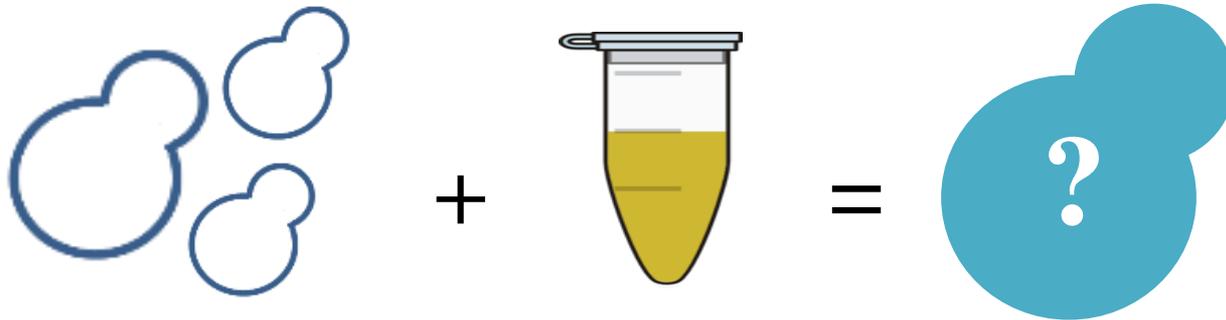
Prions não necessariamente formam fibras amiloides



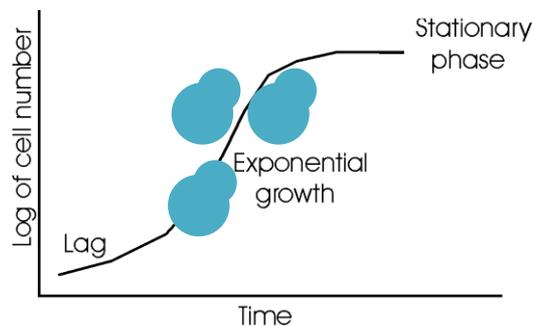
Teste "padrão de ouro" para herança baseada em príons



Transformação de células ingênuas com proteína isolada

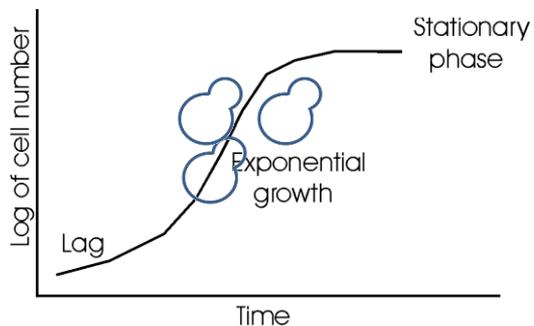


[AZF1+], [RLM1+] e [PSP1+]



Lise
Lavaram, sonicaram,
centrifugaram...

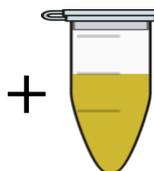
DNase
RNase



Zimoliase

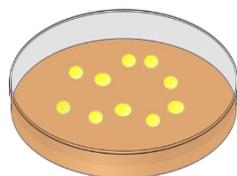


Plasmídeo portador contendo URA3 como
controle de transformação +



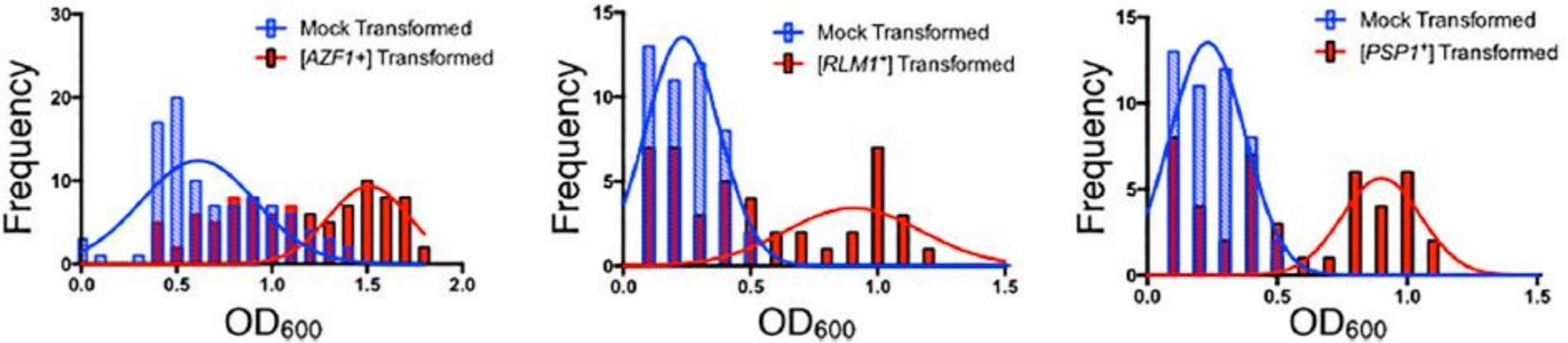
Transformação

DNA de esperma
de salmão



Colônias URA+

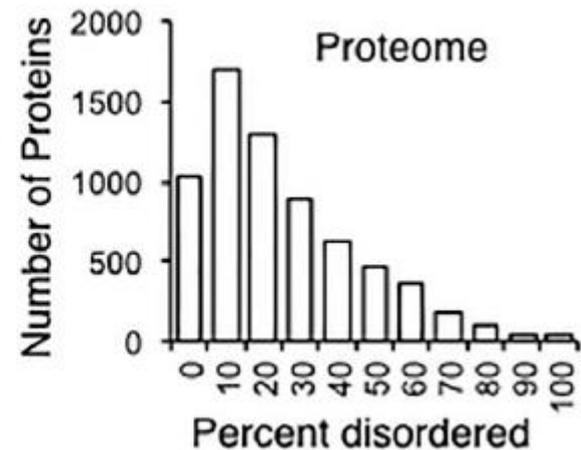
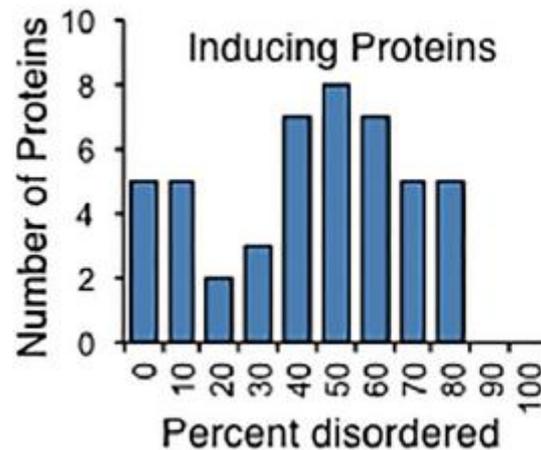
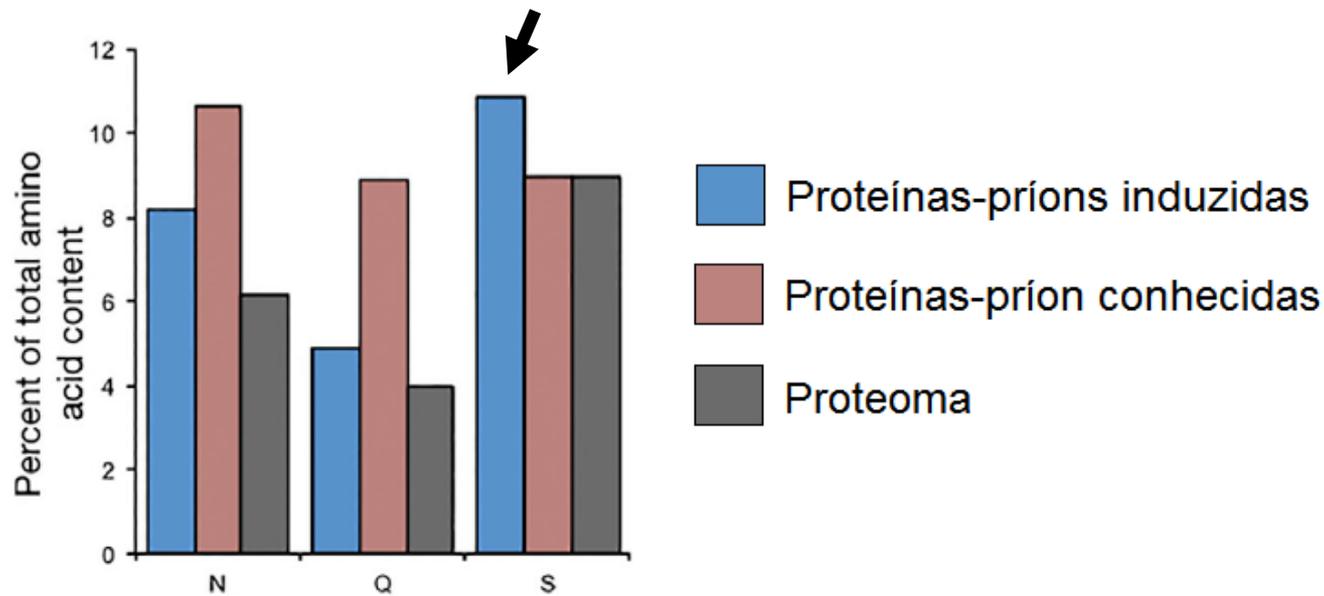




1. 53% das células transformadas com lisados [PSP1⁺] adquiriram o fenótipo [PSP1⁺] (resistência a MnCl₂);
2. 48% das células que foram transformadas com lisados [AZF1⁺] adquiriram o fenótipo [AZF1⁺] (resistência ao radicicol)
3. 50% das células que foram transformadas com lisados [RLM1⁺] das células adquiriram o fenótipo [RLM1⁺] (resistência a MnCl₂)

Conclusão

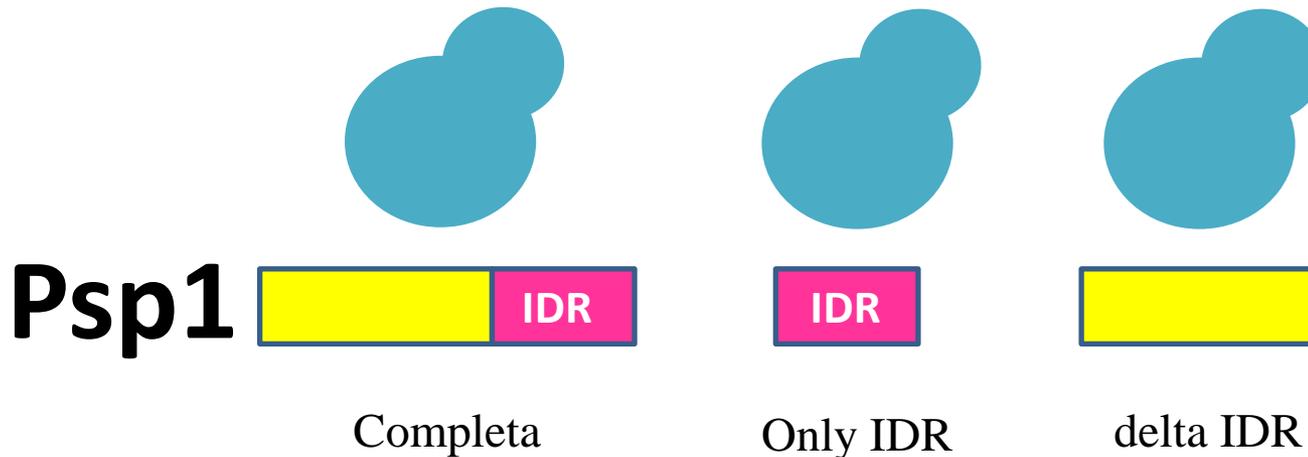
- As células que foram transformadas com os lisados [prion⁻] não apresentaram fenótipos [PRION⁺]
- Esta eficiência é extraordinariamente alta, dado os baixos níveis de expressão dessas proteínas:
 - ~50 moléculas por célula para Azf1 e Rlm1;
 - ~340 moléculas por célula para Psp1.
- As "memórias" independentes de Hsp104 que descobriram podem atuar como príons benéfico e constituem uma família de elementos genéticos baseados em proteínas, notavelmente robustas



Será que as regiões intrinsecamente desordenadas (IDR) nas proteínas indutoras que foram descobertas podem ter uma função análoga à das sequências ricas Q/N moduladas em príons canônicos?

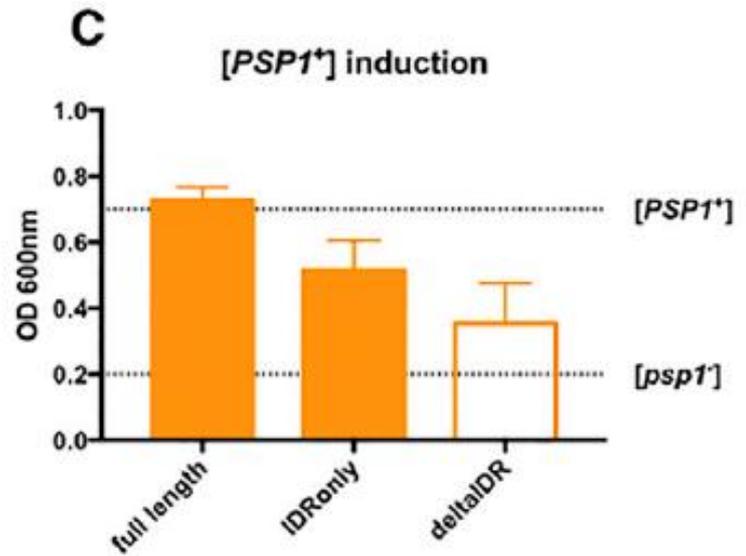
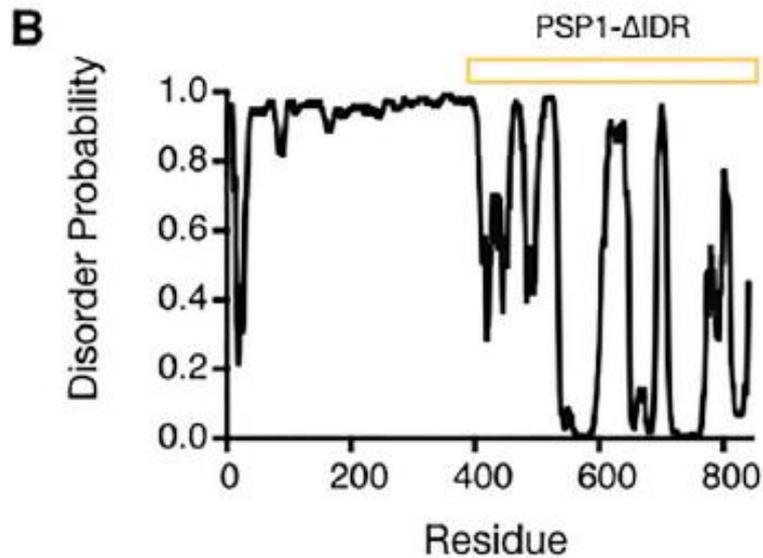
Figura S6A e 7A, respectivamente

Em células de natureza selvagem ingênuas, induziram de forma transitória:



Testaram se essas construções poderiam provocar o estado fenotípico esperado: [PSP1⁺] - resistência a manganês

regiões intrinsecamente desordenadas (IDR)

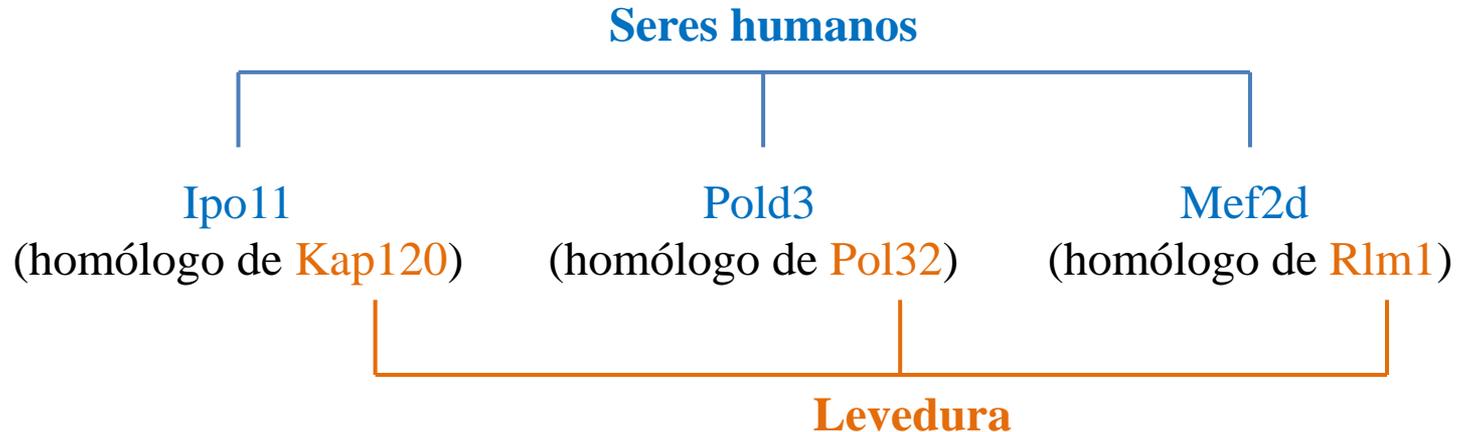


Conclusão:

IDRs foram importantes para induzir os estados fenotípicos

Será que esses padrões de comportamentos relacionados a príons ocorrem em proteínas tipo príons homólogas de seres humanos?

Transformou-se células de levedura com variantes marcadas com GFP sob o controle de um promotor de galactose induzível de:

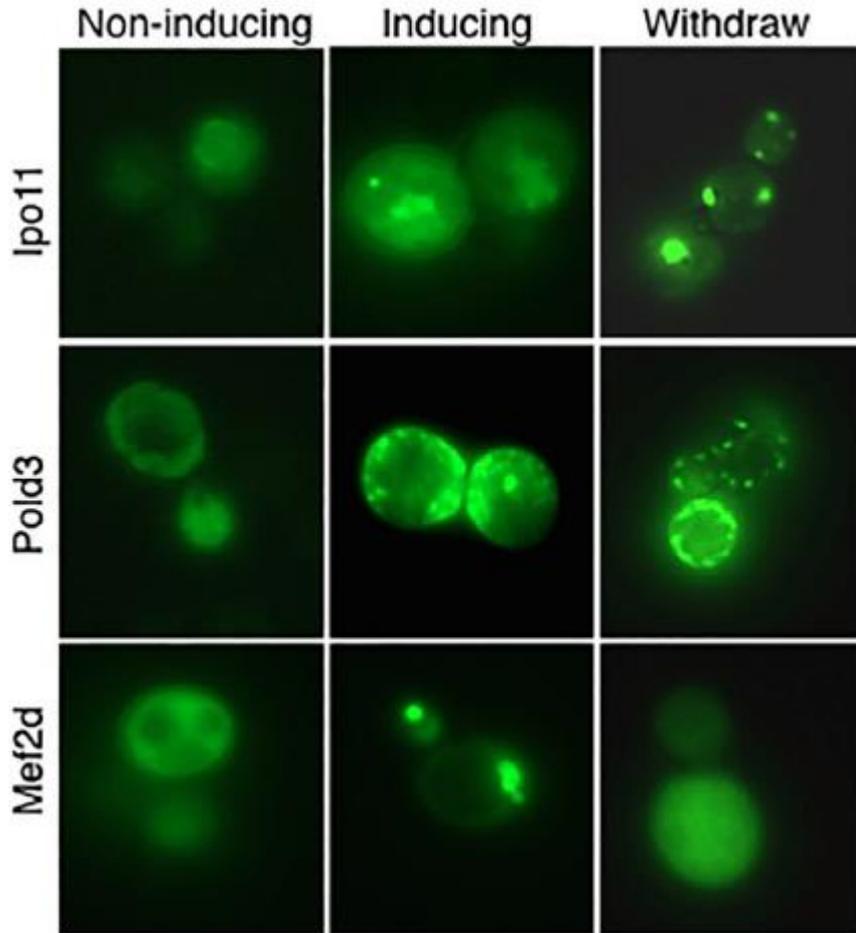


Examinou-se seus padrões de localização

(rafinose)

(galactose)

(células diluídas
e crescidas em meio -gal)

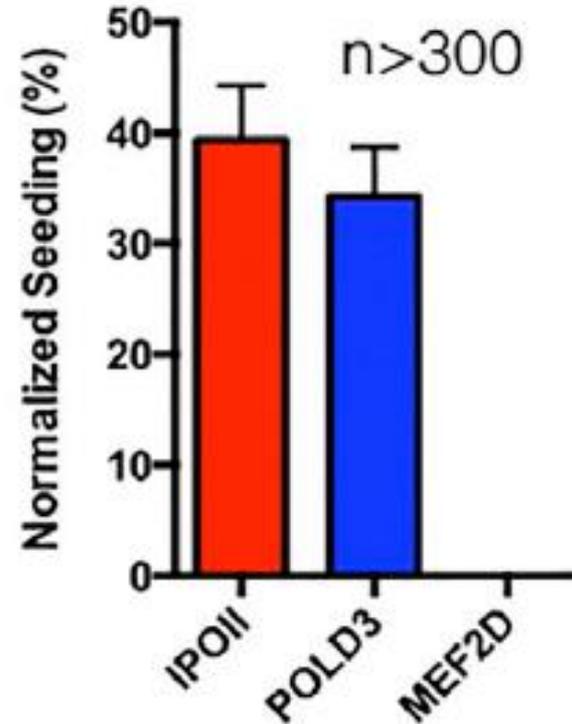


Difusa

Focos

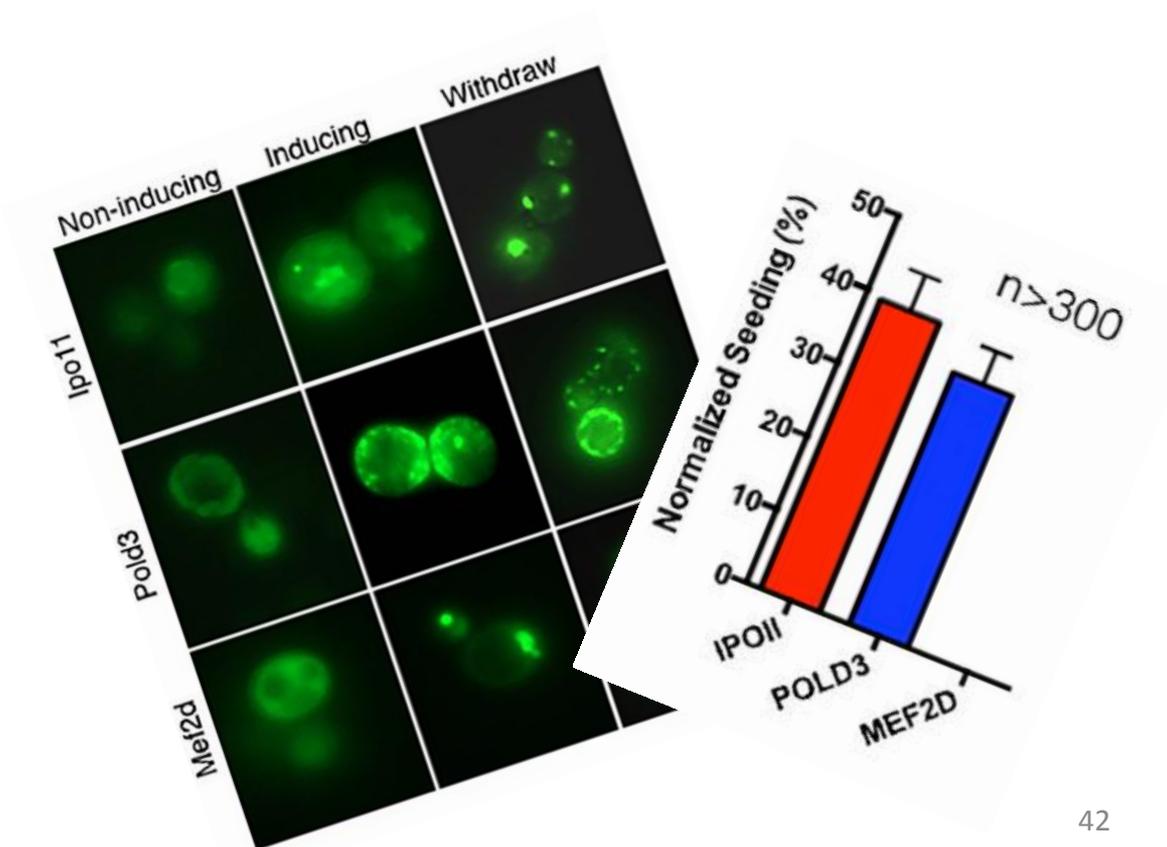
Foi passado
a progênie?

**Diluiu-se as células 200 vezes e as
aumentamos até 48 horas em
condições de baixa expressão**



Conclusão

Para pelo menos algumas das proteínas indutoras, a capacidade de adotar um estado molecular hereditário e alterado foi conservado de levedura para homem.



Discussão e Conclusão

- Muitas proteínas eucarióticas têm a capacidade de induzir estados fenotípicos hereditários
- As proteínas tipo príon identificadas são fatores de transcrição e proteínas de ligação a RNA
 - Contém padrões distintos de sequências ordenadas e desordenadas intercaladas
- Traços produzidos por este modo de herança foram benéficos
- Seus mecanismos de propagação são diferentes
 - A maioria é independente do Hsp104

Discussão e Conclusão

- A herança baseada em proteínas é mais difundida do que se acreditava anteriormente e poderia desempenhar um papel fundamental na evolução
- *"Nossos dados estabelecem assim um novo e comum tipo de memória molecular baseada em proteínas intrinsecamente desordenadas, o qual podem gerar o surgimento de novos traços e oportunidades adaptativas"*
- O termo epigenética implica memória em que:
 - "um sinal ou evento transitório desencadeia uma resposta que é então perpetuada na ausência do sinal original". (Ptashne, 2013)