

ПРИОНЫ

©2006 г. И. С. ШКУНДИНА, М. Д. ТЕР-АВАНЕСЯН

*ФГУ Российский кардиологический научно-производственный
комплекс Росздрава, Москва*

I. Введение II. Прионы – инфекционные агенты нового типа. III. Штаммы прионов. IV. Механизмы прионного перехода. V. Прионы низших эукариот. VI. Прион [URE3] *S. cerevisiae*. VII. Прион [Het-s] *P. anserina*. VIII. Прион [PSI⁺] *S. cerevisiae*. IX. Возникновение [PSI⁺] *de novo*, прион [PIN⁺]. X. Роль шаперонов в возникновении и наследовании прионов у дрожжей. XI. Межвидовые барьеры передачи прионных свойств Sup35 и механизмы изгнания [PSI⁺]. XII. Варианты [PSI⁺]. XIII. Структура амилоидных фибрилл. XIV. Распространенность прионов в природе. XV. Перспективы лечения прионных заболеваний. XVI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Прионные заболевания животных и человека относят к «конформационным» болезням. Болезни этого типа вызваны нарушением процессов формирования пространственной структуры некоторых белков, приводящим к изменениям клеточной физиологии. Наряду с прионными болезнями к «конформационным» также относят амилоидные заболевания, такие как болезни Альцгеймера, Хангтингтона и Паркинсона. При амилоидных и прионных заболеваниях происходит вне- или внутриклеточное накопление белковых агрегатов фибриллярной структуры, состоящих из растворимых в норме клеточных белков.

Термин прион появился в конце XX века, однако прионные болезни, например скрэпи овец, были известны уже в середине XVIII века. Прионные болезни – это губчатые энцефалопатии млекопитающих, такие как бычья губчатая энцефалопатия или коровье бешенство,

Принятые сокращения: *prion* – proteinacious infectious particle; PrP – прионный белок; PrP^C – нормальная форма прионного белка; PrP^{Sc} – инфекционная форма прионного белка; PrP^{res} – инфекционная форма прионного белка, образуемая *in vitro*; *Prnp* – ген, кодирующий PrP; PrD – прионный домен; ГХГ – гидрхлорид гуанидина; SDS – додецилсульфат натрия; OPC – открытая рамка считывания; а.к. – аминокислота.

Адрес для корреспонденции: mdter@cardio.ru

Работа поддержана грантами РФФИ № 05-04-48313 и МНТЦ № 2750.

скрэйпи овец и некоторые нейродегенеративные заболевания человека – болезни Крейтцфельда-Якоба и Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, семейная фатальная бессонница и куру. Все прионные заболевания на сегодняшний день являются смертельными. Они могут быть наследственными (примерно 15% случаев), приобретенными (<1% случаев) и спорадическими (85% случаев), но независимо от этиологии заболевания оно может быть передано инфекционным путем. Инфекционность прионных заболеваний впервые была показана Р. Чандлером [24], заразившим лабораторных мышей болезнью овец – скрэйпи, позднее К. Гайдушеком, которому удалось передать шимпанзе заболевание человека – куру [66]. Заражение прионами человека и животных обычно происходит при употреблении в пищу мяса и особенно мозга больного или ятрогенным путем, то есть через недостаточно стерилизованные нейрохирургические инструменты. Экспериментально заражение производится путем введения гомогената мозга больного животного здоровому – интраперитонеально или интрацеребрально.

II. ПРИОНЫ – ИНФЕКЦИОННЫЕ АГЕНТЫ НОВОГО ТИПА

Природа инфекционного агента, вызывающего прионные заболевания, долгое время оставалась неизвестной. В 1966 г. было обнаружено, что агент, вызывающий скрэйпи, обладает необычными свойствами: устойчив к ионизирующей радиации и ультрафиолету [4]. Это поставило под сомнение популярную в то время гипотезу о том, что скрэйпи вызывается вирусом. В 1967 г. Д. Гриффит [70] высказал предположение, что инфекционный агент не содержит генетического материала, а представляет собой измененную форму одного из клеточных белков, самоподдерживающуюся за счет автокаталитического механизма. В начале 80-х годов С. Прузинер с соавторами выделили и очистили агент, вызывающий скрэйпи, из мозга больных животных и описали его свойства. Выяснилось, что он устойчив к нагреванию, сохраняет активность после обработки протеиназой К, мочевиной, хаотропными солями, SDS и агентами, повреждающими ДНК – нуклеазами и псораленами. Было также обнаружено, что данный инфекционный агент чувствителен к ионизирующей радиации в присутствии кислорода, то есть проявляет свойства, характерные для гидрофобных белков, связанных с липидами [130].

Агент, вызывающий скрэйпи, получил название «прион» (*prion* – *proteinacious infectious particle*). Этот агент представляет собой белок, названный PrP (Prion Protein). На основании определения первичной

структуры белка PrP был идентифицирован кодирующий его ген, названный *Prnp* [28, 111]. Ген *Prnp* присутствует в геноме всех млекопитающих, а также у птиц [65] и рыб [133].

PrP является мембранным белком, который в основном экспрессируется в клетках центральной нервной системы и лимфоретикулярной ткани. Нормальная форма белка PrP обозначается PrP^C. Патологическая форма этого белка, обуславливающая инфекционность, была названа PrP^{Sc} (форма PrP, связанная со scrapie). PrP^{Sc} неотличим от PrP^C по аминокислотной последовательности [149], но имеет другую конформацию. Пространственная структура рекомбинантного PrP^C впервые была определена методом ядерного магнитного резонанса [132]. Аминоконцевой район белка PrP^C в растворе не структурирован, его карбоксиконцевая часть формирует глобулу и состоит из трех α -спиралей и короткого участка с β -структурой. Было обнаружено, что PrP^C содержит 42% α -спиралей и 3% β -структур, тогда как PrP^{Sc} содержит 30% α -спиралей и 43% β -структур [115]. Вследствие этого предположили, что *приобретение инфекционных свойств белком PrP связано с конформационным переходом, при котором происходит образование β -складчатого слоя*. В отличие от нормальной формы PrP, его патологическая форма устойчива к протеиназе К. В результате обработки PrP^{Sc} протеиназой К образуется протеазоустойчивый фрагмент [105] с молекулярной массой 27–30 кДа (молекулярная масса PrP варьирует от 33 до 35 кДа в зависимости от степени гликозилирования). Выявление протеазоустойчивого фрагмента PrP^{Sc} с молекулярной массой 27–30 кДа после обработки протеиназой К соскоба ткани миндалевидных желез до сих пор используется при диагностике прионных заболеваний.

На основании имевшихся к 1982 г. экспериментальных данных С. Прузинер сформулировал прионную концепцию [129]. Эта концепция подразумевала следующее:

- инфекционным агентом является белок PrP^{Sc},
- инфекционный агент PrP^{Sc} может реплицировать себя в отсутствие нуклеиновой кислоты,
- превращение белка из нормальной формы (PrP^C) в инфекционную (PrP^{Sc}) происходит путем конформационного перехода,
- конформационный переход PrP^C в PrP^{Sc} может происходить спонтанно, приводя к спорадическим формам прионных болезней. Он может быть вызван поступлением в организм патологической формы PrP^{Sc} извне (приобретенные формы прионных заболеваний). Наконец, переход может произойти из-за мутаций в гене *Prnp*, способствующих образованию PrP^{Sc} из PrP^C (наследственные формы прионных заболеваний).

К настоящему времени концепция прионов получила убедительные экспериментальные подтверждения. Если размножение PrP^{Sc} после попадания в организм происходит путем наведения патологической конформации на PrP^C, то организмы, лишенные PrP^C, должны быть устойчивы к прионной инфекции. Это и было показано с использованием трансгенных мышей, гомозиготных по делеции гена *Prnp* (*Prnp*^{0/0}). Введение гомогената мозга мышей, больных скрэйпи, трансгенным мышам *Prnp*^{0/0} не приводило к развитию болезни ввиду отсутствия нормального PrP^C [20]. Более того, оказалось, что в отсутствие PrP^C не происходит не только репликации приона, но и повреждения нервной ткани [17]. PrP^C также необходим для транспорта инфекционного агента периферическими нервами к центральной нервной системе [13, 67].

Окончательное доказательство концепции прионов долгое время сдерживалось невозможностью получения значительного количества PrP^{res} – формы PrP^{Sc}, образуемой *in vitro*, которая устойчива к частичному протеолизу и способна вызывать болезнь при введении экспериментальным животным. Недавно было показано, что фрагмент рекомбинантного PrP мыши с 89 по 231 а.к., экспрессированный в *Escherichia coli*, образует амилоидные фибриллы *in vitro*, которые при введении трансгенным мышам, экспрессирующим этот же фрагмент PrP, приводят к развитию неврологической картины прионного заболевания [93].

Разработка системы циклической амплификации прионной формы белка PrP [134], с помощью которой возможно формирование значительного количества PrP^{res} *in vitro*, позволила получить и продемонстрировать ее инфекционность [21]. Начальной матрицей для образования белка PrP^{res} служил PrP^{Sc} – патологический белок из гомогената мозга хомяков, зараженных скрэйпи. Инкубация минимального количества PrP^{Sc} (гомогенат мозга хомяков, больных скрэйпи, разводили в 10⁴ раз) с избытком PrP^C приводила к образованию агрегатов PrP^{res}. Агрегаты PrP^{res} разрушали ультразвуком на более мелкие, разводили в 10 раз суспензией, содержащей избыток PrP^C, и инкубировали снова. В результате много раз повторенного циклического процесса, включающего инкубацию PrP^{res} с PrP^C, разрушение агрегатов ультразвуком и последующее разведение, достигалось уменьшение содержания исходного инфекционного агента в реакционной смеси от 10⁴ раз (в первом цикле) до 10⁵⁵ раз (в заключительном). Образование PrP^{res} в первом цикле происходило на матрице PrP^{Sc}, в последующих циклах превращению PrP^C в инфекционную форму способствовал PrP^{res}, полученный *in vitro*. Биохимические и структурные свойства PrP^{res} оказались такими же, как свойства PrP^{Sc}, изолированного из мозга

больных животных. Интрацеребральное введение PrP^{res} здоровым хомякам индуцировало у них скрэппи и приводило к смерти. Гистологический анализ мозга умерших животных показал губчатую дегенерацию нервной ткани, неотличимую от таковой у животных, зараженных PrP^{Sc}, образованным *in vivo*. Однако оказалось, что PrP^{res} гораздо менее инфекционен, чем патологический белок, продуцируемый *in vivo*. Причины таких различий в инфекционности пока не выяснены. Метод циклической амплификации прионного инфекционного агента эффективен для диагностики губчатых энцефалопатий человека, поскольку позволяет детектировать PrP^{Sc} в тканях и биологических жидкостях человека на ранних стадиях развития болезни.

Передача прионной инфекции между видами млекопитающих ограничена межвидовыми барьерами [120]. Губчатые энцефалопатии передаются между особями одного вида или особям близкородственных видов. Например, болезнь Крейтцфельда-Якоба передается от человека человеку, и от человека шимпанзе; скрэппи же передается среди овец и коз, но не передается шимпанзе. Также неизвестны случаи заражения скрэппи человека [127]. В то же время межвидовые барьеры не абсолютны. Например, возможно заражение хомяков скрэппи и коз болезнью Крейтцфельда-Якоба. Межвидовые барьеры могут выражаться не столько в невозможности передачи инфекции животным отдаленного вида, сколько в удлинении инкубационного периода, а также в том, что заболевают не все, а какая-то часть экспериментально зараженных животных [31]. Считается, что межвидовые барьеры вызваны различиями в первичной структуре PrP у млекопитающих разных видов. Подтверждением этому послужили следующие наблюдения. Трансгенные мыши, экспрессирующие PrP хомяка, оказались высокочувствительны к заражению прионами хомяка в отличие от мышей дикого типа [131]. Передача болезни Крейтцфельда-Якоба от человека мышам ограничена межвидовым барьером, однако трансгенные мыши, экспрессирующие PrP человека, подвержены заражению этой болезнью [33]. Впоследствии выяснилось, что передача прионной инфекции ограничена не только отличиями в первичной структуре белка PrP, но и штаммовой принадлежностью приона [19, 73].

III. ШТАММЫ ПРИОНОВ

Штаммовое разнообразие является одним из фундаментальных свойств прионов. Оно связано со способностью прионного белка приобретать и наводить различные прионные конформации. Последовательность аминокислот в белке PrP определяет набор конформаций,

которые он может приобрести. Если наборы допустимых конформаций приона у двух различных видов организмов пересекаются, то может происходить преодоление межвидового барьера [73].

Размножаясь, белки PrP с различными конформациями обуславливают разницу в течении прионных заболеваний: возможны различные инкубационные периоды, клинические проявления, повреждения разных участков мозга. Впервые предположение о различных конформационных состояниях приона было высказано при исследовании лабораторных хомяков, зараженных двумя штаммами губчатой энцефалопатии норок: NY и DY. При введении хомякам эти два штамма приводили к различным инкубационным периодам и клиническим симптомам болезни. После частичного протеолиза PrP^{Sc} при помощи протеиназы К, выделенного из мозга хомяков, зараженных штаммами NY и DY, было обнаружено, что молекулярная масса протеазоустойчивого фрагмента приона NY на 2 кДа больше, чем молекулярная масса соответствующего фрагмента приона DY [12]. Это означало, что у прионов NY и DY доступны для протеолиза разные участки полипептидной цепи PrP, и, следовательно, различие между штаммами заключается в разной пространственной укладке PrP^{Sc}. Было показано, что конформации белка PrP, соответствующие штаммам NY и DY, стабильно воспроизводятся *in vitro* [11]. Инкубация PrP^C с препаратами PrP^{Sc}, соответствующими штаммам NY и DY, приводила к превращению PrP^C в PrP^{Sc} с двумя различными конформациями, типичными для штаммов NY и DY. Анализ вторичной структуры PrP^{Sc} штаммов NY и DY выявил, что они отличаются по характеру β-структур [23].

Несколько штаммов PrP^{Sc} и соответствующих им фенотипов было идентифицировано в случае болезни Крейтцфельда-Якоба [34, 116]. Штаммы прионов стабильно поддерживаются *in vivo*. Это означает, что если заразить лабораторных животных разными штаммами PrP^{Sc}, то при развитии болезни у них будет поддерживаться именно тот штамм приона, которым их заразили [153].

В последнее время появились данные о возможной роли гликозилирования PrP в приобретении прионом штаммовой специфичности. PrP – это сиалогликопротеин, имеющий два сайта N-гликозилирования в карбоксиконцевом районе. Наряду с негликозилированной формой существуют моно- и дигликозилированные формы PrP. Анализ большого количества случаев болезни Крейтцфельда-Якоба человека показал, что штаммы приона могут отличаться по степени гликозилирования PrP^{Sc} [34]. Однако до сих пор неизвестно, каким образом гликозилирование влияет на конформацию и патологические проявления PrP^{Sc}.

IV. МЕХАНИЗМЫ ПРИОННОГО ПЕРЕХОДА

На сегодняшний день прионную гипотезу можно считать доказанной. Однако остается неясным механизм превращения $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$. Было предложено несколько моделей прионного перехода.

Согласно гетеродимерной модели [128], прионное состояние при-
суще мономеру белка PrP , и физическое взаимодействие PrP^{Sc} с PrP^{C} катализирует превращение $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ (рис. 1А). При этом спонтанный переход $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ маловероятен из-за высокого энергетического барьера. После осуществления перехода $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ образуются гомодимеры $\text{PrP}^{\text{Sc}}/\text{PrP}^{\text{Sc}}$, которые могут диссоциировать, запуская новые раунды конформационного превращения, или агрегировать. Наличие агрегированной формы белка не обязательно для прионного перехода и рассматривается как вторичное явление, не связанное с конформационной перестройкой как таковой. Существуют экспериментальные данные совместимые с этой моделью [10], но ее нельзя считать доказанной.

Альтернативный механизм прионного перехода рассмотрен в полимеризационной модели [77], согласно которой прионное превращение неотделимо от агрегации, так как прионную конформацию может стабильно поддерживать только олигомер или мультимер PrP . Стадией, лимитирующей скорость перехода $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$, является образование «ядра» – олигомера PrP^{Sc} , являющегося интермедиатом прионного превращения (рис. 1Б). Эта модель допускает существование двух возможных вариантов механизма прионного перехода. Первый вариант прионного превращения предполагает, что PrP^{C} и PrP^{Sc} сосуществуют в термодинамическом равновесии, сдвинутом в сторону PrP^{C} , и PrP^{Sc} образуется до присоединения мономера PrP к «ядру». Стабилизация состояния PrP^{Sc} происходит при присоединении мономера PrP^{Sc} к «ядру» PrP^{Sc} , в результате чего мономер PrP^{Sc} оказывается в составе полимера PrP^{Sc} . Если мономер PrP^{Sc} не присоединяется к «ядру» PrP^{Sc} , происходит обратное превращение $\text{PrP}^{\text{Sc}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{C}}$. Второй вариант полимеризационной модели предполагает, что конформационная перестройка происходит не до, а в момент присоединения мономера PrP^{C} к олигомеру PrP^{Sc} . В пользу полимеризационной модели свидетельствуют эксперименты, показавшие, что конвертирующая активность связана именно с полимерами PrP^{Sc} [22].

Позднее была предложена модель прионного перехода, представляющая собой второй вариант полимеризационной модели с дополнительными допущениями [140]. Было показано существование интермедиатов прионного превращения – олигомерных комплексов, менее структурированных, чем прионные фибриллы и напоминающих

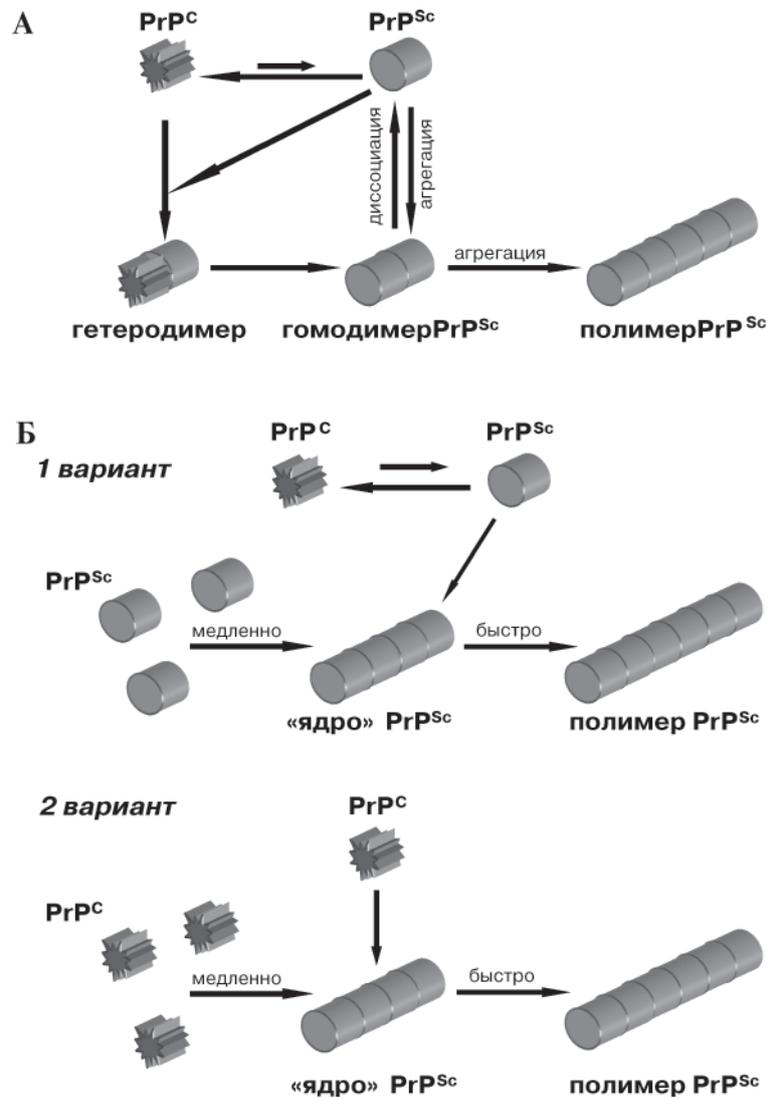


Рис. 1. Модели прионного перехода.

А – гетеродимерная модель.

Б – два варианта полимеризационной модели. Образование «ядра» PrP^{Sc} происходит медленно, процесс полимеризации – быстро.

мицеллы. Для того, чтобы такой олигомерный комплекс мог катализировать прионный переход, он должен сформировать стабильное «ядро», обладающее прионной конформацией. Конформационному превращению может подвергаться как мономер, так и олигомерный комплекс при присоединении к стабильному «ядру», служащему «матрицей» для образования прионной конформации.

V. ПРИОНЫ НИЗШИХ ЭУКАРИОТ

В 1994 г. Р. Викнер использовал концепцию прионов для объяснения природы двух цитоплазматически наследуемых детерминантов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: [URE3] и [PSI⁺] [165]. Он назвал прионы дрожжей «белками, проявляющими свойства генов», подчеркнув, что прионы способны хранить и передавать конформационную информацию. Было предложено несколько генетических критериев оценки прионных свойств цитоплазматически наследуемых детерминантов. Во-первых, прион должен быть обратимо теряем (изгоняем, «излечиваем»), то есть должны существовать условия, при которых прион исчезает. Однако, в отличие от элиминации вируса, которая необратима, прион может возникать вновь, поскольку «кодирующий» его белок постоянно присутствует в клетке. Во-вторых, сверхпродукция прионного белка должна увеличивать частоту возникновения приона *de novo*, так как увеличение концентрации белка в клетке повышает вероятность его неправильного сворачивания. В-третьих, возможность поддержания прионного состояния должна определяться наличием гена прионного белка дикого типа в геноме.

В отличие от прионов млекопитающих прионы дрожжей не приводят к гибели клеток, напротив они могут повышать их выживаемость в неблагоприятных условиях [157]. Обнаружение приона [Het-s] гриба *Podospora anserina* [41] привело к пониманию того, что прионы могут выполнять физиологические функции. О возможном биологическом значении прионов также свидетельствует их распространенность в природе. Сравнительно недавно был открыт прион [PIN⁺] *S. cerevisiae*, предрасполагающий к возникновению [PSI⁺] *de novo* [49, 51], также появились данные о существовании прионоподобных детерминантов [ISP⁺] [162], [GAR⁺] [18] *S. cerevisiae* и детерминанта [cif] *Schizosaccharomyces pombe* [8, 32].

VI. ПРИОН [URE3] *S. CEREVISIAE*

[URE3] был открыт в 60–70-х годах как доминантный нехромосомно наследуемый генетический элемент [92]. В 1994 г. была высказана гипотеза о том, что детерминант [URE3] поддерживается благодаря автокаталитическому воспроизведению альтернативных состояний белка Ure2 [165]. [URE3] полностью соответствует критериям приона дрожжей. Детерминант [URE3] может быть элиминирован с помощью гидрохлорида гуанидина (ГХГ) – вещества, вызывающего денатурацию белков. Для этого ГХГ используется в низкой концентрации (5мМ), при которой денатурация белков не происходит [158]. Изгнание этого детерминанта обратимо, поскольку после изгнания [URE3] может возникать вновь с такой же частотой, как в исходном штамме. Сверхпродукция белка Ure2 приводит к возрастанию частоты возникновения [URE3] в 20–200 раз. Присутствие гена *URE2* необходимо для поддержания детерминанта [URE3]. [URE3] передается цитодукцией (методом скрещивания с использованием мутантов дефектных по кариогамии, при котором происходит слияние цитоплазмы клеток без слияния ядер), что подтверждает его цитоплазматическую локализацию [1].

Ген *URE2*, ответственный за поддержание детерминанта [URE3] не является жизненно важным у дрожжей. Продукт гена *URE2* – белок Ure2 представляет собой транскрипционный регулятор, участвующий в азотной катаболической репрессии. В присутствии «богатых» источников азота, таких как соли аммония и глутамин, репрессирована транскрипция генов, ответственных за импорт в клетку «бедных» источников азота, таких как аллантин [35, 103]. Для импорта аллантина в клетку необходим синтез его транспортера – белка Dal5 [29]. Транскрипция гена, кодирующего Dal5, находится под позитивным контролем фактора Gln3 [36], на активность которого негативно влияет белок Ure2 [39]. В присутствии солей аммония цитоплазматический белок Ure2 связывается с фактором транскрипции Gln3 и предотвращает его транспорт в ядро, подавляя, таким образом, активацию многих генов, в том числе Dal5, в результате чего аллантин в клетку не поступает. В отсутствие солей аммония активируется синтез Dal5 и транспорт аллантина в клетку. Наряду с аллантином Dal5 может импортировать в клетку уреидосукцинат, напоминающий аллантин по химической структуре [159]. Открытие приона [URE3] произошло благодаря обнаружению мутантов, способных к поглощению уреидосукцината из среды, богатой солями аммония [92]. Большинство мутаций были рецессивными, одна «мутация» – [URE3] оказалась доминантной. Кроме того, она наследовалась по цитоплазматическому типу

[1]. Было высказано предположение, что [URE3] является прионной формой белка Ure2. Это подразумевало, что Ure2 может находиться в двух наследуемых состояниях: нативном, способном инактивировать фактор транскрипции, и прионном, неактивном состоянии [165]. Ure2 в прионном состоянии не препятствует транспорту Gln3 в ядро, в результате активируется транскрипция транспортера аллантаина/уреидосукцината, и клетки дрожжей способны поглощать уреидосукцинат из среды независимо от наличия в ней аммиака. Предположение о различных конформациях белка Ure2, соответствующих фенотипам [URE3] и [ure3] (отсутствие прионного детерминанта), впоследствии подтвердилось. Оказалось, что белок Ure2 из лизатов клеток, содержащих [URE3], более устойчив к обработке протеиназой К, чем Ure2 из лизатов клеток [ure3] [104]. Кроме того, белок Ure2 агрегирован в клетках, несущих [URE3] [60].

Прионным доменом белка Ure2 является его аминоконцевой домен, богатый аспарагиновыми и глутаминовыми остатками, и включающий аминокислоты с 1 по 94 [86]. Карбоксиконцевой, каталитической домен (94–354 а.к.) ответственен за катаболическую репрессию [37]. Переход в прионное состояние аминоконцевого домена инактивирует белок Ure2. В карбоксиконцевом домене есть области, влияющие на способность аминоконцевого домена к прионизации [102].

На сегодняшний день прионная природа [URE3] считается практически доказанной. Переход в прионное состояние белка Ure2 может быть смоделирован *in vitro*. Ure2 обладает способностью к олигомеризации и образованию амилоидных фибрилл *in vitro*. Клетки дрожжей могут быть «заражены» [URE3] с помощью трансформации фибриллами Ure2, сформированными *in vitro* [14].

VII. ПРИОН [Het-s] *P. ANSERINA*

В отличие от белка Ure2 *S. cerevisiae* переход в прионное состояние белка HET-s мицелиального гриба *P. anserina* не связан с инактивацией. Напротив, только в прионной форме белок HET-s способен вызывать реакцию вегетативной несовместимости, выражающуюся в гибели гетерокариотических клеток, образующихся при парасексуальном процессе [41].

Колония гриба *P. anserina* представляет собой синцитий, в котором клетки могут обмениваться цитоплазмой и даже ядрами. Гифы двух колоний гриба могут сливаться, что позволяет этим колониям обмениваться цитоплазмой и образовывать гетерокарионы. Слияние гифов потенциально небезопасно, так как может приводить к быстрому рас-

пространению вирусов грибов от одной колонии к другой. Возможно поэтому слияние гифов контролируется генетически таким образом, что две колонии могут сливаться, только при условии если у них идентичны, по крайней мере, девять локусов *het* [137]. Если слияние гифов произошло между двумя колониями, отличающимися хотя бы по одному локусу *het*, происходит реакция программированной клеточной гибели.

Оказалось, что один из этих локусов – *het-s*, обладает необычными свойствами. Данный локус представлен аллелями *het-s* и *het-S*, продукты которых (белки HET-s и HET-S) отличаются по 14 аминокислотам. Клетки, экспрессирующие белок HET-s, могут находиться в двух состояниях: [Het-s], при котором они несовместимы с клетками гриба, несущими *het-S* аллель (HET-S белок), и [Het-s*], при котором несовместимости с *het-S* штаммами не происходит. Было показано, что [Het-s] ведет себя как нехромосомный генетический элемент, а [Het-s*] – как его отсутствие [41]. Поддержание [Het-s] требует наличия гена *het-s* и сверхэкспрессия этого гена увеличивает частоту возникновения [Het-s] *de novo*. [Het-s] наследуется цитоплазматически, поскольку слияние [Het-s*] мицелия с мицелием [Het-s] трансформирует [Het-s*] мицелий в [Het-s] состояние, независимо от передачи ядра. Делеция гена *het-s* приводит к формированию колоний, совместных с партнерами *het-s* и *het-S*, указывая на то, что прионная форма белка отвечает за проявление несовместимости.

Прионные свойства белка HET-s подтверждены с помощью биохимических экспериментов. Сверхпродукция белка HET-s в клетках [Het-s] приводит к его агрегации [40]. Прионный домен HET-s располагается в карбоксиконцевом районе и в агрегированной форме устойчив к обработке протеиназой К [7]. Белок HET-s образует амилоидные фибриллы *in vitro* [57], и состояние [Het-s] у гриба *P. anserina* может быть достигнуто путем его «заражения» амилоидными полимерами HET-s, полученными *in vitro* [101].

VIII. ПРИОН [PSI⁺] *S. CEREVISIAE*

Детерминант [PSI⁺] впервые был описан как фактор, приводящий к увеличению эффективности слабого охр супрессора *SUQ5*, который кодирует серин-специфичную тРНК с антикодоном, комплементарным нонсенс кодону UAA [42]. Позднее выяснили, что [PSI⁺] повышает эффективность прочтения всех трех нонсенс кодонов [94]. Вскоре были обнаружены супрессорные мутации в гене *SUP35*, которые подобно [PSI⁺] обуславливали оннипотентную супрессию

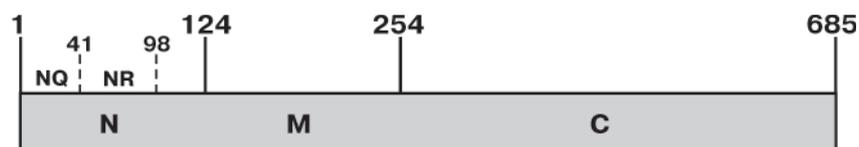


Рис. 2. Структурная организация белка Sup35.

Белок состоит из функциональных районов N и C, разделенных районом M. Внутри района N выделяют области NR и NQ, существенные для прионных свойств Sup35. Числа обозначают позиции аминокислотных остатков, использованных для выделения различных областей и районов белка.

(супрессию трех типов нонсенс мутаций) [72, 76]. Однако в отличие от рецессивных супрессорных мутаций в гене *SUP35*, детерминант $[PSI^+]$ был доминантным и наследовался по менделевскому типу. $[PSI^+]$ передавался при помощи цитодукции и, следовательно, был локализован в цитоплазме. Долгое время предполагали, что $[PSI^+]$ кодирует нуклеиновая кислота, хотя было известно, что $[PSI^+]$ не зависит от митохондриальной ДНК и от 2мкм ДНК [44]. Было высказано предположение, что аналогично $[URE3]$ фенотип $[PSI^+]$ существует благодаря способности белка Sup35 переходить в самоподдерживающееся прионное состояние [165]. Из всех известных прионов дрожжей $[PSI^+]$ исследован наиболее полно и поэтому в этом обзоре он будет рассмотрен подробнее.

Белок Sup35 состоит из трех районов (рис. 2) [91]. Его аминоконцевой район, обозначенный N (1–123 а.к.), имеет необычный аминокислотный состав, т.к. содержит более 50% аспарагиновых и глутаминовых остатков. Этот домен необходим для поддержания прионного состояния Sup35, и поэтому часто называется PrD (Prion forming Domain). Делеционные аллели гена *SUP35*, не кодирующие аминоконцевую последовательность, не поддерживают $[PSI^+]$ [154]. Кроме того, все известные мутации в гене *SUP35*, приводящие к потере $[PSI^+]$, локализованы в PrD Sup35 [47, 56]. Значение этого района Sup35 для физиологии клетки пока не ясно, однако недавно было продемонстрировано его взаимодействие с поли(А)-связывающим белком PABP [38, 74], приводящее к деградации мРНК [75].

Срединный район Sup35, обозначенный M (124–253 а.к.), богат заряженными аминокислотами (42%), а именно лизином и глутаминовой кислотой. Функция этого района не выяснена, однако показано его участие в обеспечении стабильности $[PSI^+]$ [16, 97].

В 1995 г. было показано, что белок Sup35 дрожжей является ортологом фактора терминации трансляции eRF3 высших эукариот,

который взаимодействует с белком Sup45 (ортологом фактора терминации трансляции eRF1), образуя вместе с ним терминирующий комплекс [150, 167]. За функцию фактора терминации трансляции eRF3 дрожжей отвечает жизненно важный карбоксиконцевой район Sup35, обозначенный С (254–685 а.к.), последовательность которого высококонсервативна и гомологична фактору элонгации трансляции eEF1A [155]. Распознавание стоп-кодона белком Sup45 приводит к высвобождению полипептидной цепи и терминации трансляции [64, 150, 167]. Sup35 представляет собой ГТФ-связывающий белок, стимулирующий терминацию трансляции. Механизм этого процесса не выяснен. Переход аминоконцевого домена Sup35 в прионное состояние приводит к агрегации Sup35 и снижению его терминационной функции, что, в свою очередь, обуславливает сквозное прочтение нонсенс кодонов, и может быть детектировано по супрессии нонсенс мутаций. По всей видимости, переход Sup35 в состав агрегатов создает стерические затруднения для участия его домена С в процессе терминации трансляции.

Роль Sup35 не ограничена его участием в процессе трансляции. Было продемонстрировано взаимодействие района N белка Sup35 с белком Sla1, участвующим в формировании актиновых микрофиламентов [6]. Примечательно, что это взаимодействие могло нарушаться под действием факторов, уменьшающих стабильность [*PSI*⁺]. Показана также роль Sup35 в формировании актинового цитоскелета [161]. Репрессия гена *SUP35* приводила к деполимеризации актина, нарушению формирования веретена деления и вследствие этого – к нарушению цито- и кариокинеза.

Детерминант [*PSI*⁺] полностью удовлетворяет всем генетическим критериям приона дрожжей. Действительно, [*PSI*⁺] теряется с высокой частотой в присутствии немутагенных агентов, таких как ГХГ и метанол [158]. [*PSI*⁺] может возникать вновь в штаммах, в которых существовал ранее и был изгнан [99]. В норме [*PSI*⁺] возникает *de novo* с частотой 1×10^{-5} . Сверхпродукция Sup35 или его прионного домена увеличивает частоту возникновения [*PSI*⁺] в 100 и более раз [25, 52, 85]. Поддержание [*PSI*⁺] определяется наличием гена *SUP35*.

[*PSI*⁺] имеет доминантное проявление и наследуется по неменделевскому типу [42], что легко объясняется в рамках прионной концепции. Если состояние [*PSI*⁺] возникло, оно стабильно поддерживается за счет постоянной передачи прионной конформации от прионной формы Sup35 к его нормальным молекулам. При скрещивании клетки [*PSI*⁺] с клеткой [*psi*⁻], лишенной детерминанта [*PSI*⁺], происходит смешивание цитоплазмы и каждая дочерняя клетка

получает некоторое количество Sup35 в прионной форме. Поэтому [*PSI*⁺] передается всем мейотическим потомкам, а также при помощи цитодукции.

Прионные свойства Sup35 подтверждены биохимическими экспериментами. Было показано, что Sup35, выделенный из штаммов [*PSI*⁺], обладает повышенной устойчивостью к обработке протеиназой K [119, 121]. В клетках [*PSI*⁺] Sup35 находится в составе больших агрегатов, тогда как в клетках [*psi*⁻] большая часть Sup35 растворима [119, 121]. Агрегаты Sup35 могут быть визуализированы в клетках [*PSI*⁺] с помощью зеленого флюоресцирующего белка (GFP) [119]. Для этого необходимо сконструировать химерный ген, кодирующий последовательность Sup35, к которой приштампована последовательность GFP. Такой белок может содержать не полную последовательность Sup35, а лишь его фрагмент, включающий районы N и M (Sup35NM). Введение в клетки [*PSI*⁺] плазмид, кодирующих Sup35-GFP или Sup35NM-GFP, приводит к встраиванию этих белков в прионные агрегаты Sup35, благодаря чему возможна их визуализация. В клетках [*psi*⁻] наблюдается диффузное свечение белка GFP. Нужно отметить, что таким способом можно наблюдать только крупные агрегаты Sup35, свечение мелких агрегатов неотличимо от диффузного свечения GFP.

Способность Sup35 к полимеризации может быть смоделирована *in vitro* [68, 82]. Очищенный полноразмерный рекомбинантный Sup35 или его NM-фрагмент способны самопроизвольно образовывать амилоидные фибриллы *in vitro*. Структура фибрилл Sup35 аналогична таковой у фибрилл, формирующихся из пептида A β , участвующего в патогенезе болезни Альцгеймера. Амилоидные фибриллы обладают β -структурой, в которой β -слои расположены перпендикулярно оси фибриллы [145]. Такая структура была выявлена у кристаллизованного пептида GNNQQNY прионообразующего домена Sup35 [108]. Этот пептид, как и сам прионный домен Sup35, формирует амилоидные фибриллы *in vitro*. Картина рентгеновской дифракции этих фибрилл аналогична таковой у амилоидных фибрилл, формируемых другими белками. Образование амилоидных фибрилл белком Sup35 – процесс протяженный во времени, который может занимать до 60 часов [68]. Он зависит от температуры и концентрации белка и имеет лаг-фазу протяженностью от 10 до 30 часов. Полагают, что лаг-фаза отражает период времени, необходимый для самопроизвольного образования «ядер» полимеризации [140]. Лаг-фаза может быть сведена к нулю, если к очищенному Sup35 или его фрагменту, содержащему N и M домены, добавить преформированные фибриллы или же лизаты [*PSI*⁺] штаммов [68, 122].

Совсем недавно были продемонстрированы инфекционные свойства амилоидных фибрилл Sup35. Был разработан метод «заражения» сферопластов клеток [*psi*⁻] амилоидными фибриллами рекомбинантного Sup35, полученными *in vitro* [81, 152]. Инкубация сферопластов клеток [*psi*⁻] с такими фибриллами приводила к возникновению [*PSI*⁺] в этих клетках, а эффективность такого «заражения» зависела от количества используемой фибриллярной формы Sup35.

IX. ВОЗНИКНОВЕНИЕ [*PSI*⁺] *DE NOVO*, ПРИОН [*PIN*⁺]

[*PSI*⁺] может возникать *de novo* при сверхэкспрессии Sup35 не у всех штаммов *S. cerevisiae*. Необходимым условием возникновения [*PSI*⁺] *de novo* является присутствие эпигенетического элемента, названного [*PIN*⁺] ([*PSI*⁺] *inducibility*) [51]. Однако, если [*PSI*⁺] уже существует, [*PIN*⁺] не требуется для его поддержания [50]. Появление [*PIN*⁺] в клетке связано с переходом белка Rnq1 с неизвестной функцией в агрегированное состояние [49]. [*PIN*⁺] имеет доминантное проявление, наследуется по цитоплазматическому типу, обратимо изгоняем с помощью ГХГ, возникает при сверхэкспрессии белка Rnq1 и исчезает при делеции гена *RNQ1*. Все вышеупомянутые свойства указывают на то, что [*PIN*⁺] является прионной формой белка Rnq1 [49, 50, 146]. Было показано существование наследуемых вариантов (штаммов) [*PIN*⁺] (подробно о вариантах прионов см. в разделе XII), отличающихся друг от друга по эффективности стимуляции возникновения [*PSI*⁺] [15].

Высказаны две гипотезы, объясняющие, каким образом прионная форма Rnq1 стимулирует возникновение приона [*PSI*⁺] [50]. Согласно первой гипотезе, растворимый белок Rnq1 является ингибитором образования [*PSI*⁺] *de novo*, и переход этого белка в агрегированное прионное состояние уменьшает эффективность такого ингибирования. Вторая гипотеза предполагает возможность формирования прионной формы Sup35 на матрице агрегатов Rnq1. Эта гипотеза подтверждается тем, что агрегаты Sup35NM-GFP колокализуются с агрегатами Rnq1 в процессе индукции [*PSI*⁺] *de novo* [53]. Помимо этого, полимеры Sup35NM содержат белок Rnq1 [135], а фибриллы Rnq1, образованные *in vitro*, ускоряют прионный переход Sup35NM *in vitro* [53].

Показано, что [*PIN*⁺] увеличивает частоту появления не только [*PSI*⁺], но и [*URE3*] [15], а [*PSI*⁺] и [*URE3*] способствуют агрегации Rnq1 [50]. Фенотип [*PIN*⁺] может определяться не только прионным состоянием белка Rnq1. Сверхэкспрессия 11 других белков, среди

которых были Ure2, New1, а также Lsm4, контролирующей деградацию мРНК и Ste18, участвующий в феромоновом сигнальном пути, сопровождалась их агрегацией и приводила к появлению фенотипа $[PIN^+]$ [49]. Таким образом, в роли $[PIN^+]$, возможно, могут выступать разные прионы.

Х. РОЛЬ ШАПЕРОНОВ В ВОЗНИКНОВЕНИИ И НАСЛЕДОВАНИИ ПРИОНОВ У ДРОЖЖЕЙ

Удивительным свойством прионов дрожжей является их способность стабильно поддерживаться в делящихся клетках. Известно, что наличие детерминанта $[PSI^+]$ соответствует агрегированное состояние белка Sup35 [119, 121]. В этой связи возникают вопросы, каким образом наследуются такие агрегаты и являются ли они единицами наследования $[PSI^+]$. Очевидно, что для того, чтобы прион стабильно поддерживался, каждому митотическому делению должно сопутствовать удвоение единиц его наследования.

Было показано, что $[PSI^+]$ может существовать только при условии наличия в клетке дрожжей шаперона семейства Hsp100 – Hsp104 [26]. Примечательно, что не только отсутствие белка Hsp104, но и его сверхэкспродукция приводят к потере $[PSI^+]$. Невозможность существования в отсутствие Hsp104 является общим свойством всех изученных прионов дрожжей, что свидетельствует в пользу единого механизма их наследования.

Hsp104 дрожжей и его бактериальный ортолог – ClpB являются основными белками теплового шока, обеспечивающими возможность выживания организмов в условиях стресса, таких как повышенная температура и высокая концентрация этанола в среде. Hsp104/ClpB представляет собой гексамер, который не предотвращает денатурацию клеточных белков, вызванную повышенной температурой, а разрушает крупные агрегаты уже денатурированных белков и тем самым способствует их повторному сворачиванию и восстановлению функции [118]. *In vitro* было показано, что Hsp104 в комплексе с белками Hsp40 и Hsp70 полностью восстанавливает активность денатурированной люциферазы [69].

Существуют две модели, рассматривающие механизм участия Hsp104 в поддержании $[PSI^+]$. Одна из них предполагает, что Hsp104 облегчает процесс прионного перехода, взаимодействуя с молекулами Sup35 и способствуя приобретению мономером некой промежуточной конформации [95]. Следует отметить, что *in vitro* переход Sup35 в прионную форму не требует наличия Hsp104 [68]. Однако было показано,

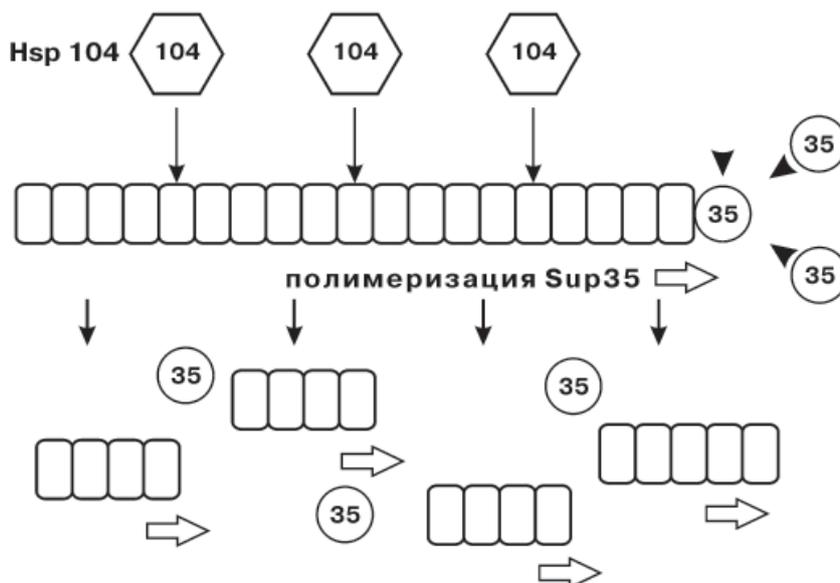


Рис. 3. Роль шаперона Hsp104 в поддержании $[PSI^+]$.

Hsp104 фрагментирует прионные полимеры Sup35, увеличивая число полимерных концов, с участием которых происходит полимеризация (рис. из [90]).

что в низкой концентрации Hsp104 (отношение гексамеров Hsp104 к мономерам Sup35 – 1 : 250) элиминировал лаг-фазу образования фибрилл и увеличивал скорость полимеризации Sup35NM *in vitro* [141].

Другая модель (рис. 3), в пользу которой свидетельствует большинство экспериментальных данных, предполагает, что Hsp104 необходим не для прионного перехода, а для разборки крупных агрегатов Sup35 на более мелкие частицы, в результате которой обеспечивается стабильность наследования приона [90, 121].

Механизм участия Hsp104 в поддержании прионов дрожжей изучался параллельно с механизмом изгнания прионов с помощью ГХГ. Излечение $[PSI^+]$ с помощью ГХГ происходит только в делящейся культуре клеток дрожжей [59], появлению клеток $[psi^-]$ предшествует лаг-фаза, приблизительно равная четырем-пяти генерациям. На основании изучения кинетики изгнания $[PSI^+]$ возникло предположение, что ГХГ блокирует репликацию «зерен» $[PSI^+]$, то есть единиц наследования, называемых также пропагонами. Если прионные «зерна» не реплицируются, то деление культуры клеток сопровождается постепенным уменьшением их количества в каждой клетке.

Отслеживая процесс изгнания $[PSI^+]$ в присутствии ГХГ в течение 20–30 часов, авторы [59] определили среднее количество пропагонов, присутствовавших в клетке до воздействия этого вещества. Оно оказалось равным 62 ± 10 . Позднее выяснили [43], что число пропагонов может варьировать от 30 до 1000 в зависимости от штамма (варианта) $[PSI^+]$ (см. раздел XII). Было показано, что выращивание клеток в среде с ГХГ не вызывает разрушения уже существующих прионных агрегатов и не приводит к протеолизу белка Sup35, образующего эти агрегаты. ГХГ не блокирует и дальнейшую полимеризацию Sup35, катализируемую имеющимися в клетке «зернами». Уменьшается постепенно только само количество пропагонов в клетках [109].

Примерно в это же время выяснили, что выращивание клеток в среде с ГХГ приводит к инактивации Hsp104 [63], на основании чего предположили, что изгнание $[PSI^+]$ с помощью этого агента является результатом инактивации данного шаперона. Подтверждением этому послужило получение мутаций в гене *HSP104*, обеспечивающих устойчивость $[PSI^+]$ к действию ГХГ [78], и демонстрация ингибирующего воздействия ГХГ на АТФ-азную активность Hsp104 *in vitro* [71]. *In vitro* также было показано, что Hsp104 разбирает фибриллы Sup35 на более мелкие (при соотношении гексамеров Hsp104 к мономерам Sup35 равном примерно 1: 50) [141]. Уменьшение уровня Hsp104 в клетке или снижение его активности приводит к уменьшению количества агрегатов Sup35, а также к увеличению их размера [163], а сверхэкспрессия Hsp104 уменьшает размер прионных агрегатов [89]. В дальнейшем были получены более прямые свидетельства способности Hsp104 фрагментировать агрегаты Sup35 [88]. Оказалось, что агрегаты Sup35 состоят из SDS (sodium dodecyl sulfate)-устойчивых полимеров, каждый из которых, в свою очередь, содержит примерно от десяти до пятидесяти молекул Sup35. При росте клеток в присутствии ГХГ средний размер полимеров Sup35 возрастал в два раза за одно клеточное деление, что можно было объяснить только нарушением их фрагментации. После переноса клеток в среду, не содержащую ГХГ, размер полимеров постепенно возвращался к первоначальному. Постепенное уменьшение экспрессии Hsp104 также увеличивало размер полимеров. Полученные данные свидетельствуют в пользу модели, согласно которой Hsp104 фрагментирует прионные полимеры, обеспечивая стабильность их наследования [90]. Таким образом, поддержание приона в клетке можно представить как баланс двух процессов: перехода мономеров в полимерную форму (полимеризация) и дробления полимеров на более мелкие (фрагментация). Эффективная фрагментация полиме-

ров обеспечивает необходимое количество свободных полимерных концов, с участием которых происходит полимеризация.

Было установлено, что в процессе поддержания $[PSI^+]$ участвуют также шапероны семейств Hsp70 и Hsp40. Белки теплового шока семейства Hsp70 являются основными шаперонами, обеспечивающими сворачивание белков в клетке дрожжей. Помимо собственно сворачивания белков, Hsp70 выполняют разнообразные функции, такие как стабилизация белков при тепловом шоке, транслокация полипептидных цепей через мембраны [9], сборка и диссоциация макромолекулярных комплексов [113]. Партнерами Hsp70 являются шапероны семейства Hsp40 [46]. Семейство шаперонов Hsp70 *S. cerevisiae* включает *SSA* и *SSB* подсемейства.

Сверхэкспрессия белка Ssa1 препятствует изгнанию $[PSI^+]$ при сверхэкспрессии Hsp104 [110] и примерно в десять раз усиливает индукцию $[PSI^+]$ *de novo* [3]. Увеличение количества Ssa1 в клетке приводит к увеличению размеров прионных полимеров и одновременному возрастанию уровня мономерного Sup35. Другие белки подсемейства *SSA*, а именно Ssa2, Ssa3, Ssa4 оказывают на $[PSI^+]$ такое же действие, как и Ssa1 [3]. Физическое взаимодействие белков Ssa и Ssb с Sup35 было показано *in vitro* и *in vivo*. Таким образом, семейство шаперонов *SSA*, по-видимому, выполняет функцию «помощника» $[PSI^+]$. Возможным механизмом такого действия белков Ssa является стабилизация ими промежуточной конформации молекул Sup35. Стабилизация же частично свернутого состояния, промежуточного между нативным и прионным, увеличивает вероятность прионного перехода при взаимодействии с прионным «ядром».

В противоположность подсемейству *SSA* подсемейству *SSB* шаперонов Hsp70 проявляет свойства антагониста $[PSI^+]$ [27, 89]. Сверхпродукция белка Ssb1 усиливает изгнание $[PSI^+]$, наблюдаемое при повышенном уровне Hsp104. Делеция не жизненно важных генов *SSB1* и *SSB2* ослабляет эффект излечения $[PSI^+]$, вызванный сверхпродукцией Hsp104 [27]. Частота возникновения $[PSI^+]$ возрастает в штаммах с делециями *SSB1* и *SSB2* генов. Данные о том, что Ssb1 влияет на протеосомную деградацию белков [112] позволяют предполагать, что Ssb1, взаимодействуя с молекулами Sup35, стабилизирует их нативное состояние, а если это оказывается невозможным, то способствует их деградации.

Поддержание $[PIN^+]$ зависит не только от шаперона Hsp104 [146], но и от шаперона Sis1, принадлежащего семейству Hsp40 [98, 147]. Однако в отличие от $[PSI^+]$, сверхпродукция шаперона Hsp104 не приводит к потере $[PIN^+]$ [51]. В то же время, обнаружено, что

сверхпродукция шаперона Ydj семейства Hsp40 приводит к потере некоторых вариантов [*PIN*⁺] [15].

Необходимым условием для поддержания в клетке [*URE3*] является функционирование шаперона Hsp104 и шаперона Ssa2 из семейства Hsp70 [138]. Делеция гена *HSP104* приводит к потере [*URE3*], а сверхпродукция Hsp104 не дестабилизирует его [107]. Изгнание [*URE3*] вызывает сверхпродукция другого представителя семейства Hsp70 – белка Ssa1 [138], а также шаперона Ydj1 из семейства Hsp40 [107].

XI. МЕЖВИДОВЫЕ БАРЬЕРЫ ПЕРЕДАЧИ ПРИОННЫХ СВОЙСТВ Sup35 И МЕХАНИЗМЫ ИЗГНАНИЯ [*PSI*⁺]

Прионный домен Sup35 можно разделить на две области, отличающиеся по структуре и функции. Район, обозначенный NQ (с 1 по 40 а.к.) обогащен аспарагиновыми и глутаминовыми остатками. Второй район, NR (с 41 по 97 а.к.), содержит пять полных и одну неполную копию аминокислотных повторов с консенсусной последовательностью PQGGYQQ-YN.

Мутации в гене *SUP35*, вызывающие потери [*PSI*⁺] (мутации *PNM*) или интерферирующие с его фенотипическим проявлением, в основном приводят к заменам аминокислот на участке с 8 по 26 а.к. PrD [47]. Впоследствии выяснилось, что эта область белка является детерминантой видовой специфичности приона [136]. Подобно барьерам, ограничивающим передачу приона между отдаленными видами млекопитающих, существуют барьеры передачи [*PSI*⁺] между отдаленными видами дрожжей, например, такими как *S. cerevisiae* и *Candida albicans*. Передача [*PSI*⁺] между несколькими отдаленными видами дрожжей была смоделирована с помощью химерных белков, у которых прионный домен белка Sup35 *S. cerevisiae* был заменен на аминоконцевые районы Sup35 *C. albicans*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia methanolica*. Химерные белки, содержащие прионные домены *C. albicans*, *K. lactis*, *P. methanolica*, способны агрегировать *in vivo* и образовывать амилоидные фибриллы *in vitro*, однако не могут встраиваться в прионные агрегаты Sup35 *S. cerevisiae*. Сверхпродукция Sup35 *S. cerevisiae* не приводила к агрегации и индукции прионного состояния химерных белков, и, наоборот, сверхпродукция химерных белков не приводила к индукции прионного состояния Sup35 *S. cerevisiae*. Таким образом, передача прионного состояния между белками Sup35 из дрожжей разных видов не происходила. В то же время, замена участка с 8 по 26 а.к. в химерном белке, несущем прионный домен Sup35 *C. albicans* и район MC белка Sup35 *S. cerevisiae*, на

аналогичный участок Sup35 *S. cerevisiae* делала его совместимым с прионным состоянием белка *S. cerevisiae* [136]. В этой же работе была предложена модель прионного полимера, согласно которой участок с 8 по 26 а.к. располагается на его поверхности и тем самым обеспечивает полимеризацию только тех молекул Sup35, которые имеют область гомологии к этому участку. Недавно получены данные, свидетельствующие о справедливости этой модели: молекулы Sup35NM ориентированы вдоль амилоидной фибриллы таким образом, что начальные участки прионных доменов соседних молекул взаимодействуют [87].

Еще одна мутация *PNM* была найдена в участке гена *SUP35*, соответствующем второму повтору области NR. Эта мутация, приводящая к замене глицина на аспарагиновую кислоту в 58 положении, имела доминантное проявление [56]. Мутантный белок был способен переходить в прионное состояние, однако *in vitro* скорость такого перехода была примерно в два раза ниже [85]. Наиболее вероятный механизм элиминации [*PSI*⁺] в присутствии мутантного Sup35 заключается в способности молекул мутантного белка присоединяться к растущему полимеру Sup35 и замедлять его дальнейший рост. Эта гипотеза подтверждается уменьшением размера прионных полимеров Sup35, которое наблюдается при одновременной экспрессии мутантного белка Sup35 и белка дикого типа. (Д. Крындушкин, неопубликованные результаты).

Делеционный анализ прионного домена Sup35 [117] показал, что для поддержания [*PSI*⁺] необходима область с 1 по 93 а.к. PrD, включающая район NQ и пять повторов района NR. Удаление шестого неполного повтора области NR (R6) приводило лишь к мало выраженному ослаблению супрессорного фенотипа [*PSI*⁺] и снижению его митотической стабильности. Замена аллели *SUP35* дикого типа на аллель, несущую делецию пятого (R5) и шестого (R6) повторов приводила к потере [*PSI*⁺]. Тем не менее, последовательное удаление повторов R6, R5, R4, R3 не сказывалось на способности мутантных Sup35 коагрегировать с полноразмерным белком Sup35 в клетках [*PSI*⁺]. Сверхпродукция мутантных химерных белков, в которых последовательность GFP была присоединена к Sup35NM с делециями части аминокислотных повторов в прионном районе, могла индуцировать возникновение [*PSI*⁺] *de novo* в клетках, экспрессирующих Sup35 дикого типа [114]. Таким образом, молекулы Sup35, число аминокислотных повторов которых уменьшено, могут коагрегировать с полноразмерным Sup35 и даже стимулировать возникновение [*PSI*⁺] *de novo*, но не способны поддерживать [*PSI*⁺] (кроме Sup35, содержащего пять повторов в прионном домене).

На основании этих наблюдений была предложена модель, согласно которой область, включающая район NQ и начало района NR прионного домена Sup35, необходима и достаточна для агрегации и роста прионных полимеров. При этом большая часть области NR обеспечивает взаимодействие полимеров Sup35 с шаперонами и, как следствие этого, их фрагментацию, а значит размножение [114]. С другой стороны, получены результаты, которые указывают на значение аминокислотных повторов области NR для процесса полимеризации Sup35 [96]. Рекомбинантный укороченный Sup35, в котором удалены четыре повтора (со второго по пятый), образовывал полимеры *in vitro* гораздо медленнее, чем полноразмерный Sup35. Рекомбинантный удлиненный Sup35, содержащий две дополнительные копии второго повтора, полимеризовался *in vitro* быстрее, чем Sup35 дикого типа, за счет сокращения лаг-фазы прионного перехода, то есть более быстрого образования «ядер».

Согласно предложенной модели, элиминация $[PSI^+]$ мутантным белком Sup35 при его коэкспрессии с нормальным Sup35 может быть опосредована либо дефектом полимеризации Sup35, либо нарушением фрагментации образующихся полимеров [114].

ХИ. ВАРИАНТЫ $[PSI^+]$

Как отмечено выше, штаммовое разнообразие является одним из основных свойств прионов. Феномен вариабельности прионов проявляется в полной мере и у прионов дрожжей. Штаммы прионов дрожжей обычно называют вариантами. Варианты $[PSI^+]$ отличаются по митотической стабильности и силе супрессорного фенотипа [52] (рис.4). Варианты $[PSI^+]$, обладающие высокой митотической стабильностью, и обеспечивающие выраженную супрессию нонсенс мутаций, называют сильными. Варианты $[PSI^+]$ с невысокой митотической стабильностью и незначительным уровнем супрессии называют слабыми. Сила супрессорного фенотипа обратно пропорциональна количеству раст-

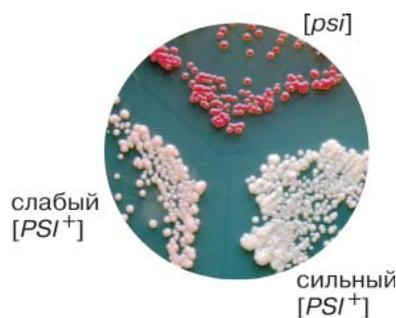


Рис. 4. Колонии дрожжей, несущих разные «по силе» варианты $[PSI^+]$, отличаются по фенотипу.

Приведены фотографии колоний штамма $[psi^-]$ и колоний, содержащих сильный и слабый варианты $[PSI^+]$.

воримой формы Sup35 [84, 160, 166]. Количество растворимого Sup35 может отличаться в несколько раз в клетках с различными вариантами $[PSI^+]$. Варианты $[PSI^+]$ также отличаются по размеру прионных полимеров [88]. Чем сильнее вариант $[PSI^+]$, тем меньше размер полимеров Sup35. Разница в размерах полимеров Sup35 между вариантами $[PSI^+]$ скорее всего указывает на их различную подверженность к фрагментации. Полимеры Sup35 сильных $[PSI^+]$ фрагментируются интенсивнее полимеров слабых $[PSI^+]$, поэтому размер полимеров сильных $[PSI^+]$ меньше, чем размер полимеров слабых $[PSI^+]$. Действительно, интенсивность элиминации $[PSI^+]$ при сверхпродукции Hsp104 зависит от варианта изгоняемого приона. Кроме того, при сверхпродукции шаперонов Ssb1, Ssa1 и Ydj1 наблюдали вариант-специфичное изгнание $[PSI^+]$, поддерживаемого химерным белком, в котором аминоконцевой район Sup35 *S. cerevisiae* был заменен на аналогичный район Sup35 *P. methanolica* [89]. Варианты $[PSI^+]$ отличаются также по способности прионных «ядер» катализировать переход растворимого Sup35 в полимерное состояние – агрегаты Sup35 из клеток с сильными $[PSI^+]$ индуцируют прионный переход растворимого Sup35 гораздо более эффективно, чем агрегаты из клеток со слабыми $[PSI^+]$ [84, 160].

Варианты $[PSI^+]$ стабильно поддерживаются *in vivo*. Это означает, что выраженность супрессорного фенотипа и уровень митотической стабильности данного варианта $[PSI^+]$ не меняется в клеточных поколениях. Немаловажную роль в обеспечении стабильного наследования вариантов $[PSI^+]$ играет район М белка Sup35, поскольку удаление начальной области этого района приводило к появлению недифференцированного $[PSI^+]$, то есть такого $[PSI^+]$, сила супрессии и митотическая стабильность которого варьировала от клетки к клетке [16]. В литературе описан лишь один случай структурной нестабильности $[PSI^+]$, поддерживаемого полноразмерным Sup35: возникновение сильного варианта $[PSI^+]$ из слабого [84]. Такая структурная нестабильность характерна для очень слабых вариантов $[PSI^+]$.

Недавно было показано, что варианты $[PSI^+]$ могут стабильно поддерживаться *in vitro* [81]. Полимеры химерного белка, содержащего укороченный PrD Sup35 (1–61 а.к.) и GFP (Sup35-1-61-GFP), изолированные из клеток дрожжей, содержащих три различных варианта $[PSI^+]$ ([VH], [VK], [VL]), в которых одновременно экспрессировался полноразмерный Sup35, были использованы в качестве «затравки» для прионного перехода очищенного рекомбинантного Sup35-1-61-GFP, наработанного в *E. coli*. При использовании прионных «ядер» [VH], [VK] и [VL] *in vitro* были получены фибриллы, которые затем использовали для трансформации (заражения) дрожжевых клеток $[psi^-]$. Это

привело к появлению колоний [PSI^+] с тремя фенотипами, соответствующими изначальным вариантам. Эксперимент также продемонстрировал, что участок прионного домена Sup35 с 1 по 61 а.к. достаточен для поддержания различий свойств приона Sup35 *in vitro*.

По всей видимости, варианты [PSI^+] представляют собой различные стабильно поддерживающиеся прионные конформации Sup35. В пользу этого утверждения свидетельствуют следующие экспериментальные данные.

Амилоидные фибриллы, спонтанно образуемые фрагментом NM белка Sup35 *in vitro*, представляют собой структуры, которые различаются по скорости и полярности роста. Амилоидные фибриллы, формируемые Sup35NM *in vitro*, способны расти в двух направлениях, однако скорость роста фибрилл в разных направлениях неодинакова [48]. Кроме того, амилоидные фибриллы, образованные при различных температурах (4 °C и 37 °C), обладают различной термостабильностью в присутствии SDS и устойчивостью к протеолизу [152]. С помощью ЭПР-спектроскопии получены данные о различной структуре фибрилл Sup35NM, образованных при разных температурах [152]. Анализ таких фибрилл Sup35NM, проводившийся с помощью флуоресцентной метки, показал, что молекулы Sup35NM, составляющие фибриллы, образованные при 25 °C или 37 °C, имеют более протяженную область аминоконцевого участка, вовлеченную в прионную укладку, чем молекулы Sup35NM, входящие в состав фибрилл, образованных при 4 °C [87].

Разработанный недавно метод трансформации клеток [psi^-] в состояние [PSI^+] с помощью амилоидных фибрилл, полученных *in vitro* [81, 152], позволил продемонстрировать, что инфицирование клеток амилоидами, образованными при 4 °C, приводит к возникновению преимущественно сильных вариантов [PSI^+], а инфицирование клеток амилоидами, образованными при 25 °C или 37 °C приводит к возникновению преимущественно слабых вариантов [PSI^+] [152]. Таким образом, было показано, что разнообразие вариантов [PSI^+] обусловлено конформационными различиями их прионных полимеров.

ХIII. СТРУКТУРА АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ

Фибриллы, образуемые белками Sup35, Ure2, HET-s или их прионными доменами *in vitro*, сходны по структуре с амилоидами, вовлеченными в патогенез заболеваний человека. К настоящему времени описано около 20 белков человека, способных образовывать амилоиды *in vivo* [139], например, инсулин, фрагменты легких

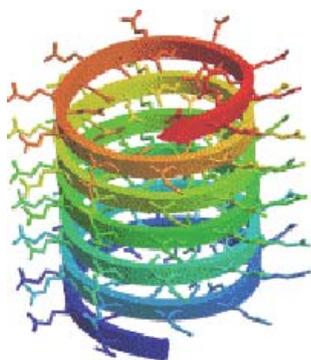


Рис. 5. Схематическое изображение фрагмента нанотрубочки, образованной прионным доменом Sup35.

Основная цепь полипептида представлена в виде ленты, боковые цепи, обращенные внутрь и наружу нанотрубочки, представлены зигзагами (рис. из [83]).

цепей иммуноглобулинов, α -синуклеин, A β -пептид и белок PrP. Амилоидные фибриллы взаимодействуют с тиофлавином T и конго красным [61] и устойчивы к обработке детергентом SDS при комнатной температуре [140]. Кроме того, амилоидные фибриллы независимо от того, каким белком они сформированы, имеют схожую структуру: образованы β -слоями, расположенными перпендикулярно оси фибриллы, а водородные связи, соединяющие полипептидные цепи, ориентированы вдоль оси фибриллы [151]. Способность белков формировать амилоиды зависит от их заряда и гидрофобности [30] и, по-видимому, является общим свойством полипептидных цепей, поскольку *in vitro* в условиях частичной денатурации многие пептиды и белки образуют подобные структуры. Однако такие условия существенно отличаются от физиологических [54, 55].

Атомарная структура амилоидных фибрилл, в том числе фибрилл, образованных Sup35, неизвестна. Картина рентгеновской дифракции фибрилл, образованных глутамин-аспарагин-богатым пептидом прионного домена Sup35, поли-L-глутамином, а также фрагментом хантингтина [126], позволила сформулировать модель строения амилоидной фибриллы [124]. Согласно этой модели, амилоидная фибрилла состоит из нескольких переплетенных протофибрилл. Амилоидная протофибрилла представляет собой цилиндрический β -слой – полулю нанотрубочку с диаметром 3 нм, в которой полипептидная цепь «накручена» вокруг оси фибриллы и формирует спираль. Один виток такой спирали включает 20 аминокислот полипептидной цепи, витки взаимодействуют между собой водородными связями между амидами основной и боковых цепей (каждый СО предыдущего витка взаимодействует с NH последующего витка). Положение боковых цепей аминокислот каждого витка чередуется: соседние боковые цепи располагаются по разные стороны от основной цепи (направлены внутрь спирали и наружу) (рис. 5). В случае нанотрубочки, образованной Sup35, домен С белка в формировании этой структуры не участвует, а

«свешивается» из нее. Один виток такой спирали нестабилен, так как он стабилизируется в результате взаимодействия со следующим витком. Таким образом, минимальное количество витков, образующих стабильную структуру, равно двум, то есть 40 аминокислот составляют минимальный амилоидообразующий фрагмент. Полученная недавно картина рентгеновской дифракции фибрилл, образованных фрагментами белка Sup35 (Sup35NM и Sup35N), свидетельствует в пользу этой модели [83].

Недавно было показано, что мономеры Sup35NM, составляющие протофибриллу, ориентированы по отношению друг к другу таким образом, что межмолекулярные водородные связи образуются между одинаковыми участками этих молекул [87]. Таким образом, Sup35NM расположены друг относительно друга в ориентации: «голова» (с 25 по 38 а.к.) к «голове» и «хвост» (с 91 по 106 а.к.) к «хвосту».

Другая модель амилоидной протофибриллы была предложена для белка Ure2 [79], однако, по-видимому, она применима и к Sup35. Структура, рассмотренная в этой модели, была названа β -серпантин. Согласно этой модели, прионный домен одной молекулы Ure2 (или Sup35) образует суперскладчатую β -структуру – серпантин (рис. 6А). Серпантины Ure2 или Sup35 расположены столбиком параллельно друг другу с небольшим сдвигом (примерно в 1°) и стабилизированы меж- и внутримолекулярными водородными связями. С-домены этих белков не участвуют в суперскладчатой структуре и располагаются по спирали вокруг серпантина (рис. 6 Б).

XIV. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПРИОНОВ В ПРИРОДЕ

Общим свойством аминокислотных последовательностей всех известных к настоящему моменту прионных белков *S. cerevisiae* является высокое содержание аспарагиновых и глутаминовых остатков. Этим свойством также обладают амилоидогенные последовательности белков человека, таких как хантингтин и APP (Amyloid β Precursor Protein). Было показано, что глутамин-богатые последовательности склонны формировать амилоидные фибриллы *in vitro* [125], что указывало на возможность предсказания прионных свойств белков на основе их обогащенности глутаминовыми и аспарагиновыми аминокислотными остатками. В качестве критерия для идентификации таких белков использовалось наличие 30 остатков глутамина или аспарагина на протяжении непрерывной последовательности 80 аминокислотных остатков [106]. Анализ частоты встречаемости глутамин-аспарагин-богатых последовательностей у разных видов

организмов показал, что в геноме *S. cerevisiae* 1,69 % ОРС (Открытых Рамок Считывания) кодирует такие белки (107 белков). У *Drosophila melanogaster* было найдено 472 подобных белка, что соответствует 3,47 % всех ОРС. Принимая во внимание распространенность глутамин-аспарагин-богатых последовательностей, можно предполагать, что прионы не редки в природе. Однако необходимо отметить, что не все прионообразующие последовательности богаты аспарагином и глутамином. Например, к ним не относятся прионные домены белков PrP и HET-s. Таким образом, пока не существует надежного критерия оценки способности полипептидных последовательностей к прионообразованию, что существенным образом затрудняет предсказание белков с прионными свойствами.

Недавно появились данные о цитоплазматически наследуемых фенотипах, которые, возможно, зависят от наличия прионных детерминантов у дрожжей. В настоящее время ведется активный поиск прионных белков, обуславливающих эти признаки. Среди них детерминанты [*ISP*⁺] и [*GAR*⁺] *S. cerevisiae* и детерминант [*cif*] *Schizosaccharomyces pombe*.

Нехромосомно наследуемый детерминант [*ISP*⁺] *S. cerevisiae* был обнаружен на фоне двух супрессорных мутаций в 3'-концевой области гена *SUP35* [162]. По отношению к этим мутациям [*ISP*⁺] проявляет свойства антисупрессора ([*ISP*⁺] – Inversion of Suppressor Phenotype). Однако [*ISP*⁺] не зависит от прионного домена Sup35 и, возможно, он представляет собой прионную форму неизвестного белка, взаимодействующего с Sup35. [*ISP*⁺] имеет доминантное проявление, наследуется по цитоплазматическому типу и обратимо «излечивается» с помощью ГХГ, однако в отличие от [*ISP*⁺] его поддержание не зависит от шаперона Hsp104.

Клетки дрожжей *S. cerevisiae* способны спонтанно приобретать фенотип [*GAR*⁺] – устойчивости к негидролизруемому аналогу глюкозы – D-(+)-глюкозамину [18]. Признак [*GAR*⁺] проявляет генетические свойства прионов дрожжей. Он наследуется цитоплазматически, передается при помощи цитопродукции, исчезает в штаммах с делецией шаперонов Ssa1 и Ssa2 из семейства Hsp70. Белок, прионные свойства которого, возможно, определяют фенотип [*GAR*⁺], пока не найден.

Прионоподобный детерминант [*cif*] (calnexin independence factor) дрожжей *S. pombe* обеспечивает жизнеспособность клеток в отсутствие калнексина (белка Cnx1) – жизненно важного шаперона эндоплазматического ретикула. Фенотип Cin (Calnexin independence) наследуется доминантно и передается в мейозе большинству

потомков. Он также передается с помощью трансформации клеточными экстрактами, лишенными нуклеиновых кислот [32]. В то же время, обработка экстрактов клеток с фенотипом C_{in} протеиназой К существенно снижала эффективность передачи C_{in} состояния, что свидетельствовало в пользу белковой природы фактора независимости от калнексина [*cif*]. Был идентифицирован ген *cif1*, экспрессия которого в мультикопийном состоянии провоцирует независимость от калнексина. Продукт этого гена назвали фактором независимости от калнексина – Cif1 [8]. Белок Cif1 образует фибриллярные агрегаты *in vitro*, заражение которыми калнексин-зависимых клеток, провоцирует (индуцирует) C_{in} фенотип. Таким образом, были получены факты, свидетельствующие в пользу того, что белок Cif1, функция которого в клетке пока не выяснена, является прионом.

XV. ПЕРСПЕКТИВЫ ЛЕЧЕНИЯ ПРИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В настоящее время прионные болезни считаются неизлечимыми, однако подходы к их лечению активно разрабатываются. Губчатые энцефалопатии характеризуются отсутствием иммунного ответа на прионную инфекцию. Это связано с тем, что нормальная форма PrP всегда присутствует в организме, и в том числе в Т и В лимфоцитах. Однако *in vitro* было показано, что антитела против нескольких эпитопов PrP ингибируют размножение PrP^{Sc} [62, 123]. Вакцинация рекомбинантным PrP перед или сразу после инфекции и пассивная иммунизация антителами против некоторых эпитопов PrP приводили к ингибированию репликации приона и отсрочке заболевания [144, 164]. Эти эксперименты подтвердили эффективность вмешательства в иммунную систему при лечении прионных заболеваний.

Размножение PrP^{Sc} может быть остановлено с помощью «блокаторов β-структур» – пептидов, обогащенных пролином и имеющих гомологию с PrP^C [148]. Существует и другой подход, основанный на полиморфизме гена *Prnp*. Известно, что замены Q171R в белке PrP овец и E219K в PrP человека несовместимы с образованием прионной формы PrP^{Sc}. Мутации, приводящие к данным аминокислотным заменам в PrP овец и человека, были введены в ген *Prnp* мыши [80]. Соответствующие рекомбинантные мутантные белки мыши не переходили в патологическую изоформу PrP, а также ингибировали формирование PrP^{Sc} в клеточных культурах дикого типа [80]. Данные мутации имели доминантно-негативное проявление, поскольку препятствовали переходу нормального белка PrP мыши в прионное состояние. Для того,

чтобы использовать доминантно-негативные мутанты PrP в генотерапии прионных заболеваний, были разработаны лентивирусные векторы для доставки кодирующей их ДНК *in vivo*. В культурах нейронов мыши показано, что трансдукция клеток лентивирусными вирионами, содержащими описанные выше мутантные аллели *Prnp*, приводит к значительному снижению уровня PrP^{Sc} [45].

Дрожжи представляют собой удобную модель для поиска и изучения факторов, способных излечивать клетки от прионов. PrP млекопитающих при экспрессии в клетках дрожжей, по всей видимости, имеет тенденцию к переходу в прионную форму, поскольку накапливается в агрегированной и протеазоустойчивой форме [100]. Дрожжи, содержащие прион PrP^{Sc}, могли бы быть использованы для поиска лекарственных препаратов с антиприонными свойствами, однако такие работы пока не проводились либо еще не опубликованы. В то же время, дрожжи были использованы для поиска химических соединений, изгоняющих прионы [*PSI*⁺] и [*URE3*]. Способность элиминировать [*PSI*⁺] была проверена для 2500 химических соединений. Клетки млекопитающих не содержат шаперон Hsp104. Поэтому, для того, чтобы выявить химические соединения, активные по отношению к прионам млекопитающих, поиск антиприонных соединений у дрожжей проводили в условиях сниженной активности Hsp104. В результате было выявлено шесть соединений, элиминирующих [*PSI*⁺]. Пять принадлежали к новому классу молекул – кастеллопаолитинам, шестым был фенантридин. Все эти соединения изгоняли и [*URE3*], а также ингибировали образование PrP^{Sc} в культуре клеток нейробластомы мыши [5]. Интересно, что два других соединения, антиприонная активность которых была показана ранее в культуре клеток млекопитающих, а именно, кинакрин (используется как средство от малярии) и хлорпромазин (используется как антипсихотическое средство), излечивали клетки дрожжей от [*PSI*⁺] и [*URE3*]. Следует отметить, что все эти соединения активны только в делящихся клетках, и для элиминации прионов требовалось присутствие этих агентов в течение нескольких клеточных поколений. Фенантридин, кастеллопаолитины, кинакрин и хлорпромазин, скорее, действуют не на прионные агрегаты, а на механизмы, поддерживающие прионное состояние белков. Это означает, что механизмы, контролирующие поддержание прионов у млекопитающих и дрожжей, скорее всего, имеют общие черты. Проведенные исследования показали эффективность и обоснованность использования дрожжевой модели для поиска агентов, излечивающих прионы млекопитающих.

XVI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытие прионов у дрожжей и *P. anserina* расширило наши представления о прионах. Оказалось, что прионы не только являются инфекционными агентами, но представляют собой общебиологическое явление. У низших эукариот феномен прионов лежит в основе эпигенетической наследственности и регуляции экспрессии генов на посттрансляционном уровне. Наличие или отсутствие детерминанта [*PSI*⁺] у дрожжей *S. cerevisiae* может обеспечивать адаптивные преимущества в меняющихся условиях среды, например, наличие [*PSI*⁺] ингибирует рост в присутствии некоторых источников азота у одних штаммов, но позволяет клеткам других штаммов расти на галактозе [157]. Кроме того, наличие приона [*PSI*⁺] повышает устойчивость клеток к тепловому шоку [58]. Прионный механизм имеет потенциально полезные отличия по сравнению с механизмами генетической изменчивости. Переход белков в прионное состояние может происходить с более высокой частотой, чем возникновение мутаций, причем степень выраженности прионного фенотипа может зависеть от варианта приона. Обратный переход из прионного состояния в неприонное тоже происходит чаще, чем реверсии за счет мутаций, поскольку клетки с прионным фенотипом сохраняют информацию об исходном состоянии белка. Это особенно важно для адаптивной лабильности популяции, когда в ответ на изменение условий окружающей среды, скорее, требуется временная коррекция фенотипа, чем постоянное его изменение.

Принимая во внимание распространенность и значимость прионов у низших эукариот, можно предполагать, что и у высших организмов прионы могут не только быть причиной болезней, но и служить выполнению физиологических функций. Совсем недавно было обнаружено, что PpP, по всей видимости, не единственный белок высших эукариот, обладающий прионными свойствами. Так, были продемонстрированы прионоподобные свойства нейрональной изоформы белка СРЕВ (cytoplasmic polyadenilation element binding protein) улитки *Aplysia californica* [143]. СРЕВ – это трансляционный регулятор, стимулирующий полиаденилирование цитоплазматических мРНК и таким образом активирующий их трансляцию. Процесс полиаденилирования мРНК запускается связыванием СРЕВ с СРЕ (cytoplasmic polyadenilation element), располагающимся в 3'-UTR (3'-нетранслируемый район) активируемой мРНК. Прионоподобные свойства СРЕВ были выявлены при гетерологичной экспрессии этого белка в клетках дрожжей, так как дрожжи *S. cerevisiae* представляют собой удобную

генетическую систему для проверки прионных свойств белков. Аминоконцевой район СРЕВ необычайно богат глутамином и аспарагином (48%), что и позволило предположить его способность к прионизации. Было показано, что СРЕВ может существовать в двух состояниях – нативном и агрегированном, причем именно в агрегированном состоянии СРЕВ способен связываться с сигнальной последовательностью СРЕ и, тем самым, активировать трансляцию «молчащей» мРНК. Агрегированное активное состояние СРЕВ наследуется доминантно и передается с цитоплазмой.

Уровень СРЕВ возрастает в несколько раз в присутствии серотонина – медиатора, принимающего участие в синаптической пластичности, задействованной в процессах обучения и памяти [142]. Была предложена модель, согласно которой увеличение уровня экспрессии нейрональной формы СРЕВ способствует ее переходу в прионное состояние под действием серотонинового стимула [143]. Таким образом, в результате синаптической стимуляции, которая сопровождается мультимеризацией СРЕВ, может локально активироваться трансляция «молчащих» мРНК. Механизм передачи сигнала, включающий прионный переход, имеет преимущество, поскольку, как только прионное состояние достигнуто, оно само поддерживается без дополнительной стимуляции, обеспечивая возможность «хранения» информации уже поступившего импульса. Однако прионные свойства СРЕВ в нейронах *A. californica* пока еще не продемонстрированы.

Четыре гомолога гена СРЕВ были найдены в геноме мыши [156]. Продукт одного из этих генов СРЕВ-3 имеет аминоконцевой глутамин-богатый домен, продукт другого СРЕВ-4 несет пролин-богатый домен на N-конце, и оба белка способны агрегировать при экспрессии в дрожжевых клетках и в культуре нейронов [2]. Возможно, в скором времени будет доказано существование прионов млекопитающих, вовлеченных в процессы обучения и памяти.

Первоначально прионы были открыты как инфекционные агенты нового типа. Сейчас уже нет сомнений в том, что они представляют собой феномен общебиологического значения и, скорее всего, являются носителями биологической информации нового типа, информации, хранимой в конформации белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Aigle, M., and Lacroute, F.* (1975) *Mol. Gen. Genet.*, **136**, 327–335.
2. *Allen K.D., Si K., Theis M., and Kandel E.R.* (2005) in abstracts of PRION BIOLOGY – Joint Cold Spring Harbor Laboratory/ Wellcome Trust Conference.
3. *Allen, K.D., Wegrzyn, R.D., Chernova, T.A., Muller, S., Newnam, G.P., Winslett, P.A., Wittich, K.B., Wilkinson, K.D., and Chernoff, Y.O.* (2005) *Genetics*, **169**, 1227–1242.
4. *Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A., and Clarke, M.C.* (1967) *Nature*, **214**, 764–766.
5. *Bach, S., Talarek, N., Andrieu, T., Vierfond, J.M., Mettey, Y., Galons, H., Dormont, D., Meijer, L., Cullin, C., and Blondel, M.* (2003) *Nat. Biotechnol.*, **21**, 1075–1081.
6. *Bailleul, P.A., Newnam, G.P., Steenbergen, J.N., and Chernoff, Y.O.* (1999) *Genetics*, **153**, 81–94.
7. *Balguerie, A., Dos, R.S., Ritter, C., Chaignepain, S., Couлары-Salin, B., Forge, V., Bathany, K., Lascu, I., Schmitter, J.M., Riek, R., and Saupe, S.J.* (2003) *EMBO J.*, **22**, 2071–2081.
8. *Beauregard P.B., Guerin R., Senechal P., Collin P., and Rokeach L.A.* (2005) in abstracts of PRION BIOLOGY – Joint Cold Spring Harbor Laboratory/ Wellcome Trust Conference.
9. *Becker, J., Walter, W., Yan, W., and Craig, E.A.* (1996) *Mol. Cell Biol.*, **16**, 4378–4386.
10. *Bellinger-Kawahara, C.G., Kempner, E., Groth, D., Gabizon, R., and Prusiner, S.B.* (1988) *Virology*, **164**, 537–541.
11. *Bessen, R.A., Kocisko, D.A., Raymond, G.J., Nandan, S., Lansbury, P.T., and Caughey, B.* (1995) *Nature*, **375**, 698–700.
12. *Bessen, R.A., and Marsh, R.F.* (1994) *J. Virol.*, **68**, 7859–7868.
13. *Blattler, T., Brandner, S., Raeber, A.J., Klein, M.A., Voigtlander, T., Weissmann, C., and Aguzzi, A.* (1997) *Nature*, **389**, 69–73.
14. *Brachmann, A., Baxa, U., and Wickner, R.B.* (2005) *EMBO J.*, **24**, 3082–3092.
15. *Bradley, M.E., Edskes, H.K., Hong, J.Y., Wickner, R.B., and Liebman, S.W.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16392–16399.
16. *Bradley, M.E., and Liebman, S.W.* (2004) *Mol. Microbiol.*, **51**, 1649–1659.
17. *Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C., and Aguzzi, A.* (1996) *Nature*, **379**, 339–343.
18. *Brown J.C., and Lindquist S.L.* (2005) in abstracts of PRION BIOLOGY – Joint Cold Spring Harbor Laboratory/ Wellcome Trust Conference.
19. *Bruce, M., Chree, A., McConnell, I., Foster, J., Pearson, G., and Fraser, H.* (1994) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **343**, 405–411.
20. *Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S.B., Aguet, M., and Weissmann, C.* (1992) *Nature*, **356**, 577–582.
21. *Castilla, J., Saa, P., Hetz, C., and Soto, C.* (2005) *Cell*, **121**, 195–206.
22. *Caughey, B., Kocisko, D.A., Raymond, G.J., and Lansbury, P.T., Jr.* (1995) *Chem. Biol.*, **2**, 807–817.
23. *Caughey, B., Raymond, G.J., and Bessen, R.A.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 32230–32235.
24. *Chandler, R.L.* (1961) *Lancet*, **1**, 1378–1379.
25. *Chernoff, Y.O., Derkach, I.L., and Inge-Vechtomov, S.G.* (1993) *Curr. Genet.*, **24**, 268–270.
26. *Chernoff, Y.O., Lindquist, S.L., Ono, B., Inge-Vechtomov, S.G., and Liebman, S.W.* (1995) *Science*, **268**, 880–884.

27. Chernoff, Y.O., Newnam, G.P., Kumar, J., Allen, K., and Zink, A.D. (1999) *Mol. Cell Biol.*, **19**, 8103–8112.
28. Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J.M., et al. (1985) *Nature*, **315**, 331–333.
29. Chisholm, V.T., Lea, H.Z., Rai, R., and Cooper, T.G. (1987) *J. Bacteriol.*, **169**, 1684–1690.
30. Chiti, F., Stefani, M., Taddei, N., Ramponi, G., and Dobson, C.M. (2003) *Nature*, **424**, 805–808.
31. Clarke, A.R., Jackson, G.S., and Collinge, J. (2001) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **356**, 185–195.
32. Collin, P., Beauregard, P.B., Elagoz, A., and Rokeach, L.A. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 907–918.
33. Collinge, J., Palmer, M.S., Sidle, K.C., Gowland, I., Medori, R., Ironside, J., and Lantos, P. (1995) *Lancet*, **346**, 569–570.
34. Collinge, J., Sidle, K.C., Meads, J., Ironside, J., and Hill, A.F. (1996) *Nature*, **383**, 685–690.
35. Cooper, T. G. (1982) *Basic Life Sci.*, **19**, 143–161.
36. Cooper, T.G., Ferguson, D., Rai, R., and Bysani, N. (1990) *J. Bacteriol.*, **172**, 1014–1018.
37. Coschigano, P.W., and Magasanik, B. (1991) *Mol. Cell Biol.*, **11**, 822–832.
38. Cosson, B., Couturier, A., Chabelskaya, S., Kiktev, D., Inge-Vechtomov, S., Philippe, M., and Zhouravleva, G. (2002) *Mol. Cell Biol.*, **22**, 3301–3315.
39. Courchesne, W.E., and Magasanik, B. (1988) *J. Bacteriol.*, **170**, 708–713.
40. Coustou-Linares, V., Maddelein, M.L., Begueret, J., and Saube, S.J. (2001) *Mol. Microbiol.*, **42**, 1325–1335.
41. Coustou, V., Deleu, C., Saube, S., and Begueret, J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9773–9778.
42. Cox, B. (1965) *Heredity*, **20**, 505–521.
43. Cox, B., Ness, F., and Tuite, M. (2003) *Genetics*, **165**, 23–33.
44. Cox, B.S., Tuite, M.F., and McLaughlin, C.S. (1988) *Yeast*, **4**, 159–178.
45. Crozet, C., Lin, Y.L., Mettling, C., Mourton-Gilles, C., Corbeau, P., Lehmann, S., and Perrier, V. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 5591–5597.
46. Cyr, D.M., Lu, X., and Douglas, M.G. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 20927–20931.
47. DePace, A.H., Santoso, A., Hillner, P., and Weissman, J.S. (1998) *Cell*, **93**, 1241–1252.
48. DePace, A.H., and Weissman, J.S. (2002) *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 389–396.
49. Derkatch, I.L., Bradley, M.E., Hong, J.Y., and Liebman, S.W. (2001) *Cell*, **106**, 171–182.
50. Derkatch, I.L., Bradley, M.E., Masse, S.V., Zadorsky, S.P., Polozkov, G.V., Inge-Vechtomov, S.G., and Liebman, S.W. (2000) *EMBO J.*, **19**, 1942–1952.
51. Derkatch, I.L., Bradley, M.E., Zhou, P., Chernoff, Y.O., and Liebman, S.W. (1997) *Genetics*, **147**, 507–519.
52. Derkatch, I.L., Chernoff, Y.O., Kushnirov, V.V., Inge-Vechtomov, S.G., and Liebman, S.W. (1996) *Genetics*, **144**, 1375–1386.
53. Derkatch, I.L., Uptain, S.M., Outeiro, T.F., Krishnan, R., Lindquist, S.L., and Liebman, S.W. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12934–12939.
54. Dobson, C.M. (1999) *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 329–332.
55. Dobson, C.M. (2001) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **356**, 133–145.
56. Doel, S.M., McCready, S.J., Nierras, C.R., and Cox, B.S. (1994) *Genetics*, **137**, 659–670.
57. Dos, R.S., Couлары-Salin, B., Forge, V., Lascu, I., Begueret, J., and Saube, S.J. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 5703–5706.

58. *Eaglestone, S.S., Cox, B.S., and Tuite, M.F.* (1999) *EMBO J.*, **18**, 1974–1981.
59. *Eaglestone, S.S., Ruddock, L.W., Cox, B.S., and Tuite, M.F.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 240–244.
60. *Edskes, H.K., Gray, V.T., and Wickner, R.B.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1498–1503.
61. *Elghetany, M.T., and Saleem, A.* (1988) *Stain Technol.*, **63**, 201–212.
62. *Enari, M., Flechsig, E., and Weissmann, C.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9295–9299.
63. *Ferreira, P.C., Ness, F., Edwards, S.R., Cox, B.S., and Tuite, M.F.* (2001) *Mol. Microbiol.*, **40**, 1357–1369.
64. *Frolova, L., Le, G., X, Rasmussen, H.H., Cheperegin, S., Drugeon, G., Kress, M., Arman, I., Haenni, A.L., Celis, J.E., Philippe, M., et al.* (1994) *Nature*, **372**, 701–703.
65. *Gabriel, J.M., Oesch, B., Kretzschmar, H., Scott, M., and Prusiner, S.B.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9097–9101.
66. *Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J., and Alpers, M.* (1966) *Nature*, **209**, 794–796.
67. *Glatzel, M., and Aguzzi, A.* (2000) *J. Gen. Virol.*, **81**, 2813–2821.
68. *Glover, J.R., Kowal, A.S., Schirmer, E.C., Patino, M.M., Liu, J.J., and Lindquist, S.* (1997) *Cell*, **89**, 811–819.
69. *Glover, J.R., and Lindquist, S.* (1998) *Cell*, **94**, 73–82.
70. *Griffith, J.S.* (1967) *Nature*, **215**, 1043–1044.
71. *Grimminger, V., Richter, K., Imhof, A., Buchner, J., and Walter, S.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 7378–7383
72. *Hawthorne, D.C., and Leupold, U.* (1974) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **64**, 1–47.
73. *Hill, A.F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K.C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L.J., and Lantos, P.* (1997) *Nature*, **389**, 448–50, 526.
74. *Hoshino, S., Hosoda, N., Araki, Y., Kobayashi, T., Uchida, N., Funakoshi, Y., and Katada, T.* (1999) *Биохимия*, **64**, 1367–1372.
75. *Hosoda, N., Kobayashi, T., Uchida, N., Funakoshi, Y., Kikuchi, Y., Hoshino, S., and Katada, T.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 38287–38291.
76. *Инге-Вечтомов С.Г. и Адрианова В.М.* (1970) *Генетика* **6**, 103–115.
77. *Jarrett, J.T., and Lansbury, P.T., Jr.* (1993) *Cell*, **73**, 1055–1058.
78. *Jung, G., Jones, G., and Masison, D.C.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9936–9941.
79. *Kajava, A.V., Baxa, U., Wickner, R.B., and Steven, A.C.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7885–7890.
80. *Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C.M., Wallace, A.C., James, T.L., Cohen, F.E., and Prusiner, S.B.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10069–10074.
81. *King, C.Y., and Diaz-Avalos, R.* (2004) *Nature*, **428**, 319–323.
82. *King, C.Y., Tittmann, P., Gross, H., Gebert, R., Aebi, M., and Wuthrich, K.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6618–6622.
83. *Kishimoto, A., Hasegawa, K., Suzuki, H., Taguchi, H., Namba, K., and Yoshida, M.* (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 739–745.
84. *Kochneva-Pervukhova, N.V., Chechenova, M.B., Valouev, I.A., Kushnirov, V.V., Smirnov, V.N., and Ter-Avanesyan, M.D.* (2001) *Yeast*, **18**, 489–497.
85. *Kochneva-Pervukhova, N.V., Poznyakovski, A.I., Smirnov, V.N., and Ter-Avanesyan, M.D.* (1998) *Curr. Genet.*, **34**, 146–151.
86. *Komar, A.A., Lesnik, T., Cullin, C., Merrick, W.C., Trachsel, H., and*

- Altmann, M. (2003) *EMBO J.*, **22**, 1199–1209.
87. Krishnan, R., and Lindquist, S.L. (2005) *Nature*, **435**, 765–772.
88. Kryndushkin, D.S., Alexandrov, I.M., Ter-Avanesyan, M.D., and Kushnirov, V.V. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 49636–49643.
89. Kushnirov, V.V., Kryndushkin, D.S., Boguta, M., Smirnov, V.N., and Ter-Avanesyan, M.D. (2000) *Curr. Biol.*, **10**, 1443–1446.
90. Kushnirov, V.V., and Ter-Avanesyan, M.D. (1998) *Cell*, **94**, 13–16.
91. Kushnirov, V.V., Ter-Avanesyan, M.D., Telckov, M.V., Surguchov, A.P., Smirnov, V.N., and Inge-Vechtomov, S.G. (1988) *Gene*, **66**, 45–54.
92. Lacroute, F. (1971) *J. Bacteriol.*, **106**, 519–522.
93. Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.O., Riesner, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (2004) *Science*, **305**, 673–676.
94. Liebman, S.W., and Sherman, F. (1979) *J. Bacteriol.*, **139**, 1068–1071.
95. Lindquist, S. (1997) *Cell*, **89**, 495–498.
96. Liu, J.J., and Lindquist, S. (1999) *Nature*, **400**, 573–576.
97. Liu, J.J., Sondheimer, N., and Lindquist, S.L. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16446–16453.
98. Lopez, N., Aron, R., and Craig, E.A. (2003) *Mol. Biol. Cell*, **14**, 1172–1181.
99. Lund, P.M., and Cox, B.S. (1981) *Genet. Res.*, **37**, 173–182.
100. Ma, J., and Lindquist, S. (1999) *Nat. Cell Biol.*, **1**, 358–361.
101. Maddelein, M.L., Dos, R.S., Duvezin-Caubet, S., Couлары-Salin, B., and Saupe, S.J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7402–7407.
102. Maddelein, M.L., and Wickner, R.B. (1999) *Mol. Cell Biol.*, **19**, 4516–4524.
103. Magasanik, B. (1992) *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*, 2nd ed/ Jones, E.W., Pringle, J.R., Broach, J.R., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 283–314.
104. Masison, D.C., and Wickner, R.B. (1995) *Science*, **270**, 93–95.
105. McKinley, M.P., Bolton, D.C., and Prusiner, S.B. (1983) *Cell*, **35**, 57–62.
106. Michelitsch, M.D., and Weissman, J.S. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11910–11915.
107. Moriyama, H., Edskes, H.K., and Wickner, R. B. (2000) *Mol. Cell Biol.*, **20**, 8916–8922.
108. Nelson, R., Sawaya, M.R., Balbirnie, M., Madsen, A.O., Riekel, C., Grothe, R., and Eisenberg, D. (2005) *Nature*, **435**, 773–778.
109. Ness, F., Ferreira, P., Cox, B.S., and Tuite, M.F. (2002) *Mol. Cell Biol.*, **22**, 5593–5605.
110. Newnam, G.P., Wegrzyn, R.D., Lindquist, S.L., and Chernoff, Y.O. (1999) *Mol. Cell Biol.*, **19**, 1325–1333.
111. Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E., et al. (1985) *Cell*, **40**, 735–746.
112. Ohba, M. (1997) *FEBS Lett.*, **409**, 307–311.
113. Oka, M., Nakai, M., Endo, T., Lim, C.R., Kimata, Y., and Kohno, K. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 29727–29737.
114. Osherovich, L.Z., Cox, B.S., Tuite, M.F., and Weissman, J.S. (2004) *PLoS. Biol.*, **2**, E86.
115. Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick,

- R.J., Cohen, F.E., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 10962–10966.
116. *Parchi, P., Castellani, R., Capellari, S., Ghetti, B., Young, K., Chen, S.G., Farlow, M., Dickson, D.W., Sima, A.A., Trojanowski, J.Q., Petersen, R.B., and Gambetti, P.* (1996) *Ann. Neurol.*, **39**, 767–778.
117. *Parham, S.N., Resende, C.G., and Tuite, M.F.* (2001) *EMBO J.*, **20**, 2111–2119.
118. *Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A., and Lindquist, S.* (1994) *Nature*, **372**, 475–478.
119. *Patino, M.M., Liu, J.J., Glover, J.R., and Lindquist, S.* (1996) *Science*, **273**, 622–626.
120. *Pattison, I.H.* (1965) *Slow, latent and temperate virus infections*, NINDB Monograph 2./G.J.Gajdusek, G.J.Gibbs & M.P.Alpers, Washington. DC: US Government Printing, 249–257.
121. *Paushkin, S.V., Kushnirov, V.V., Smirnov, V.N., and Ter-Avanesyan, M.D.* (1996) *EMBO J.*, **15**, 3127–3134.
122. *Paushkin, S.V., Kushnirov, V.V., Smirnov, V.N., and Ter-Avanesyan, M.D.* (1997) *Science*, **277**, 381–383.
123. *Peretz, D., Williamson, R.A., Kaneko, K., Vergara, J., Leclerc, E., Schmitt-Ulms, G., Mehlhorn, I.R., Legname, G., Wormald, M.R., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Burton, D.R., and Prusiner, S.B.* (2001) *Nature*, **412**, 739–743.
124. *Perutz, M.F., Finch, J.T., Berriman, J., and Lesk, A.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5591–5595.
125. *Perutz, M.F., Johnson, T., Suzuki, M., and Finch, J.T.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5355–5358.
126. *Perutz, M.F., Pope, B.J., Owen, D., Wanker, E.E., and Scherzinger, E.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5596–5600.
127. *Prusiner, S.B.* (1982) *Science*, **216**, 136–144
128. *Prusiner, S.B.* (1991) *Science*, **252**, 1515–1522
129. *Prusiner, S.B.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13363–13383.
130. *Prusiner, S.B., Garfin, D.E., Cochran, S.P., Baringer, J.R., Hadlow, W.J., Eklund, C.M., and Race, R.E.* (1978) *Trans. Am. Neurol. Assoc.*, **103**, 62–64.
131. *Prusiner, S.B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S.L., Serban, D., Carlson, G.A., et al.* (1990) *Cell*, **63**, 673–686.
132. *Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., and Wuthrich, K.* (1996) *Nature*, **382**, 180–182.
133. *Rivera-Milla, E., Stuermer, C. A., and Malaga-Trillo, E.* (2003) *Trends Genet.*, **19**, 72–75.
134. *Saborio, G.P., Permanne, B., and Soto, C.* (2001) *Nature*, **411**, 810–813.
135. *Salnikova, A.B., Kryndushkin, D.S., Smirnov, V.N., Kushnirov, V.V., and Ter-Avanesyan, M.D.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 8808–8812.
136. *Santoso, A., Chien, P., Osherovich, L.Z., and Weissman, J.S.* (2000) *Cell*, **100**, 277–288.
137. *Saupe, S.J.* (2000) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 489–502.
138. *Schwimmer, C., and Masison, D.C.* (2002) *Mol. Cell Biol.*, **22**, 3590–3598.
139. *Selkoe, D.J.* (2003) *Nature*, **426**, 900–904.
140. *Serio, T.R., Cashikar, A.G., Kowal, A.S., Sawicki, G.J., Moslehi, J.J., Serpell, L., Arnsdorf, M.F., and Lindquist, S.L.* (2000) *Science*, **289**, 1317–1321.

141. Shorter, J., and Lindquist, S. (2004) *Science*, **304**, 1793–1797.
142. Si, K., Giustetto, M., Etkin, A., Hsu, R., Janisiewicz, A.M., Miniaci, M.C., Kim, J.H., Zhu, H., and Kandel, E.R. (2003) *Cell*, **115**, 893–904.
143. Si, K., Lindquist, S., and Kandel, E.R. (2003) *Cell*, **115**, 879–891.
144. Sigurdsson, E.M., Sy, M.S., Li, R., Scholtzova, H., Kasczak, R.J., Kasczak, R., Carp, R., Meeker, H.C., Frangione, B., and Wisniewski, T. (2003) *Neurosci. Lett.*, **336**, 185–187.
145. Sipe, J.D., and Cohen, A.S. (2000) *J. Struct. Biol.*, **130**, 88–98.
146. Sondheimer, N., and Lindquist, S. (2000) *Mol. Cell*, **5**, 163–172.
147. Sondheimer, N., Lopez, N., Craig, E.A., and Lindquist, S. (2001) *EMBO J.*, **20**, 2435–2442.
148. Soto, C., Kasczak, R.J., Saborio, G.P., Aucouturier, P., Wisniewski, T., Prelli, F., Kasczak, R., Mendez, E., Harris, D.A., Ironside, J., Tagliavini, F., Carp, R.I., and Frangione, B. (2000) *Lancet*, **355**, 192–197.
149. Stahl, N., Baldwin, M.A., Teplow, D.B., Hood, L., Gibson, B.W., Burlingame, A.L., and Prusiner, S.B. (1993) *Biochemistry*, **32**, 1991–2002.
150. Stansfield, I., Jones, K.M., Kushnirov, V.V., Dagkesamanskaya, A.R., Poznyakovski, A.I., Paushkin, S.V., Nier-ras, C.R., Cox, B.S., Ter-Avanesyan, M.D., and Tuite, M.F. (1995) *EMBO J.*, **14**, 4365–4373.
151. Sunde, M., and Blake, C. (1997) *Adv. Protein Chem.*, **50**, 123–159.
152. Tanaka, M., Chien, P., Naber, N., Cooke, R., and Weissman, J.S. (2004) *Nature*, **428**, 323–328.
153. Telling, G.C., Parchi, P., DeArmond, S.J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P., and Prusiner, S.B. (1996) *Science* **274**, 2079–2082.
154. Ter-Avanesyan, M.D., Dagkesamanskaya, A.R., Kushnirov, V.V., and Smirnov, V.N. (1994) *Genetics*, **137**, 671–676.
155. Ter-Avanesyan, M.D., Kushnirov, V.V., Dagkesamanskaya, A.R., Didichenko, S.A., Chernoff, Y.O., Inge-Vechtomov, S.G., and Smirnov, V.N. (1993) *Mol. Microbiol.*, **7**, 683–692.
156. Theis, M., Si, K., and Kandel, E.R. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9602–9607.
157. True, H.L., and Lindquist, S.L. (2000) *Nature*, **407**, 477–483.
158. Tuite, M.F., Mundy, C.R., and Cox, B.S. (1981) *Genetics*, **98**, 691–711.
159. Turoscy, V., and Cooper, T.G. (1987) *J. Bacteriol.*, **169**, 2598–2600.
160. Uptain, S.M., Sawicki, G.J., Caughey, B., and Lindquist, S. (2001) *EMBO J.*, **20**, 6236–6245.
161. Valouev, I.A., Kushnirov, V.V., and Ter Avanesyan, M.D. (2002) *Cell Motil. Cytoskeleton*, **52**, 161–173.
162. Volkov, K.V., Aksenova, A.Y., Soom, M.J., Osipov, K.V., Svitin, A.V., Kurischko, C., Shkundina, I.S., Ter-Avanesyan, M.D., Inge-Vechtomov, S.G., and Mironova, L.N. (2002) *Genetics*, **160**, 25–36.
163. Wegrzyn, R.D., Bapat, K., Newnam, G.P., Zink, A.D., and Chernoff, Y.O. (2001) *Mol. Cell Biol.*, **21**, 4656–4669.
164. White, A. R., Enever, P., Tayebi, M., Mushens, R., Linehan, J., Brandner, S., Anstee, D., Collinge, J., and Hawke, S. (2003) *Nature*, **422**, 80–83.
165. Wickner, R.B. (1994) *Science*, **264**, 566–569.
166. Zhou, P., Derkatch, I.L., Uptain, S.M., Patino, M.M., Lindquist, S., and Liebman, S.W. (1999) *EMBO J.*, **18**, 1182–1191.

167. *Zhouravleva, G., Frolova, L., Le, G., X, Le Guellec, R., Inge-Véchtomov,*

S., Kisselev, L., and Philippe, M.
(1995) *EMBO J.*, **14**, 4065–4072.