

## МЕЖВИДОВАЯ ПЕРЕДАЧА ПРИОНОВ

©2011 г. Е. Г. АФАНАСЬЕВА, В. В. КУШНИРОВ,  
М. Д. ТЕР-АВАНЕСЯН

*Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва*

I. Введение. II. Межвидовая передача прионных болезней. III. Аминокислотные замены в белке PrP, влияющие на передачу прионов. IV. Прионы низших эукариот. V. Дрожжевые модели для изучения межвидовой передачи прионов. VI. Межвидовая передача приона [URE3]. VII. Прион [PSI<sup>+</sup>]. VIII. Передача прионного состояния между белками Sup35 из дрожжей, относящихся к разным родам. IX. Передача прионного состояния между белками Sup35 из близкородственных видов дрожжей. X. Мутации в гене SUP35, влияющие на передачу приона [PSI<sup>+</sup>]. XI. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Прионы изначально были выявлены как инфекционные агенты белковой природы, вызывающие трансмиссивные губчатые энцефалопатии человека и животных, такие, как, например, болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ), синдром Герстманна-Штраусслера-Шейнкера и куру человека, а также скрейпи овец и губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота (коровье бешенство). Эти неизлечимые заболевания сопровождаются морфологическими изменениями тканей мозга, связанными с накоплением амилоидоподобных структур. Несмотря на то, что некоторые из этих болезней известны давно (БКЯ – около 100 лет, а скрейпи овец – с середины XVIII века), их этиология стала понятна лишь во второй половине XX века.

Существенную роль в выявлении этиологии этих заболеваний сыграло обнаружение сходства нейропатологий при БКЯ, куру и скрейпи. В 1959 г. В. Хэдлоу выдвинул гипотезу об инфекционности куру, заболевания, распространенного у аборигенов о. Новая Гвинея, практикующих каннибализм, которую он предложил проверить

---

*Принятые сокращения:* а.к. – аминокислота; PrP – прионный белок млекопитающих; PrP<sup>C</sup> – нормальная клеточная форма прионного белка; PrP<sup>Sc</sup> – инфекционная форма прионного белка; PRNP – ген, кодирующий белок PrP.

*Адрес для корреспонденции:* mdter@inbi.ras.ru

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ и грантов РФФИ № 08-04-00062-а, 11-04-00442-а, Wellcome Trust № 081991/Z/07/Z.

путём интрацеребральной инокуляции шимпанзе гомогенатов мозга пациентов, умерших от куру [1]. Эта гипотеза впоследствии была подтверждена К. Гайдушеком с соавторами, которые обнаружили, что у шимпанзе при инъекции гомогенатов мозга таких пациентов развивается болезнь, сходная со скрейпи по всем патологическим проявлениям [2]. В свою очередь, было установлено, что скрейпи также относится к трансмиссивным заболеваниям, поскольку эту болезнь оказалось возможным экспериментально передавать мышам [3].

Примерно в то же время было показано, что агент, вызывающий скрейпи, необычайно устойчив к различным воздействиям, инактивирующим большинство известных видов бактерий и вирусов, таким, как высокая температура, фиксация формальдегидом [4] и облучение УФ светом [5]. Это привело к предположению, что агент скрейпи способен реплицироваться в отсутствие нуклеиновой кислоты [6]. В 1967 году Д. Гриффит предложил несколько гипотез о распространении и наследовании этих заболеваний, в том числе и будущую прионную гипотезу: «...субъединицы могут полимеризоваться только в присутствии уже имеющихся «конденсационных ядер» полимеров» [7]. Очистка инфекционного материала выявила агент массой 27–30 кДа, основной компонент которого имел белковую природу. Его инфекционность лишь частично инактивировалась протеиназой К, мочевиной и другими агентами, нарушающими структуру белков. Этот агент был назван прионом (от *proteinaceous infectious particle*), а белок – PrP (*Prion Protein*) [8]. Идентификация гена *PRNP*, кодирующего PrP [9] показала, что не присутствие, а особое конформационное состояние этого белка связано с болезнью. Позже гомологи гена *PRNP* были обнаружены не только у млекопитающих, но и у птиц [10] и рыб [11]. На рис. 1 приведено сравнение аминокислотных последовательностей белка PrP из некоторых видов млекопитающих.

Прионный белок PrP заякорен на внешней стороне клеточной мембраны при помощи гликозил-фосфатидилинозитола и синтезируется в основном в клетках нервной системы и лимфоретикулярной ткани [12]. Его функция до сих пор полностью не выяснена, хотя недавно было показано участие нейронального PrP<sup>C</sup> в формировании миелиновой оболочки нервных волокон [13].

Рис. 1. Сравнение первичных структур белков PrP (без сигнальной последовательности) некоторых видов млекопитающих и прионных доменов белка Sup35 четырех видов дрожжей *Saccharomyces*.

Приведены первичные структуры PrP человека и прионного домена Sup35 *S. cerevisiae* и аминокислотные остатки, по которым от них отличаются остальные белки. Серым цветом отмечен метионин-129 в белке PrP человека.



Прионная изоформа белка PrP (PrP<sup>Sc</sup>, где Sc от scrapie) отличается от нормальной клеточной, неприонной формы (PrP<sup>C</sup>, где C от cellular) вторичной структурой. Так, форма PrP<sup>C</sup> обогащена  $\alpha$ -спиральными участками и почти не содержит  $\beta$ -слои, в то время как форма PrP<sup>Sc</sup> имеет в основном  $\beta$ -складчатую структуру [14]. Инфекционная форма белка PrP, попадая в организм извне или возникая в нем спонтанно, способствует превращению обычного PrP<sup>C</sup> в патогенный PrP<sup>Sc</sup> посредством белок-белковых взаимодействий. Патогенная форма PrP<sup>Sc</sup> устойчива к протеолизу и поэтому накапливается в тканях мозга больных в виде бляшек, содержащих нитевидные или палочкообразные агрегаты этого белка.

Одним из фундаментальных свойств прионов является возможность их существования в виде различных вариантов (штаммов), в основе которых лежат различия в укладке прионной формы белка PrP. Штаммы PrP<sup>Sc</sup> с различными конформациями обуславливают вариации в характере прионных заболеваний: могут различаться инкубационные периоды, клинические проявления, повреждаться разные отделы мозга. Штаммовые различия прионов стабильно поддерживаются *in vivo*. Это означает, что если инфицировать лабораторных животных разными штаммами PrP<sup>Sc</sup>, то при развитии болезни у них будет поддерживаться именно тот штамм приона, которым их инфицировали [15, 16].

## II. МЕЖВИДОВАЯ ПЕРЕДАЧА ПРИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Способность прионов передаваться между особями разных видов была использована для доказательства трансмиссивности прионных болезней и создания эффективных экспериментальных моделей прионных заболеваний, основанных на лабораторных животных, таких как мыши и хомяки. При этом выяснилось, что наиболее эффективно губчатые энцефалопатии передаются особям того же вида или близкородственных видов. Например, БКЯ передаётся от человека человеку, и от человека шимпанзе; скрейпи же передаётся между овцами и козами, но не передаётся шимпанзе и человеку [8]. Прионные заболевания крупного рогатого скота могут передаваться человеку с пищей, хотя и с малой вероятностью. Таким образом, несмотря на то, что межвидовая передача прионов возможна, она часто ограничена межвидовыми барьерами. Термин «межвидовой барьер» может означать как невозможность передачи приона, так и значительное увеличение инкубационного периода заболевания после передачи инфекционного агента, или понижение вероятности передачи забо-

левания [17]. В одной из первых работ по межвидовой передаче прионов было показано, что после интрацеребрального введения хомякам инфекционного агента трансмиссивной энцефалопатии норки инкубационный период заболевания составлял более 600 дней, что в несколько раз превышало значение инкубационного периода при его внутривидовой передаче [18].

Очевидно, что за межвидовой барьер передачи прионных болезней могут быть ответственны различия аминокислотных последовательностей белков PrP. Данная гипотеза была проверена экспериментально. Было показано, что прионы хомяка эффективно инфицировали трансгенных мышей с геном *PRNP* хомяка, но не инфицировали мышей дикого типа [19]. Надо отметить, что барьер прионной трансмиссии не всегда является симметричным. Известны случаи, когда прионы не передаются от одного вида другому, в то время как в обратном направлении барьер трансмиссии либо отсутствует, либо слабо выражен. Например, при передаче прионного состояния от мыши сирийскому хомяку признаки заболевания появлялись на 378 день [20, 21], а при передаче от сирийского хомяка мыши заболевание не развивалось даже по истечении двух лет [22].

Барьеры межвидовой трансмиссии прионов и их асимметричность могут быть выявлены и *in vitro*. Например, в бесклеточной системе белок PrP<sup>C</sup> хомяка переходил в протеазоустойчивое прионоподобное состояние в присутствии белка PrP<sup>Sc</sup> мыши. Однако в противоположной ситуации, при инкубации белка PrP<sup>C</sup> мыши в присутствии PrP<sup>Sc</sup> хомяка, уровень прионного перехода был незначительным, что согласовалось с результатами, полученными *in vivo* [23].

Следует отметить, что и эффективность межвидовой передачи заболевания и продолжительность его инкубационного периода могут зависеть от штамма передаваемого приона [24]. К примеру, при передаче двух разных изолятов приона PrP<sup>Sc</sup> норки сирийским хомякам были обнаружены различия в продолжительности инкубационного периода заболевания и в характере поражения головного мозга. В одном случае болезнь проявлялась на 65 день после инокуляции и сопровождалась гиперестезией и мозжечковой атаксией, в то время как в другом развитие заболевания наблюдалось только на 168 день, причем оно сопровождалось летаргией и отсутствием мозжечковой атаксии. Пожалуй, наиболее яркий пример штаммовой зависимости переноса прионов связан с использованием лабораторных животных при моделировании новой прионной болезни человека – нвБКЯ (новый вариант БКЯ, возникающий в результате заражения коровьим бешенством). Хотя БКЯ с трудом передается мышам дикого типа, она

эффективно передавалась трансгенным мышам, экспрессирующим PrP человека. Что особенно удивительно, передача нвБКЯ мышам дикого типа происходила значительно эффективнее, чем мышам гомозиготным по гену *PRNP* человека. При этом штаммы приона были сформированы одним и тем же белком – PrP человека [25].

Таким образом, эффективность межвидовой передачи зависит от штамма передаваемого приона. Вместе с тем, иногда при межвидовой передаче может происходить и изменение свойств приона. Так, при передаче скрейпи от овцы мыши с промежуточными пассажами в белых крысах было обнаружено изменение свойств скрейпи, которое в конечном итоге приводило к отличиям в картине поражения головного мозга по сравнению с таковыми при передаче скрейпи напрямую от овцы мыши [26]. Эти наблюдения позволили заключить, что инфекционный агент может изменяться в новом хозяине, однако природа подобных индуцированных изменений оставалась не понятной. По мере обнаружения все новых случаев «мутаций» скрейпи [27] стало очевидно, что подобные изменения свойств приона не являются исключениями [18, 27].

Изменчивость прионов может способствовать возникновению их гетерогенности, выявляемой при межвидовой передаче. Так, агент трансмиссивной энцефалопатии норки, выделенный из одного источника, был передан семи китайским хомякам, у которых признаки заболевания проявились через 600 дней после интрацеребральной инокуляции. Последующее инфицирование хомяков гомогенатами мозга особей первого пассажа позволило выявить два штамма трансмиссивной энцефалопатии, характеризующихся разными инкубационными периодами заболевания. Кроме того, были обнаружены различия в картине поражения головного мозга при инфицировании разными штаммами трансмиссивной энцефалопатии [28].

Гетерогенность прионов была обнаружена и при их пассировании в культурах клеток [29]. Две разные клеточные линии мышинной нейробластомы N2a (PK1 и R33) были инфицированы гомогенатом головного мозга больной мыши. В течение нескольких поколений в клетках линии PK1 произошло изменение свойств исходного инфекционного агента: прионы клеток PK1 более не могли инфицировать клетки R33, в то время, как исходные прионы, непосредственно выделенные из гомогената мозга, успешно заражали её. Культуры клеток могут быть «излечены» от прионов при помощи свайнсонина – ингибитора  $\alpha$ -маннозидазы II аппарата Гольджи, нарушающей образование N-связанных гликанов, хотя чувствительность к этому агенту зависит от штамма приона. Было обнаружено, что клетки PK1, культивируемые

в отсутствие свайнсоина, теряли прионы после его добавления в среду, тогда как прионы клеток этой же линии, культивируемых в присутствии свайнсоина, были к нему устойчивы. Это означает, что исходная популяция прионов была изначально гетерогенной, а условия среды влияли на размножение их разных штаммов.

### III. АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ В БЕЛКЕ PRP, ВЛИЯЮЩИЕ НА ПЕРЕДАЧУ ПРИОНОВ

При экспериментальном заражении трансмиссивной энцефалопатией норки представителей двух видов куньих, чёрного хорька и норки, была обнаружена различная восприимчивость к инфекционному агенту: инкубационный период у хорьков составлял 28–38 месяцев, а у норки 4 месяца. Первичные структуры белков PrP норки и чёрного хорька отличаются по двум аминокислотным остаткам: вместо фенилаланина-179 и аргинина-224 у хорька присутствуют остатки лизина и глутамина, соответственно [30]. Следует, однако, отметить, что не только межвидовые различия аминокислотных последовательностей PrP<sup>Sc</sup> и PrP<sup>C</sup>, но и встречающиеся в природе аллельные варианты *PRNP* оказывают значительное влияние на эффективность передачи прионной инфекции. Например, овцы, гомозиготные по аллели *PRNP*, кодирующей PrP с остатком валина в 136 положении, более восприимчивы к скрейпи, чем овцы гомозиготные по аллели, кодирующей белок с остатком аланина в этом положении [31], а гомозиготность по аллели кодирующей белок с аргинином-171 обеспечивает устойчивость к скрейпи [31, 32].

Исследование частот аллелей гена *PRNP* у аборигенов о. Новая Гвинея, практикующих каннибализм, показало, что у людей существенное влияние на восприимчивость к прионным болезням может оказывать полиморфизм по остаткам валина и метионина в положении 129 PrP (рис. 1): гетерозиготность по соответствующим аллелям, по всей видимости, увеличивала устойчивость к куру [33]. Помимо этого было показано, что наличие в 127 положении валина вместо глицина приводило к повышению устойчивости к куру у людей гомозиготных по метиониновому кодону 129 [34]. Интересно, что полиморфизм PrP по этому положению, видимо, влияет и на межвидовую передачу прионов, поскольку случаи заболевания нвБКЯ выявлены только у людей гомозиготных по аллели *PRNP*, кодирующей метионин-129 [35]. Эксперименты с использованием трансгенных мышей показали, что белок PrP человека с валином-129 не способен поддерживать прионное состояние, свойственное штамму коровьего бешенства, а

инфицирование таких мышей сопровождается с изменением штаммовой характеристики приона [36]. С другой стороны, замена одного аминокислотного остатка в белке PrP другим остатком может приводить к образованию варианта белка, который не только не способен воспринимать прионное состояние PrP<sup>Sc</sup>, но и ингибирует его поддержание [37].

Таким образом, восприимчивость к различным формам трансмиссивной энцефалопатии может зависеть не только от межвидовых различий аминокислотных последовательностей прионных белков, но и от их внутривидового полиморфизма, причем некоторые аминокислотные замены могут увеличивать восприимчивость к инфекционному агенту, в то время как другие, наоборот, снижают риск его передачи.

#### IV. ПРИОНЫ НИЗШИХ ЭУКАРИОТ

Работы по исследованию межвидовой передачи прионных заболеваний у животных достаточно трудоёмки, дорогостоящи и требуют затрат большого количества времени. Использование для этих целей культур клеток млекопитающих более продуктивно, хотя существуют проблемы с получением стабильных клеточных линий с PrP в прионной форме. Наконец, хотя эксперименты *in vitro* и позволяют получать информацию о взаимодействии PrP<sup>Sc</sup> с PrP<sup>C</sup> из разных видов, их результаты не всегда согласуются с данными, полученными *in vivo* [38].

Прионы обнаружены не только у млекопитающих, но и у низших эукариот, у которых они обуславливают наследование фенотипических признаков, то есть представляют собой генетические детерминанты. К настоящему времени у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* обнаружено 10 различных прионных детерминантов и один детерминант обнаружен у мицелиального гриба *Podospora anserina*. Эти генетические детерминанты основаны на прионных свойствах совершенно разных в структурном и функциональном отношении белков и имеют разные фенотипические проявления. Сверхпродукция прионогенных белков дрожжей стимулирует возникновение соответствующих им прионных детерминантов, причем обычно их возникновение зависит от наличия в клетке приона [*PIN*<sup>+</sup>], не имеющего самостоятельного фенотипического проявления [39, 40].

Большинство прионных детерминантов низших эукариот основаны на способности соответствующих белков образовывать наследуемые амилоидные полимеры устойчивые к таким сильным детергентам, как додецил сульфат натрия или саркозил. Такие полимеры отличаются от



прочих белковых агрегатов способностью катализировать свой собственный рост, служа матрицей (затравкой) для полимеризации белка, из которого они состоят. Наследование прионов дрожжей критически зависит от действия шаперона Hsp104 и его ко-шаперонов, которые фрагментируют прионные фибриллы, таким образом, размножая их и ускоряя совокупную полимеризацию прионного белка [41, 42]. У дрожжей были обнаружены и ненаследуемые детергент-устойчивые амилоиды, образующиеся при сверхпродукции белка Sup35 в клетках, содержащих прион  $[PIN^+]$ . Эти амилоиды не фрагментируются шапероном Hsp104 и потому не наследуются, а существуют лишь вследствие частой инициации их образования на матрице прионных полимеров  $[PIN^+]$  [43]. Можно предполагать, что распознавание прионов дрожжей шапероном Hsp104 и их фрагментация определяются особой укладкой прионных доменов, для которой характерно экспонирование гидрофобных аминокислотных остатков [44].

В отличие от прионов млекопитающих, прионы дрожжей не приводят к гибели клеток. Тем не менее, вопрос об их возможном биологическом значении остается открытым. Высказываются мнения о том, что прионное превращение белка – это аномалия, связанная с нарушением нормальной укладки белковой молекулы, а появление прионов в клетке приводит к «болезни», так как клетка теряет какие-то функции в результате перехода белка в агрегированное состояние [45]. С другой стороны не исключено, что переход некоторых белков в прионную форму может предоставлять адаптивные преимущества клеткам дрожжей [46–50].

Как объект исследования, прионы дрожжей имеют ряд явных преимуществ по сравнению с прионами млекопитающих: эксперименты с прионами дрожжей не занимают много времени, а сами они не представляют опасности для человека. Использование дрожжевой системы позволило получить убедительные доказательства прионной концепции, а также воспроизвести основные свойства прионов млекопитающих, такие, как существование штаммового разнообразия и барьеров межвидовой трансмиссии.

## **V. ДРОЖЖЕВЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕЖВИДОВОЙ ПЕРЕДАЧИ ПРИОНОВ**

У дрожжей межвидовую передачу прионов изучают, используя клетки *S. cerevisiae*, которые содержат либо собственный прионный ген, либо его гомолог из другого вида дрожжей. Таким образом, фактически в этих экспериментах исследуют передачу прионного состояния между

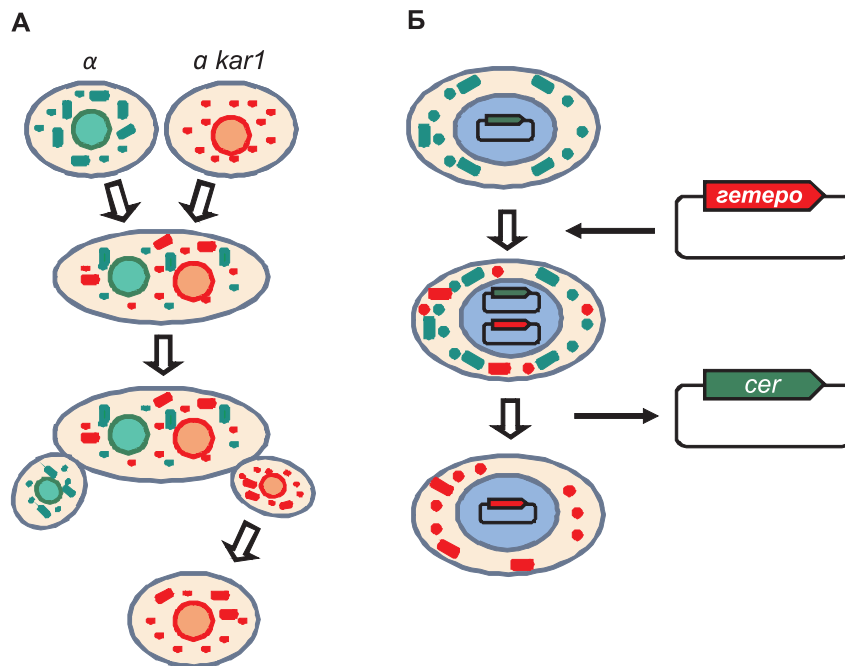


Рис. 2. Способы анализа межвидовой передачи прионов у дрожжей *S. cerevisiae*.

Слева (А), способ, основанный на использовании цитодукции, справа (Б) – на смене плазмид.  $a$  и  $\alpha$  – типы спаривания дрожжей, *kar1* – мутация, блокирующая кариогамии. Прямоугольники – прионные полимеры, кружки – неприонная (мономерная) форма прионного белка. *cer* – плаزمида кодирует белок *S. cerevisiae*, *hetero* – кодирует гетерологичные прионные белки.

белками из разных видов дрожжей в клетках *S. cerevisiae*. Передача прионного состояния производится одним из двух способов (рис. 2). Первый способ основан на цитодукции – методе скрещивания с использованием мутантов, дефектных по кариогамии, при котором происходит слияние цитоплазмы клеток без слияния ядер. При таком слиянии клеток гетерологичный прионный белок, продуцируемый клеткой-реципиентом, контактирует с прионом клетки-донора и может приобрести прионное состояние. В результате последующего митотического деления образуются гаплоидные клетки с ядром того или иного из родителей. О передаче приона судят по наличию прионного детерминанта в клетках, имеющих ядро реципиента. Второй способ предполагает смену плазмид. Исходная клетка содержит прионный детерминант, причем ген прионного белка расположен на центромерной (однокопийной) плазмиде и удален из хромосомы.

В эту клетку вводят центромерную плазмиду с гетерологичным прионным геном, а затем теряют исходную плазмиду. Если после этого прионный детерминант сохраняется, то это означает, что белок, кодируемый гетерологичным геном, приобрел прионное состояние, то есть передача приона осуществилась.

Хотя в настоящее время известно довольно много прионов дрожжей, барьеры межвидовой трансмиссии показаны только для двух из них, [*PSI*<sup>+</sup>] и [*URE3*] [51–57].

## VI. МЕЖВИДОВАЯ ПЕРЕДАЧА ПРИОНА [*URE3*]

Детерминант [*URE3*] отражает прионное состояние белка Ure2, транскрипционного регулятора азотной катаболитной репрессии. Прионным доменом Ure2 является его аминоконцевая последовательность (1–94 а.к.), обогащенная глутаминовыми и аспарагиновыми остатками [58], а карбоксиконцевой домен (95–354 а.к.) отвечает за катаболитную репрессию [59]. Переход аминоконцевого домена Ure2 в прионное состояние, называемое [*URE3*], инактивирует белок, что приводит к активации транскрипции генов, ответственных за импорт в клетку «непредпочтительных» источников азота, репрессированной в присутствии его «предпочитаемых» источников, таких как сульфат аммония или глутамин. Таким образом, фенотипически [*URE3*] выявляется по способности использовать уреидосукцинат из среды, богатой солями аммония. В настоящее время разработан и другой способ фенотипической идентификации [*URE3*].

Для белков Ure2 из близкородственных видов дрожжей рода *Saccharomyces* было продемонстрировано большинство закономерностей межвидовых барьеров трансмиссии, обнаруженных для белка PrP [57]. При этом уровень сходства белков Ure2 был сходен с таковым для белков PrP из разных видов млекопитающих. В частности, было показано, что вероятность передачи [*URE3*] может варьировать от 0 до почти 100%, в зависимости от различий аминокислотных последовательностей взаимодействующих белков и от варианта (у дрожжей штаммы прионов обычно называют вариантами) передаваемого приона. Интересно, что передаваемая прионная конформация могла сохраняться гетерологичным белком-реципиентом. Это наблюдали при передаче прионного состояния от белка Ure2 *S. cerevisiae* белку Ure2 *S. mikatae* и затем обратно белку Ure2 *S. cerevisiae*. Таким образом, белок Ure2 *S. mikatae* мог, по всей видимости, сохранять и воспроизводить прионную конформацию, свойственную белку *S. cerevisiae*.

Результаты изучения межвидовых барьеров прионной передачи на примере белка Ure2 подтверждают уместность использования дрожжевой модели для выявления фундаментальных закономерностей межвидовых барьеров передачи прионов у млекопитающих. Однако наиболее полно у дрожжей межвидовая передача прионов исследована при использовании [*PSI*<sup>+</sup>].

## VII. ПРИОН [*PSI*<sup>+</sup>]

Детерминант [*PSI*<sup>+</sup>] является, пожалуй, наиболее исследованным прионом дрожжей. [*PSI*<sup>+</sup>] имеет нонсенс-супрессорный фенотип, обусловленный агрегацией и связанной с этим частичной инактивацией фактора терминации трансляции Sup35 (eRF3) [41, 60, 61]. Белок Sup35 состоит из трех доменов [62]. Его аминоконцевой домен N (1–123 а.к.), отвечающий за прионные свойства белка, имеет необычно высокое содержание остатков аспарагина и глутамина, совокупно превышающее 50%. Именно этот домен полимеризуется в клетках [*PSI*<sup>+</sup>] [63, 64]. Прионный домен Sup35 можно разделить на две структурно различные области. Начало прионного домена (1–40 а.к.) особенно богато остатками аспарагина и глутамина, следующая за ним область (41–97 а.к.) содержит пять с половиной олигопептидных повторов. Карбоксиконцевой домен C (254–685 а.к.) обеспечивает функцию белка в терминации трансляции. Срединный домен M (124–253 а.к.) богат заряженными остатками – 42% лизина и глутаминовой кислоты. Функция этого района не ясна, он слабо структурирован и, вероятно, является элементом, позволяющим пространственное разделение N и C доменов [65]. Домены N и M гораздо менее консервативны, чем домен C. Подобно прионам млекопитающих и детерминантам [*URE3*] и [*PIN*<sup>+</sup>] дрожжей, [*PSI*<sup>+</sup>] имеет варианты, различающиеся по своим свойствам [66, 67]. Эти различия отражают вариации укладки Sup35 в прионных полимерах [68, 69].

Модульная структура Sup35 способствует использованию [*PSI*<sup>+</sup>] для выявления прионогенного потенциала других белков. Обычно для этого прионный домен Sup35 замещают какой-либо полипептидной последовательностью и исследуют способность химерного белка образовывать прион с супрессорным фенотипом, подобный [*PSI*<sup>+</sup>] [70]. Замена карбоксиконцевого домена Sup35 зеленым или иным флуоресцирующим белком позволяет микроскопически наблюдать агрегированное состояние этого белка. Флуоресцентное мечение двух разных прионогенных белков позволяет выявлять колокализацию агрегатов, образуемых этими белками, что указывает на их коагрегацию. Этот подход был успешно использован для demonstra-

ции прионных свойств белков Sup35 из разных видов дрожжей и для выявления барьеров межвидовой передачи прионов у дрожжей.

#### **VIII. ПЕРЕДАЧА ПРИОННОГО СОСТОЯНИЯ МЕЖДУ БЕЛКАМИ SUP35 ИЗ ДРОЖЖЕЙ, ОТНОСЯЩИХСЯ К РАЗНЫМ РОДАМ**

Первые эксперименты по передаче прионного состояния между разными белками Sup35 были связаны с исследованием прионных свойств белков Sup35 из эволюционно далеких видов дрожжей. Прионные домены этих белков значительно различаются по аминокислотной последовательности, однако имеют сходный аминокислотный состав, в частности, они обогащены остатками глутамина и аспарагина. Было показано отсутствие передачи прионного состояния от белка Sup35 *S. cerevisiae* белкам Sup35 дрожжей *Pichia methanolica*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida maltosa* и *C. albicans* [51–55, 71]. Невозможность передачи прионного состояния этим белкам, по-видимому, связана с их неспособностью взаимодействовать с прионной формой Sup35 *S. cerevisiae*, что было показано для Sup35 *P. methanolica* [52].

Неспособность дивергентных белков Sup35 взаимодействовать друг с другом наблюдали *in vitro* с использованием технологии пептидного микроэрея [72]. С помощью этого подхода были выявлены короткие пептиды прионного домена Sup35 *S. cerevisiae*, которые при инкубации с полноразмерным белком могли инициировать его полимеризацию. В то же время, ни один из пептидов не инициировал полимеризацию белка Sup35 *C. albicans* и наоборот, пептиды прионного домена Sup35 *C. albicans* не стимулировали полимеризацию Sup35 *S. cerevisiae*. Перекрестную стимуляцию полимеризации, однако, наблюдали, если эти белки имели в составе прионных доменов специально внесенные небольшие идентичные аминокислотные последовательности. Следует отметить, что в этой работе не определяли, принадлежат ли образующиеся амилоидные полимеры к прионному типу.

Наличие общих коротких аминокислотных последовательностей также может обеспечить взаимодействие прионной и обычной форм гетеротипичных Sup35 и *in vivo*. Для получения прионного состояния прионогенных белков дрожжей обычно используют их кратковременную сверхпродукцию [73]. Сверхпродукция белка Sup35 *C. albicans* в клетках *S. cerevisiae* не приводила к переходу в прионное состояние собственного Sup35 *S. cerevisiae*. Однако сверхпродукция химерного белка Sup35 *C. albicans*, в прионном домене которого небольшой

участок (8–26 а.к.) был заменен соответствующим участком Sup35 *S. cerevisiae*, индуцировала появление [*PSI*<sup>+</sup>], то есть способствовала переходу белка Sup35 *S. cerevisiae* в прионное состояние [51]. Тем не менее не ясно, следует ли считать наблюдаемое в этих экспериментах прионное состояние Sup35 *S. cerevisiae* результатом межвидового переноса прионного состояния, или же сверхпродукция химерного белка стимулировала возникновение [*PSI*<sup>+</sup>] *de novo*. На такую возможность указывают результаты исследования последствий синтеза белка Sup35 с прионным доменом *P. methanolicus* в клетках *S. cerevisiae*, содержащих [*PSI*<sup>+</sup>]. Несмотря на то, что ранее для этой комбинации белков было показано существование барьера передачи прионного состояния [52, 71], в работе Н. Вишвешвара и С. Либман было обнаружено, что химерный белок все же может приобретать прионное состояние, хотя и с низкой частотой. Важно также отметить, что при этом образовывались разные варианты прионного состояния химерного белка. Авторы подчеркивают, что образование разных вариантов [*PSI*<sup>+</sup>] характерно именно для их возникновения *de novo*, а не для межвидовой передачи [74].

Дальнейшие исследования, однако, продемонстрировали, что межвидовая передача прионных свойств между структурно несхожими белками Sup35 все же возможна. Известно, что фрагмент NM белка Sup35 *S. cerevisiae* способен образовывать *in vitro* при разной температуре (+4°C и +37°C) структурно различающиеся фибриллы, инфекция которыми клеток дрожжей приводит к появлению разных вариантов [*PSI*<sup>+</sup>] [55]. Такие фибриллы, образованные при +4°C, но не при +37°C, способны стимулировать *in vitro* полимеризацию фрагмента NM белка Sup35 *C. albicans*. Более того, инфекция фибриллами, образованными при +4°C приводила, хотя и с низкой эффективностью, к появлению фенотипа [*PSI*<sup>+</sup>] в клетках, синтезирующих Sup35 *C. albicans*. Прионные агрегаты, выделенные из таких клеток, инфицировали как клетки с белком Sup35 *C. albicans*, так и клетки с белком Sup35 *S. cerevisiae*.

### IX. ПЕРЕДАЧА ПРИОННОГО СОСТОЯНИЯ МЕЖДУ БЕЛКАМИ SUP35 ИЗ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ВИДОВ ДРОЖЖЕЙ

Белки Sup35 с низким уровнем гомологии прионных доменов не являются адекватной моделью прионного барьера у млекопитающих, поскольку в большинстве случаев эти белки не способны взаимодействовать. Уровень сходства прионных белков PrP у млекопитающих

значительно выше, что предполагает возможность их взаимодействия. Так, например, PrP хомяка, экспрессированный в культуре клеток нейробластомы мыши, препятствовал поддержанию приона мышинным PrP [37], что свидетельствует о наличии такого взаимодействия. Поэтому для моделирования межвидовой передачи прионной инфекции у млекопитающих в дрожжевой системе предпочтительнее использовать прионные белки близкородственных видов дрожжей с сопоставимым уровнем сходства прионных доменов (рис. 1).

Модель межвидовой передачи [ $PSI^+$ ], основанная на использовании близкородственных видов дрожжей, была предложена Б. Ченом с соавторами [56]. В данной работе наблюдали, что [ $PSI^+$ ] не передается от белка Sup35 *S. cerevisiae* белкам Sup35 дрожжей *S. bayanus* или *S. paradoxus*. При этом гетерологичные белки Sup35 весьма эффективно коагрегировали с прионной формой Sup35 *S. cerevisiae*. Это позволило авторам заключить, что передача прионного состояния может не происходить даже при эффективной коагрегации прионогенных белков. К сожалению, следующая работа тех же авторов [75] показала, что данные, на которых основывался этот важный вывод, недостаточно убедительны. Так, выяснилось, что прионное состояние Sup35 *S. cerevisiae* все же могло передаваться гетерологичным белкам с эффективностью, варьирующей от 12 до 93%, а степень коагрегации этих белков оказалась не столь высока, как предполагалось ранее, и при этом не была определена достоверно.

Для более убедительного подтверждения вывода о возможности барьера передачи прионного состояния между взаимодействующими белками необходимо было обнаружить случаи, при которых прионное состояние не передается между гомологами Sup35, но сопровождается коагрегацией гетерологичного белка с белком-носителем прионной конформации. Такие случаи были выявлены Е. Афанасьевой и соавт. при изучении передачи прионного состояния белка Sup35 *S. cerevisiae* гибридным белкам Sup35, содержащим прионные домены исследованных ранее белков из *S. bayanus* и *S. paradoxus*, а также из *S. mikatae* и *S. kudriavzevii* и MC домены из *S. cerevisiae* [76]. Ввиду возможной зависимости передачи прионного состояния от его варианта, была изучена передача четырех различных вариантов [ $PSI^+$ ].

Изучение способности гибридных белков Sup35 образовывать в клетках [ $PSI^+$ ] детергент-устойчивые амилоидные полимеры показало, что передача прионных свойств может отсутствовать, несмотря на кополимеризацию гетерологичного белка и прионной формы Sup35 *S. cerevisiae*. При этом гетерологичные белки могли практически полностью переходить в полимерное состояние или

появляться во фракции полимеров лишь в следовых количествах. Интересно, что независимо от количества, само по себе появление Sup35 с гетерологичным прионным доменом во фракции детергент-устойчивых полимеров могло приводить к довольно эффективной (до 25%) потере детерминанта  $[PSI^+]$ , что свидетельствовало о физическом взаимодействии молекул гибридного Sup35 с прионными полимерами Sup35 *S. cerevisiae*. В некоторых случаях барьер передачи был обусловлен отсутствием взаимодействия гетерологичного белка с прионной формой Sup35 *S. cerevisiae*. Все наблюдаемые эффекты – барьер передачи  $[PSI^+]$ , эффективность его потери и степень агрегации гибридного Sup35, зависели как от происхождения прионного домена Sup35, так и от варианта  $[PSI^+]$ .

Полученные данные позволили предположить, что барьер передачи  $[PSI^+]$  между белками Sup35 из близкородственных видов дрожжей может возникать по различным причинам (рис. 3). Даже несмотря на структурное сходство прионных доменов, такие белки могут быть неспособны взаимодействовать. Однако барьер может существовать и в случае взаимодействия гетеротипичных белков друг с другом. При этом единичные (или немногие) молекулы гетерологичного белка могут связываться с амилоидным полимером, но не полимеризоваться. Альтернативно, молекулы гетерологичного белка после связывания с прионным полимером могут полимеризоваться, но без приобретения прионной укладки, то есть, образуя ненаследуемые полимеры. Таким образом, даже при эффективной полимеризации гетерологичного белка способность полимера к наследованию может быть утрачена, приводя к барьеру в передаче приона. Амилоиды Sup35 с подобными свойствами ранее наблюдали при сверхпродукции Sup35 в клетках  $[PIN^+]$ . Было показано, что ненаследуемость связана с тем, что такие амилоиды не подвержены фрагментирующему действию шаперона Hsp104 и, вследствие этого, не размножаются [43]. Вероятно, образование ненаследуемых амилоидов является общим правилом в случаях, когда прион инициирует полимеризацию другого белка, поскольку они образовывались и в некоторых других аналогичных случаях [77].

Не исключено, что Sup35 *S. cerevisiae* может вновь связываться с полимером после гетерологичного белка и полимеризоваться, но также лишь с приобретением неприонной (ненаследуемой) укладки. Следует отметить, что во всех случаях связывание гетерологичного белка с прионными полимерами Sup35 *S. cerevisiae* осуществляется с невысокой вероятностью, поскольку высокоэффективное присоединение должно приводить к полной или практически полной потере  $[PSI^+]$ .



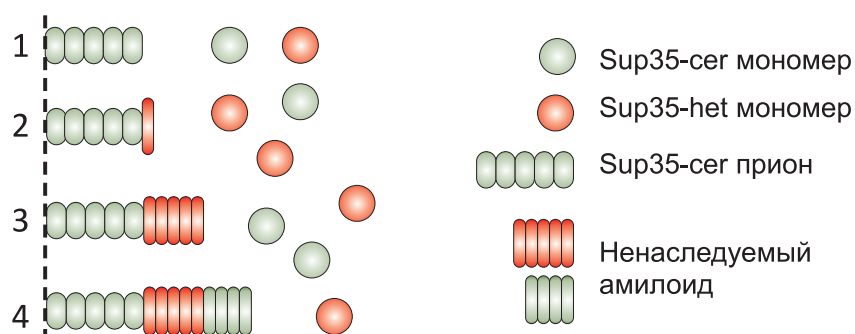


Рис. 3. Варианты кополимеризации белков Sup35 с гетерологичным прионным доменом (Sup35-het) и прионной формы белка Sup35 *S. cerevisiae* (Sup35-cer).

Для упрощения, показана полимеризация лишь в одном направлении. Гибридный Sup35: (1) не взаимодействует с Sup35-cer; (2) блокирует его полимеризацию; (3 и 4) полимеризуется в ненаследуемой укладке, причем (4) возможно дальнейшее включение Sup35-cer в ненаследуемой укладке.

### Х. МУТАЦИИ В ГЕНЕ *SUP35*, ВЛИЯЮЩИЕ НА ПЕРЕДАЧУ $[PSI^+]$

Изучение межвидовой передачи прионов млекопитающих показало, что даже единичные замены аминокислотных остатков в белке PrP могут существенно влиять на восприимчивость к прионной инфекции. Аналогичные результаты получены и для прионов дрожжей *S. cerevisiae*: барьеры трансмиссии  $[PSI^+]$  могут возникать за счет мутаций в гене *SUP35*, иными словами, единичные аминокислотные замены могут делать белок невосприимчивым к передаваемому прионному состоянию. К такому эффекту, например, приводит мутация *PNM2* в гене *SUP35* (замена глицина на аспарагиновую кислоту в 58 положении прионного домена Sup35). Более того, продукция этого мутантного белка в клетках с  $[PSI^+]$  интерферирует с поддержанием прионного детерминанта, хотя сама по себе эта мутация не препятствует переходу белка в прионное состояние при его сверхпродукции [78, 79]. Барьер передачи зависит от варианта передаваемого  $[PSI^+]$  – некоторые варианты прионной укладки Sup35 дикого типа могли быть переданы белку, кодируемому *SUP35* с мутацией *PNM2* (Е. Афанасьева, неопубликованные данные). Следует также отметить, что не всякие отличия прионогенных молекул вызывают прионный барьер, поскольку играет роль не только количество, но и «качество» этих отличий. Так, хотя даже единичные аминокислотные замены могли делать Sup35 неспособным приоб-

ретать состояние  $[PSI^+]$  от белка дикого типа [78, 80, 81], Sup35 с прионным доменом, отличающимся от прионного домена Sup35 *S. cerevisiae* по 13 аминокислотными остаткам легко воспринимал его прионное состояние (Е. Афанасьева, неопубликованные данные).

Несмотря на то, что единичные аминокислотные замены могут препятствовать способности белка воспринимать передаваемую прионную конформацию, белок Sup35 с укороченным прионным доменом может поддерживать  $[PSI^+]$  [82]. Последовательное делегирование олигопептидных повторов прионного домена Sup35 с его С-конца показало, что хотя  $[PSI^+]$ , поддерживаемые такими белками, меняли свое фенотипическое проявление, они сохраняли вариант своей прионной укладки, поскольку восстанавливали исходный фенотип при обратной передаче полноразмерному белку. Один из делеционных вариантов мог поддерживать лишь некоторые передаваемые варианты  $[PSI^+]$ .

## XI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Идентификация и исследование прионов млекопитающих были бы невозможны без их межвидовой передачи, поскольку именно это свойство прионов привело к созданию эффективных экспериментальных систем, основанных на использовании лабораторных животных. Однако феномен барьера межвидовой передачи прионов привлек к себе особое внимание лишь после обнаружения возможности передачи этого заболевания человеку с пищей. Оставалось совершенно непонятным, почему крупный рогатый скот может быть инфицирован скрейпи овец, в то время как скрейпи, в отличие от коровьего бешенства, не передаётся человеку. Исследования последних лет показали, что барьеры межвидовой передачи прионов зависят не только от различий первичной структуры прионных белков, но и от штамма передаваемого приона. Поскольку спектр прионных конформаций, которые может принимать белок, диктуется его первичной структурой, то можно предполагать, что чем выше уровень гомологии взаимодействующих белков, тем больше возможных сходных прионных конформаций они могут принимать и тем выше вероятность передачи прионных состояний между этими белками.

Обнаружение прионов у низших эукариот, в особенности у дрожжей, являющихся наиболее удобным для молекулярно-биологических исследований эукариотическим организмом, обусловило существенный прогресс в изучении межвидовой передачи прионов. В течение последнего десятилетия были не только воспроизведены все основные

закономерности межвидовой передачи прионов млекопитающих, но и получены данные, позволяющие судить о возможных причинах, затрудняющих такую передачу или делающих ее невозможной. Оказалось, что барьер передачи прионов может существовать, несмотря на физическое взаимодействие гетерологичных белков. При этом гетерологичный белок может присоединяться к концам прионной фибриллы и тем самым блокировать ее дальнейший рост. Более неожиданным оказалось то, что гетерологичный белок эффективно кополимеризовался с прионной формой резидентного белка, но при этом образовывал ненаследуемые (неприонные) полимеры, которые плохо распознавались шаперонами и не фрагментировались. Межвидовой барьер передачи прионов за счет образования гетерологичным белком неприонных амилоидов едва ли может быть воспроизведен *in vitro*, поскольку, хотя результаты таких экспериментов и позволяют судить о способности гетерологичного белка включаться в прионные полимеры, природа образуемых ими полимеров (инфекционность, наследуемость) остается неизвестной.

Важно отметить, что штаммовая зависимость барьера передачи прионов делает не вполне уместным использование термина «межвидовой барьер», поскольку барьер передачи между двумя видами может существовать не для всех штаммов прионов. С другой стороны единичные аминокислотные замены могут делать прионогенные белки невосприимчивыми к передаваемому прионному состоянию. Таким образом, для обозначения невозможности или неэффективности передачи прионов между организмами нам представляется более уместным использование термина «барьер передачи».

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Hadlow, W.J.* (1959) *Lancet*, **274**, 289–290.
2. *Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J., Alpers, M.* (1966) *Nature*, **209**, 794–796.
3. *Chandler, R.L.* (1961) *Lancet*, **277**, 1378–1379.
4. *Pattison, I.H.* (1965) *J. Comp. Pathol.*, **75**, 159–164.
5. *Alper, T., Haig, D.A., Clarke, M.C.* (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 278–284.
6. *Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A., Clarke, M.C.* (1967) *Nature*, **214**, 764–766.
7. *Griffith, J.S.* (1967) *Nature*, **215**, 1043–1044.
8. *Prusiner, S.B.* (1982) *Science*, **216**, 136–144.
9. *Oesch, B., Westaway, D., Waelchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E.* (1985) *Cell*, **40**, 735–746.
10. *Gabriel, J.M., Oesch, B., Kretzschmar, H., Scott, M., Prusiner, S.B.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9097–9101.

11. Rivera-Milla, E., Stuermer, C.A.O., Malaga-Trillo, E. (2003) Trends Genet., **19**, 72–75.
12. Simons, K., Eehalt, R.J. (2002) Clin. Invest., **110**, 597–603.
13. Bremer, J., Baumann, F., Tiberi, C., Wessig, C., Fischer, H., Schwarz, P., Steele, A.D., Toyka, K.V., Nave, K.-A., Weis, J., Aguzzi, A. (2010) Nat. Neurosci., **13**, 310–318.
14. Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 10962–10966.
15. Bessen, R.A., Kocisko, D.A., Raymond, G.J., Nandan, S., Lansbury, P.N., Jr, Caughey, B. (1995) Nature, **375**, 698–700.
16. Telling, G.C., Parchi, P., DeArmond, S.J., Cortell, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P., Prusiner, S.B. (1996) Science, **274**, 2079–2082.
17. Fraser, H., Dickinson, A.G. (1973) J. Comp. Pathol., **83**, 29–40.
18. Kimberlin, R.H., Walker, C.A. (1986) J. Gen. Virol., **67**, 255–263.
19. Scott, M., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., Waelchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S.J., Westaway, D., Prusiner, S.B. (1989) Cell, **59**, 847–857.
20. Kimberlin, R.H., Walker, C.A. (1978) J. Gen. Virol., **39**, 487–496.
21. Kimberlin, R.H., Cole, S., Walker, C.A. (1987) J. Gen. Virol., **68**, 1875–1881.
22. Kimberlin, R.H., Walker, C.A., Fraser, H. (1989) J. Gen. Virol., **70**, 2017–2025.
23. Kocisko, D.A., Priola, S.A., Raymond, G.J., Chesebro, B., Lansbury, P.T., Caughey, B. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**, 3923–3927.
24. Bessen, R.A., Marsh, R.F. (1992) J. Virol., **66**, 2096–2101.
25. Hill, A.F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K.C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L.J., Lantos, P. (1997) Nature **389**, 448–450.
26. Pattison, I.H., Jones, K.M. (1968) Res. Vet. Sci., **9**, 408–410.
27. Bruce, M.E., Dickinson, A.G. (1987) J. Gen. Virol., **68**, 79–89.
28. Kimberlin, R.H., Cole, S., Walker, C.A. (1986) Neuropathol. Appl. Neurobiol., **12**, 197–206.
29. Li, J., Browning, S., Mahal, S.P., Oelschlegel, A.M., Weissmann, C. (2010) Science, **327**, 869–872.
30. Bartz, J.C., McKenzie, D.I., Bessen, R.A., Marsh, R.F., Aiken, J.M. (1994) J. Gen. Virol., **75**, 2947–2953.
31. Bossers, A., Schreuder, B.E., Muileman, I.H., Belt, P.B., Smits, M.A. (1996) J. Gen. Virol., **77**, 2669–2673.
32. Westaway, D., Cooper, C., Turner, S., Da Costa, M., Carlson, G.A., Prusiner, S.B. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 6418–6422.
33. Mead, S., Stumpf, M.P., Whitfield, J., Beck, J.A., Poulter, M., Campbell, T., Uphill, J.B., Goldstein, D., Alpers, M., Fisher, E.M., Collinge, J. (2003) Science, **300**, 640–643.
34. Mead, S., Whitfield, J., Poulter, M., Shah, P., Uphill, J., Campbell, T., Al-Dujaily, H., Hummerich, H., Beck, J., Mein, C.A., Verzilli, C., Whittaker, J., Alpers, M.P., Collinge, J. (2009) N. Engl. J. Med., **361**, 2056–2065.
35. Collinge, J., Clark, A.R. (2007) Science, **318**, 930–936.
36. Wadsworth, J.D.F., Asante, E.A., Desbruslais, M., Linehan, J.M., Joiner, S., Gowland, I., Welch, J., Stone, L., Lloid, S.E., Hill, A.F., Brander, S., Collinge, J. (2004) Science, **306**, 1793–1796.
37. Priola, S.A., Chesebro, B. (1995) J. Virol., **69**, 7754–7758.
38. Vanik, D.L., Surewicz, K.A., Surewicz, W.K. (2004) Mol. Cell, **14**, 139–145.
39. Derkatch, I.L., Bradley, M.E., Zhou, P., Chernoff, Y.O., Liebman, S.W. (1997) Genetics, **147**, 507–519.

40. Derkatch, I.L., Bradley, M.E., Hong, J.Y., Liebman, S.W. (2001) *Cell*, **106**, 171–182.
41. Paushkin, S.V., Kushnirov, V.V., Smirnov, V.N., Ter-Avanesyan, M.D. (1996) *EMBO J.*, **15**, 3127–3134.
42. Kushnirov, V.V., Ter-Avanesyan, M.D. (1998) *Cell*, **94**, 13–16.
43. Salnikova, A.B., Kryndushkin, D.S., Smirnov, V.N., Kushnirov, V.V., Ter-Avanesyan, M.D. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 8808–8812.
44. Alexandrov, I.M., Vishnevskaya, A.B., Ter-Avanesyan, M.D., Kushnirov, V.V. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 15185–15192.
45. Nakayashiki, T., Kurtzman, C.P., Edskes, H.K., Wickner, R.B. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 10575–10580.
46. True, H.L., Berlin, I., Lindquist, S.L. (2004) *Nature*, **431**, 184–187.
47. Миронова Л.Н., Гогинашвили А.И., Тер-Аванесян М.Д. (2008) *Молекулярная биология*, **42**, 798–808.
48. Tyedmers, J., Madariaga, M.L., Lindquist, S. (2008) *PLoS Biol.*, **6**, 2605–2613.
49. Halfmann, R., Lindquist, S. (2010) *Science*, **330**, 629–632.
50. Tuite, M.F., Serio, T.R. (2010) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **11**, 823–833.
51. Santoso, A., Chien, P., Osheroovich, L.Z., Weissman, J.S. (2000) *Cell*, **100**, 277–288.
52. Kushnirov, V.V., Kochneva-Pervukhova, N.V., Chechenova, M.B., Frolova, N.S., Ter-Avanesyan, M.D. (2000) *EMBO J.*, **19**, 324–331.
53. Chien, P., Weissman, J.S. (2001) *Nature*, **410**, 223–227.
54. Hara, H., Nakayashiki, T., Crist, C.G., Nakamura, Y. (2003) *Genes Cells*, **8**, 925–939.
55. Tanaka, M., Chien, P., Yonekura, K., Weissman, J.S. (2005) *Cell*, **121**, 49–62.
56. Chen, B., Newnam, G.P., Chernoff, Y.O. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 2791–2796.
57. Edskes, H.K., McCann, L.M., Hebert, A.M., Wickner, R.B. (2009) *Genetics*, **181**, 1159–1167.
58. Komar, A.A., Lesnik, T., Cullin, C., Merrick, W.C., Trachsel, H., Altmann, M. (2003) *EMBO J.*, **22**, 1199–1209.
59. Coschigano, P.W., Magasanik, B. (1991) *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 822–832.
60. Patino, M.M., Liu, J.J., Glover, J.R., Lindquist, S. (1996) *Science*, **273**, 622–626.
61. Kryndushkin, D.S., Alexandrov, I.M., Ter-Avanesyan, M.D., Kushnirov, V.V. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 49636–49643.
62. Kushnirov, V.V., Ter-Avanesyan, M.D., Telckov, M.V., Surguchov, A.P., Smirnov, V.N., Inge-Vechtomov, S.G. (1988) *Gene*, **66**, 45–54.
63. Ter-Avanesyan, M.D., Dagkesamanskaya, A.R., Kushnirov, V.V., Smirnov, V.N. (1994) *Genetics*, **137**, 671–676.
64. Paushkin, S.V., Kushnirov, V.V., Smirnov, V.N., Ter-Avanesyan, M.D. (1997) *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 2798–2805.
65. Baxa, U., Keller, P.W., Cheng, N., Wall, J.S., Steven, A.C. (2011) *Mol. Microbiol.*, **79**, 523–532.
66. Derkatch, I.L., Chernoff, Y.O., Kushnirov, V.V., Inge-Vechtomov, S.G., Liebman, S.W. (1996) *Genetics*, **144**, 1375–1386.
67. Kochneva-Pervukhova, N.V., Chechenova, M.B., Valouev, I.A., Kushnirov, V.V., Smirnov, V.N., Ter-Avanesyan, M.D. (2001) *Yeast*, **18**, 489–497.
68. Tanaka, M., Chien, P., Naber, N., Cooke, R., Weissman, J.S. (2004) *Nature*, **428**, 323–328.
69. King, C.Y., Diaz-Avalos R. (2004) *Nature*, **428**, 319–323.
70. Kushnirov, V.V., Vishnevskaya, A.B., Alexandrov, I.M., Ter-Avanesyan, M.D. (2007) *Prion*, **1**, 179–184.

71. Chernoff, Y.O., Galkin, A.P., Lewitin, E., Chernova, T.A., Newnam, G.P., Belenkiy, S.M. (2000) *Mol. Microbiol.*, **35**, 865–876.
72. Tessier, P.M., Lindquist, S. (2007) *Nature*, **447**, 556–561.
73. Wickner, R.B. (1994) *Science*, **264**, 566–569.
74. Vishveshwara, N., Liebman, S.W. (2009) *BMC Biol*, **7**, 26.
75. Chen, B., Bruce, K.L., Newnam, G.P., Gyoneva, S., Romanyuk, A.V., Chernoff, Y.O. (2010) *Mol. Microbiol.*, **76**, 1483–1499.
76. Afanasieva, E.G., V.V. Kushnirov, V.V., Tuite, M.F., Ter-Avanesyan, M.D. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 15773–15780.
77. Uraikov, V.N., Vishnevskaya, A.B., Alexandrov, I.M., Kushnirov, V.V., Smirnov, V.N., Ter-Avanesyan, M.D. (2010) *Prion*, **4**, 45–52.
78. Doel, M.S., McCready, S.J., Nierras, C.R., Cox, B.S. (1994) *Genetics*, **137**, 659–670.
79. Kochneva–Pervukhova, N.V., Paushkin, S.V., Kushnirov, V.V., Cox, B.S., Tuite, M.F., Ter-Avanesyan, M.D. (1998) *EMBO J.*, **17**, 5805–5810.
80. DePace, A.H., Santoso, A., Hillner, P., Weissman, J.S. (1998) *Cell*, **93**, 1241–1252.
81. Chang, H.-Y., Lin, J.-Y., Lee, H.-C., Wang, H.L., King, C.Y. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13345–13350.
82. Shkundina, I.S., Kushnirov, V.V., Tuite, M.F., Ter-Avanesyan, M.D. (2006) *Genetics*, **172**, 827–835.