

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСАДКОВ ГРУБЫХ ЛИЗАТОВ ИЗ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ СВОИМ ПРИОНОВЫМ СОСТАВОМ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПРИОНАМИ

© О. В. Невзглядова,^{1,*} А. В. Артемов,¹ А. Г. Миттенберг,¹ Е. И. Костылева,¹
Е. В. Михайлова,¹ К. В. Соловьев,² И. М. Кузнецова,¹ К. К. Туроверов,¹ Т. Р. Сойдла¹

¹ Институт цитологии РАН и ² Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург;
* электронный адрес: oneva43@yahoo.com

Использование нового подхода позволило идентифицировать в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* большую группу прионассоциированных белков. В основе применяемого подхода — сравнение белкового состава осадков грубых лизатов, выделенных из клеток изогенных штаммов, различающихся прионовым содержанием. Двумерный электрофорез с последующим масс-спектрометрическим (MALDI) анализом осадочных белков из [*psi*⁻]-реципиента и [*PSI*⁺]-цитодуктанта позволили идентифицировать 35 белков, нахождение которых в осадочной фракции зависело от содержания прионов в клетке. Около половины из них принадлежит к двум функциональным группам — шаперонам и ферментам гликолиза. Обнаружены также белки, участвующие в трансляции, в ответе клетки на окислительный стресс и в деградации белков. Полученные результаты обсуждаются в связи с недавно опубликованными данными о белках прионовых агрегатов, выделенных другими способами.

Ключевые слова: амилоид, прионы, прионассоциированные белки, гетерокарион, цитодукция, *Saccharomyces cerevisiae*.

Существует ряд заболеваний человека и животных, которые принято называть «конформационными». Сейчас известно более 20 подобных заболеваний (Herczenik, Gebbink, 2008; Uversky, 2008; Uversky et al., 2008). Они связаны с нарушением пространственной нативной структуры некоторых белков, их агрегацией и образованием амилоидных фибрилл. К числу таких заболеваний относятся многочисленные губчатые энцефалопатии, болезни Альцгеймера, Хантингтона, Паркинсона, диабет II типа и др. (Wickner et al., 2008). Некоторые из этих заболеваний являются инфекционными, причем переносчиками инфекции являются амилоидные фибриллы, которые в этом случае называются прионами (*proteinaceous* — белковый, *infective* — инфекционный, *on* — в значении «частица»).

Впервые с прионными заболеваниями столкнулись, изучая дегенеративные изменения нервных клеток при вертячке (*scrapie*) у овец. Несколько позже заболевания этого типа нашли у коров (бычья губчатая энцефалопатия) и человека (болезнь Крейтцфельда-Якоба) (Zhou et al., 2008). Во всех случаях в тканях обнаруживалось накопление агрегатов фибриллярной структуры (*PrP^{sc}*), состоящих из тех же белков, которые в здоровой ткани являются растворимыми мономерами (*PrP^c*). Гриффит (Griffith, 1967) предположил, что в основе прионовых заболеваний лежит возникновение олигомерной формы белка, которая действует как инфекционный агент, вызывая переход белка из нормального мономерного состояния в амилоидное. Это предположение нашло большое количество экспериментальных подтверждений (Prusiner, 2004; Wickner et al.,

2008). Прионы отличаются от других амилоидных структур тем, что их воспроизведение реализуется в ряду клеточных поколений. Иными словами, прионовое состояние наследуется. Это дает основание говорить о так называемом белковом наследовании (Chernoff, 2007; Wickner et al., 2008).

Удобным объектом для изучения этого феномена являются дрожжи. Прионы, аналогичные *PrP^{sc}*, были найдены в *Saccharomyces cerevisiae* около 15 лет назад (Wickner, 1994; см. также обзоры: Chernoff et al., 2002; Chernoff, 2004; Kushnirov et al., 2006; Wickner et al., 2007; Wickner et al., 2008). Дрожжи этого вида хорошо изучены генетически, к ним легко применить методы молекулярной биологии, к тому же прионизация некоторых белков не сказывается на жизнеспособности дрожжей, по крайней мере в лабораторных условиях. В дрожжах найдено несколько белков, способных к прионизации, причем в двух случаях известно, какую функцию они выполняют в мономерном, «здоровом», состоянии. Белок *Sup35p* — один из факторов терминации трансляции. При амилоидизации этого белка кодоны-терминаторы начинают прочитываться. Это дает возможность отслеживать процесс прионизации *Sup35p* по появлению фенотипа нонсенс-супрессии. Фактор цитоплазматической супрессии был известен до того, как выяснилась его причина. Он был назван [*PSI*⁺]-фактором, а клетки, в которых он самовоспроизводится и не воспроизводится, названы [*PSI*⁺] и [*psi*⁻] соответственно. Белок *Ure2p* — негативный фактор регуляции азотного катаболизма, активность которого нужна для использования бедных азотом субстратов. Превращение этого белка

в неактивную амилоидную форму, так называемый прион [URE3], приводит к тому, что клетка приобретает способность к транспорту уреидосукцината (интермедиата урацилового биосинтеза). Ure2p является одним из самых хорошо изученных прионовых белков у дрожжей (Lian et al., 2006, 2007). Следующим был найден белок, прионизация которого приводила к так называемому [PIN⁺]-эффекту — облегчению перехода [psi⁻]-клеток в [PSI⁺]-состояние. Сам термин «PIN» произведен от «[PSI⁺]-inducibility». [PIN⁺] — самоспроизводящаяся амилоидная форма белка Rnq1, функция которого не сказывается на жизнеспособности и фенотипе дрожжевых клеток.

В 2008 г. обнаружен еще один белок, влияющий в амилоидной форме на индукцию приона Sup35. Это субъединица фактора перестройки хроматина Sw1p (Du et al., 2008). В прионовой форме он носит название [SWT⁺]. Прионоподобное поведение было показано также для фактора [NU⁺], который является производным от белка New1p. Сверхсинтез как Sw1p, так и New1p приводит к [PIN⁺]-эффекту. В настоящее время общепринято считать, что любой прион, богатый аспарагином и глутамином (а таковы все прионы дрожжей), облегчает индукцию других прионов в той же клетке. С другой стороны, описаны и случаи конкурентных отношений между разными прионами (Derkatch, Liebman, 2007). Список прионов дрожжей неуклонно растет. В начале 2009 г. был идентифицирован прион [MCA] — продукт прионизации дрожжевой метакаспазы Mca1p (Nemecsek et al., 2009).

Изучение [PSI⁺]- и [URE3]-факторов позволило генетикам выявить 3 следующих основных критерия, которые отличают прионовое наследование от обычного, связанного с молекулой ДНК. 1. Прионовое состояние передается при цитодукции. В результате цитодукции клетка-цитодуктант получает ядро только от одного родителя (реципиента) и смешанную цитоплазму как от реципиента, так и от родителя-донора. Цитодукция используется для подтверждения внеядерного наследования факторов, присутствующих у донора. 2. Элиминированная амилоидная форма белка может снова восстановиться в клеточных потомках, если только ген, кодирующий данный белок, не делегирован. 3. Сверхпродукция белка, способного к прионизации, увеличивает вероятность прионизации (Chernoff et al., 2002; Chernoff, 2004; Wickner et al., 2008).

Роль весьма существенного для прионизации шаперона Hsp104p была открыта, когда выяснилось, что его делеция, как и сверхпродукция в клетке, приводит к элиминированию [PSI⁺]. Элиминирование прионов из клеток при добавлении в среду для выращивания дрожжей малых концентраций GuHCl также связано с подавлением активности Hsp104p (Chernoff et al., 1995; Kryndushkin et al., 2003; Takahashi et al., 2007; см. также обзоры: Cox et al., 2007; Kushnirov et al., 2007; Rikhvanov et al., 2007; Wickner et al., 2007, 2008). Шаперон Hsp104p является АТФазой, которая обеспечивает резистентность дрожжей к повышенной температуре за счет расщепления белковых агрегатов, возникающих в результате теплового шока. Показано, что этот шаперон разрушает также прионовые агрегаты.

В своем «жизненном цикле» прионы взаимодействуют со многими клеточными структурами — цитоскелетом, убиквитинового системой и агресомы (Wang et al., 2007, 2008). Белки, вовлеченные в процесс прионизации и в борьбу клеток с накоплением амилоидных фибрилл, изучены далеко не полно. Тем не менее уже сейчас их

можно охарактеризовать в общих чертах. К белкам, участвующим в распространении прионов, относятся прежде всего шапероны — наиболее изученные из них белки из семейств Hsp104, Hsp70 и Hsp40 (Chernoff et al., 1999; Jung et al., 2000; Jones, Masison, 2003; Sharma et al., 2009). Они ответственны за нарезание амилоидных фибрилл на олигомерные фрагменты, являющиеся седами (семенами) при воспроизведении прионов (Lian et al., 2007; Rikhvanov et al., 2007; Takahashi et al., 2007; Bagriantsev et al., 2008). Считается, что основная роль в этом процессе принадлежит Hsp104. Идентификация других белков, взаимодействующих с прионами, и установление их роли в жизненном цикле прионов является актуальной задачей, которую в последнее время пытаются разрешить во многих лабораториях мира (Wang et al., 2007, 2008; Bagriantsev et al., 2008). Эти исследования имеют также прикладное значение, поскольку они, возможно, позволят найти безвредный для клетки способ подавления процесса прионизации.

Цель настоящей работы состоит в широком скрининге белков, ассоциированных с прионами, т. е. входящих с ними в так называемые прионовые агрегаты. Чтобы выявить эти белки, мы предложили новый подход, основанный как на оптимизации методов их выделения, так и на сравнении разных изогенных штаммов, различающихся прионовым составом. Для создания таких штаммов применяли «приотропные воздействия», такие как обработка клеток GuHCl, приводящая к изгнанию из клетки ряда прионов, и цитодукция — передача цитоплазматических наследственных факторов из клетки в клетку. Это позволяет получить пары штаммов дрожжей, которые не различаются по своему ядерному генотипу, но различаются по прионовому составу. Сравнение фракции агрегированных белков у подобных штаммов позволяет выделить те белки, наличие которых в этой фракции зависит от прионного состава клеток.

Материал и методика

Использованные штаммы и плазмиды. Штамм АН/В (*MATα ade1-14 ura3 his3 lys9 kar1 [psi⁻ pin⁻]*) был предоставлен А. С. Борхсениусом. Штамм 74-D694 (*MATα ade1-14 ura3 his3 trp1 leu2 [PSI⁺ weak PIN⁺]*) и его изогенное производное, штамм OT56 (*[PSI⁺ strong PIN⁺]*) (Chernoff et al., 1995) были предоставлены Л. Н. Мироновой и Г. А. Журавлевой. Другие варианты этих штаммов, различающиеся присутствием PSI [*PSI⁺ strong* или *PSI⁺ weak*], были получены в процессе данной работы. Штамм GT26 (*MATα aro7-1 cys1-72 his4-166 leu2-1 lys2-187 met8-1 trp5-48 ura3-1 [PSI⁺ PIN⁺]*) и полученный из него изогенный штамм GT27 [*psi⁻ pin⁻]* (Chernova et al., 2003) были предоставлены Ю. О. Черновым.

Использовали плазмиды pRS316-GAL-SUP35(*URA3*), pYS-GAL-HSP104(*URA3*), содержащие ген *SUP35* или *HSP104* под контролем индуцибельного промотора GAL1,10, а также соответствующую контрольную плазмиду pRS316-GAL(*URA3*), описанные Ю. О. Черновым (Chernoff et al., 1999) и предоставленные Г. А. Журавлевой.

При помощи вышеуказанных штаммов и плазмид был получен набор различных трансформантов и цитодуктантов (Невзглядова и др., 2008). Трансформанты [PSI⁺] из двух [psi⁻] и трех [PSI⁺ weak] производных штамма 74-D694, несущие ген *SUP35*, были обозначены соответственно

74-A/, 74-C/, 74-B/, 74-D/ и 74-E/SUP35[PSI⁺]. Во всех случаях мы отбирали клоны, проявляющие сильную супрессию ([PSI⁺]). После нескольких пересевов на полную питательную среду (YEPD) штаммы утрачивали плазмиды, сохраняя, тем не менее, эффект сильной супрессии. Цитодуктанты обозначены таким образом, чтобы было понятно их происхождение. Например, в названии C20[PSI⁺]/(OT56)B обозначение C20 является сокращенным названием цитодуктанта, [PSI⁺] обозначает его плазмид, B — сокращенное название родителя АН/В, служащего донором ядра, OT56 — название другого родителя, служащего донором цитоплазмы. [psi⁻]-Производные, отобранные среди клонов цитодуктантов после трансформации плазмидой, несущей ген *HSP104*, обозначали по схеме: С(номер цитодуктанта)/HSP104[psi⁻]. Пример [psi⁻]-производного, полученного после обработки штамма GuHCl, выглядит так: 74-A/GuHCl[psi⁻].

Среды для культивирования и основные методы манипулирования дрожжевыми клетками описаны у Шермана с соавторами (Sherman et al., 1986). Элиминацию прионов GuHCl выполняли, как описано у Чернова с соавторами (Chernoff et al., 2002), цитодукцию — как описано в литературе (Zakharov, Yarovoy, 1977), с некоторыми изменениями: клетки зигот идентифицировали по характерной гантелеобразной форме и затем изолировали микроманипулированием. В качестве [PSI⁺]-цитодуктантов отбирали клоны, которые сохраняли ядерные маркеры [psi⁻]-родителя, но получали [PSI⁺]-фактор, о чем свидетельствовали цвет колонии на среде YEPD, а также способность расти на среде без аденина.

Приготовление и анализ белковых экстрактов из осадков грубых лизатов дрожжевых клеток. Дрожжевые культуры выращивали на твердой питательной среде в течение 5—6 сут. Собранные клеточки отмывали водой от остатков питательной среды и лизировали с помощью встряхивания и стеклянных бус в буфере А: 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl и 10 mM EDTA. Протеазы блокировали добавлением 10 mM фенилметилсульфонилфторида (PMSF). Так как цель настоящей работы состояла в том, чтобы изолировать максимально полный пул прионсодержащих агрегатов в осадках полученных нами препаратов, мы не использовали дитиотреитол (DTT) в буфере А во избежание разрушения связей прионизированных белков с различными прионассоциированными белками. Остатки клеток и стеклянные бусы удаляли центрифугированием при 100 g в течение 1 мин, а полученные супернатанты разбавляли буфером А в 1.5 раза при 0 °C. Количество белка в разбавленных супернатантах определяли модифицированным методом Лоури (Северин, Соловьев, 1989), после чего лизаты сравниваемых белков выравнивали по белку и центрифугировали при 1000 g в течение 30 мин. Фракцию супернатантов удаляли, а осадки отмывали. Каждый этап очистки осадков включал в себя ресуспендирование в соответствующем буфере с последующим центрифугированием. Однако процедура отмывки в разных экспериментах варьировала. Для сравнения осадочных белков в агарозном геле осадки однократно отмывали в PBS (150 mM NaHCl, 25 mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 7.4), в то время как перед нанесением в ПААГ осадки отмывали 8 M мочевиной, затем дважды PBS и 3 раза с помощью PBS, содержащего 2 % додецилсульфата натрия (SDS), при 37 °C, чтобы избавиться от неприонных белковых агрегатов и удалить слабо ассоциированные белки из агрегатов прионов (Kryndushkin et al., 2003).

Экстракцию белковых осадков выполняли в буфере В (0.15M Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 3 % β-меркаптоэтанол (β-ME), 10 % глицерина и 0.05 % бромфенолового синего) в течение 15 мин при 37 °C. В некоторых случаях β-ME заменяли на 50 mM DTT.

Электрофорез. Для мономеризации белка, экстрагированные пробы кипятили в течение 10 мин, затем центрифугировали 5 мин при 1000 g. Полученные супернатанты использовали для электрофоретических проб. В качестве контроля использовали осадки, экстрагированные в буфере В без кипячения с β-ME. Белки в пробах разделяли в денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ-SDS) в соответствии со стандартной процедурой (Laemmli, 1970).

Применяя метод Крындушкина (Kryndushkin et al., 2003) для облегчения прохождения полимеров и задержки их на старте в разделяющем ПААГ, в качестве концентрирующего геля вместо ПААГ использовали 1.8%-ную агарозу. В качестве красителя использовали Кумасси R259.

Вестерн-блот. После электрофореза белки переносили из ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham, США) стандартным полусухим методом. Идентификацию Sup35 проводили, используя первичные поликлональные кроличьи антитела (полученные от Г. А. Журавлевой) и вторичные антикроличьи IgG козла, связанные с HPR (пероксидазой хрена обыкновенного) (ICN, США). Детекцию проводили, используя в качестве субстрата 1-хлор-4-нафтол (рис. 1, в).

В других экспериментах Вестерн-блот дрожжевых белков выполняли с использованием вторичных антител, связанных с HPR (Sigma, США). Выявление пероксидазы проводили с использованием реагентов ECL (Pierce, США). Дрожжевые белки разделяли в 10%-ном денатурирующем ПААГ-SDS (Laemmli, 1970) и переносили на мембрану PVDF (Immunoblot®, Bio-Rad, США) в буфере Towbin (25 mM Tris-HCl, 192 mM глицина, 0.05 % SDS и 10 % метанола, pH 7.3) (Towbin et al., 1979). Мембрану отмывали в буфере TTBS (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl и 0.1 % Tween-20) и неспецифическое связывание антител блокировали 5%-ным обезжиренным молоком, приготовленным на том же буфере. Дополнительный блокирующий агент отмывали буфером TTBS, после чего мембрану инкубировали с кроличьими антителами или к Sup35, или Hsp104 (рис. 1, а, б; 5, б). Кроличьи поликлональные антитела к Hsp104 для этих экспериментов были любезно предоставлены А. П. Галкиным (рис. 1, а, в; 5, а).

Элюция белков. Куски гелей подвергали экстракции при комнатной температуре 3—4 раза по 12 ч каждый в буфере, содержащем 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.14 M NaCl, 0.075 % SDS, 20 mM DTT, 0.1 mM PMSF и по 0.0001 % аprotинина, пепстатина и леупептина.

2D-электрофорез в полиакриламидном геле. Двумерное электрофоретическое разделение белков включало в себя 2 стадии: изоэлектрическое фокусирование (IEF) и ПААГ-SDS. IEF выполняли в 18-сантиметровом геле IPG DryStrip, pH 3—10, с использованием системы Ettan IPGphor II IEF (GE Healthcare, Amersham, Великобритания). Образцы растворяли в 350 мкл стандартного IEF-буфера (8 M мочевины, 2 % CHAPS, 2 % IPG-буфера, pH 3—10, 1.2 % реагента DeStreak).

Масс-спектрометрический анализ (MALDI). Триптический гидролиз белка в ПААГ, окрашенном Coomassie Brilliant Blue (G-250), проводили следующим обра-

зом: кусочек геля размером 1 мм³ дважды промывали для удаления красителя путем инкубации в 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0.1 М NH₄HCO₃ в течение 30 мин при 37 °С. После удаления раствора для дегидратации геля добавляли по 100 мкл ацетонитрила. Удалив ацетонитрил и высушив кусочек геля, прибавляли к нему 4 мкл раствора, модифицированного 15 мкг/мл трипсина (Promega, США), растворенного до концентрации 15 мкг/мл в 0.05 М NH₄HCO₃. Гидролиз проводили в течение 18 ч при 37 °С, затем к раствору добавляли 8 мкл 0.5%-ной ТФУ (трифторуксусной кислоты) в 10%-ном растворе ацетонитрила в воде и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали для получения MALDI-масс-спектров.

Подготовку образцов для масс-спектрометрии проводили следующим образом: на мишени смешивали по 1 мкл раствора образца и 0.3 мкл раствора 2, 5-дигидроксибензойной кислоты (10 мг/мл; Aldrich, США) в 20%-ном ацетонитриле в воде и содержащего 0.5 % ТФУ; полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры получали на тандемном MALDI-время-пролетном (TOF/TOF) масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенный УФ-лазером (Nd). Масс-спектры получены в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.007 %.

Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Поиск по «пептидному фингерпринту» проводили в базе данных NCBI среди белков всех организмов. Затем, если необходимо, удалив из пик-листов пики трипсинолиза кератина, проводили повторный поиск среди дрожжевых белков с указанной точностью с учетом возможного окисления метионина кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом.

Результаты

Оптимизация приготовления препаратов осадочных белков. Для того чтобы провести скрининг белков, вовлеченных во взаимодействие с прионами, в настоящей работе предпринято сравнение белкового состава агрегатов, выделенных из клеток изогенных штаммов дрожжей, различающихся прионовым статусом. Чтобы выявить по возможности представительный (репрезентативный) набор таких белков, необходимо было разработать методику «мягкого» выделения прионовых агрегатов, при которой эти агрегаты подвергались бы минимальному разрушению. После механического разрушения клеток их крупные фрагменты осаждали при 100 g в течение 1 мин. Затем надосадочную жидкость (грубый лизат клеток) центрифугировали при 1000 g в течение 30 мин, с тем чтобы в осадке получить агрегаты белков, в том числе агрегаты прионов и ассоциированных с ними белков. Далее осадки, полученные из грубых клеточных лизатов этим способом, мы будем для краткости называть осадочной фракцией или просто осадками, а белки, экстрагированные из них, — осадочными белками. Чтобы вычленив из совокупности осадочных белков прионассоциированные белки, мы сравнивали осадки [PSI⁺]- и [psi⁻]-штаммов. При этом условия выращивания клеток и их разрушения, получения осадочной фракции, ее отмывки и экстракции осадочных белков были оптимизированы та-

ким образом, чтобы выявляемые электрофорезом различия между изогенными [PSI⁺]- и [psi⁻]-штаммами были максимальными.

Для ответа на вопрос о том, остаются ли прионы в осадках после их отмывки концентрированным раствором мочевины и тремя отмывками 2%-ным SDS, был применен метод, позволяющий концентрировать прионовые полимеры и агрегаты на старте разделяющего ПААГ после прохождения через агарозный концентрирующий гель (Kryndushkin et al., 2003). Все пробы экстрагировали в буфере В в присутствии 50 мМ ДТТ, наносили в лунки 1.8%-ного агарозного концентрирующего геля и вырезали после того, как они входили в разделяющий 8%-ный ПААГ. Полоску ПААГ примерно в 8 мм подвергали блотингу с антителами на Sup35p. Таким образом, рис. 1, а представляет иммунный ответ препаратов из осадочных белков, преимущественно содержащий фракцию прионовых полимеров и небольших прионовых агрегатов (Kryndushkin et al., 2003).

На дорожке 3 рис. 1, а можно видеть более интенсивный иммунный ответ препарата, предварительно не обработанного мочевиной. Это говорит о том, что мочевина вымывает часть прионов из осадков. Об этом же говорит и результат гибридизации белков, полученных из супернатанта после отмывки осадка 8 М мочевиной (рис. 1, а, дорожка 5). Но большие размеры осаждаемых из грубых лизатов белковых агрегатов указывает тот факт, что белки из препарата, не отмывтого мочевиной, вообще не входят в ПААГ, если они не были предварительно подвергнуты кипячению (ср. дорожки 3 и 4). Этот вывод подтверждается также тем, что, несмотря на все перечисленные отмывки и кипячение, полимеры Sup35 у [PSI⁺]-штамма не разрушаются полностью (дорожки 1 и 2). Данные, приведенные на рис. 1, б, также свидетельствуют о том, что при разделении осадочных белков иммунный ответ обнаруживается только у [PSI⁺]-штаммов (ср. дорожки 1 и 2). При этом кипячение при экстракции заметно увеличивает количество Sup35p в препарате. Этот факт имеет принципиальное значение, так как разницу между кипяченными и некипяченными препаратами принято считать самым простым и надежным критерием для определения амилоидных белков в ПААГ.

В качестве протокола подготовки препаратов осадочных белков для дальнейшего сравнительного изучения в ПААГ были выбраны следующие процедуры: осадки отмывали от большого количества растворимых клеточных белков 1 раз 8 М мочевиной, 2 раза PBS и 3 раза 2%-ным SDS. Хотя обработанные таким образом осадки теряли значительное количество полимерных белков, мы предположили, что достаточно большое количество агрегатов, уже сформированных на основе прионовых фибрилл, в них остается. Белки из таких агрегатов экстрагировали в буфере В в присутствии 0.5 мМ ДТТ или 3 % β-МЕ с последующим 10-минутным кипячением, необходимым также для мономеризации полимеров.

Полученные результаты подтверждают, что предложенные нами процедуры подготовки препаратов осадочных белков адекватны для выявления разницы между [PSI⁺]- и [psi⁻]-штаммами.

Рис. 1, в представляет образцы электрофоретического разделения в ПААГ (справа) и Вестерн-блот (слева) осадочных белков из штаммов, различающихся по [PSI⁺]-фактору. Осадки отмывали 8 М мочевиной 1 раз, PBS — 2 раза и 2 % SDS — 3 раза, затем экстрагировали в буфере В, содержащем 3 % β-МЕ, и кипятили перед нанесением в

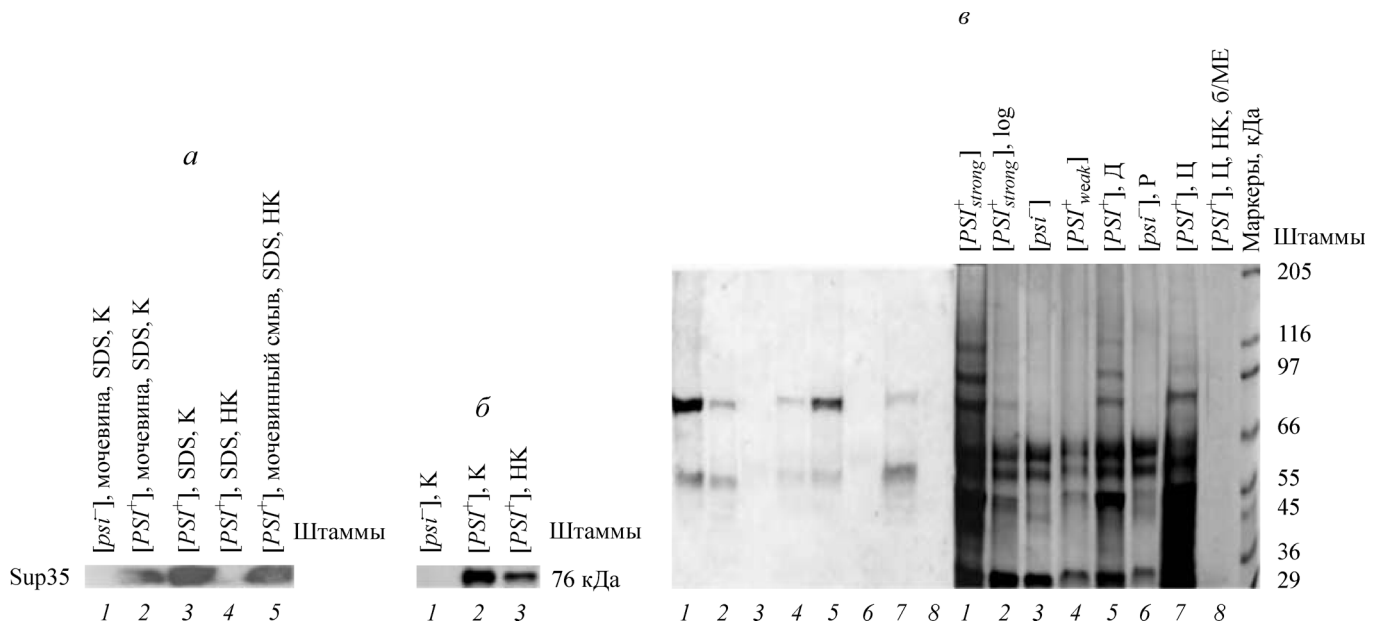


Рис. 1. Влияние разных процедур — отмывки и кипячения проб — на сохранение Sup35p в осадках грубых лизатов, выявляемое иммуноблоттингом, у $[psi^-]$ - и $[PSI^+]$ -изогенных штаммов дрожжей.

a — действие на прионовые полимеры и агрегаты; *дорожки* 1 — 74-D 694 $[psi^-]$; 2—5 — OT56 $[PSI^+_{strong}]$. Осадки получали, как указано в разделе «Материал и методика». Некоторые из них перед экстракцией отмывали 1 раз 8 М мочевиной, затем дважды PBS и трижды 2%-ным SDS (*дорожки* 1, 2), другие отмывали только SDS (*дорожки* 3, 4); *дорожка* 5 — супернатант после отмывки 8 М мочевиной и ультрацентрифугирования при 60 000 g в течение 40 мин. До экстракции пробы подвергали (К) или не подвергали (НК) кипячению. *б* — сравнение эффективности мономеризации у $[PSI^+]$ -проб, подвергнутых (К) и не подвергнутых (НК) кипячению до нанесения в 8%-ный ПААГ; 1 — 74-C/GuHCl $[psi^-]$; 2, 3 — 74-C/Sup35 $[PSI^+]$. Осадки отмывали 8 М мочевиной и 2%-ным SDS, экстрагировали в буфере В, содержащем 3 % β -МЕ. Полоску 10%-ного ПААГ, соответствующую 76 кДа, вырезали и подвергали блоттингу с антителами на Sup35p. *в* — электрофореграмма (*справа*) и Вестрен-блот (*слева*) осадочных белков, разделенных в 7%-ном ПААГ; 1 — OT56 $[PSI^+_{strong}]$, 2 — OT56log $[PSI^+_{strong}]$. Штаммы 1 и 2 различаются возрастом используемой в опыте культуры: 1 — выращивали до полного стационара (5 сут); 2 — культуру выращивали менее 1 сут, и она находилась в основном в логарифмической стадии роста; 3 — 74-D694 $[psi^-]$; 4 — 74-D694 $[PSI^+_{weak}]$. Штамм 3 получали из штамма 4 элиминацией $[PSI^+]$ -фактора с помощью GuHCl. 5 — 74E/SUP35 $[PSI^+_{weak}]$ был получен трансформацией плазмидой с геном SUP35 и отобран как трансформант, проявляющий супрессию сильного типа. В опыте по цитодукции его использовали как донор (Д) цитоплазмы. 6 — В/АН $[psi^-]$ — штамм использовали как реципиент (Р). 7 — c21 $[PSI^+]$ /(74-E)В, штамм получен как цитодуктант при скрещивании Д и Р; 8 — тот же препарат, что и на *дорожке* 7, за тем исключением, что в буфер экстракции не добавляли β -МЕ и перед нанесением в гель препарат не кипятили.

лунки. *Дорожки* 1—5 представляют одну группу изогенных между собой штаммов, а *дорожки* 6—8 — другую.

Иммунный ответ на антитела к белку Sup35 отсутствует у осадочных белков $[psi^-]$ -штаммов (*левая часть, дорожки* 3, 6). Наиболее выражен иммунный ответ у штаммов с сильной нонсенс-супрессией (*дорожки* 1, 5). Это согласуется с литературными данными о том, что штаммы с сильной супрессией имеют большее количество прионизированного Sup35p, чем их производное со слабой супрессией (Chernoff, 2008). Из данных рис. 1, *в* видно также, что количество Sup35p в осадочной фракции зависит от стадии клеточного роста: у клеток, выращенных до стационарной фазы (*дорожка* 1), это количество больше, чем у логарифмической культуры (*дорожка* 2). Соответственно все эксперименты мы ставили на клетках, выращенных до стационарной фазы. На *дорожке* 7 представлен цитодуктант, получивший $[PSI^+]$ -фактор от штамма донора (*дорожка* 5). Осадочные белки из этого же штамма, выделенные в отсутствие β -МЕ и без кипячения, очевидно, в ПААГ не входят, так как соответствующая *дорожка* (8) и при окраске Кумасси, и при иммуноблоте оказывается пустой. Следует отметить, что блотгибридизация выявляет не только бэнд, соответствующий молекулярной массе Sup35p, но и минорный бэнд меньшей массы. Ранее он был найден другими авторами и объяснен ограниченным протеолизом N-терминального домена Sup35p (Kryndushkin et al., 2003). В дополнение к бэндам, выявляемым иммунологически, на рис. 1, *спра-*

ва можно видеть бэнды, выявляемые окрашиванием по Кумасси. Они явно не относятся к белку Sup35, но, тем не менее, различаются у $[PSI^+]$ - и $[psi^-]$ -штаммов. В экспериментах, приведенных в следующем разделе, были предприняты попытки более детально изучить эти различия.

Выявление белков, агрегация которых зависит от присутствия прионов. Используя ПААГ-SDS-электрофорез, мы сравнивали состав осадочных белков исходных $[PSI^+]$ - и $[psi^-]$ -штаммов, полученных из них либо в результате роста клеток на среде YEPD с добавкой малой дозы GuHCl, либо благодаря трансформации плазмидой с геном Hsp104, приводящей к сверхпродукции Hsp104p. Кроме того, сравнивали осадочные белки у изогенных штаммов $[PSI^+]$ - и $[psi^-]$, полученных в результате цитодукции или введения плазмиды с геном Sup35, приводящего к сверхпродукции белка Sup35. Во всех экспериментах такого рода утрата клетками $[PSI^+]$ -фактора сопровождалась либо утратой, либо уменьшением количества отдельных осадочных белков. Напротив, приобретение $[PSI^+]$ -фактора приводило к приобретению одних белков и увеличению количества некоторых других.

На рис. 2, *a, б* представлены электрофореграммы осадочных белков, полученных из $[PSI^+_{weak}]$ -штамма и $[PSI^+]$ -трансформантов со сверхпродукцией Sup35p, а также из их $[psi^-]$ -производных. Можно видеть, что конверсия клеток из $[PSI^+]$ -состояния в $[psi^-]$ сопровождается

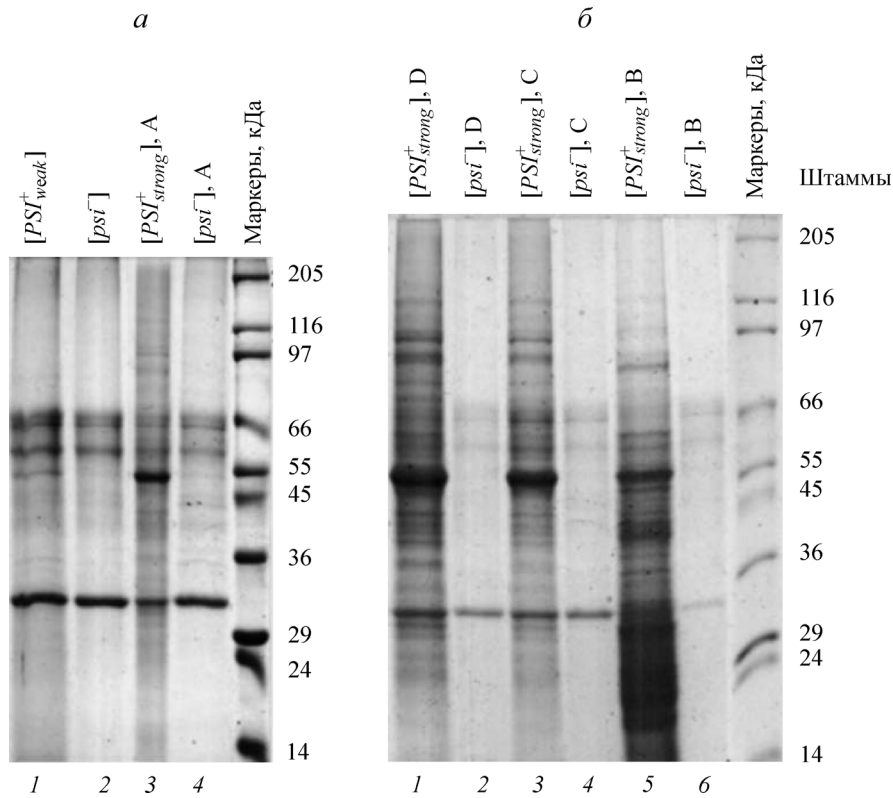


Рис. 2. Электрофореграммы осадочных белков, выделенных из штамма 74-D-694 и его производных и разделенных в 9.5%-ном ПААГ.

a: 1 — 74-D [PSI^+], 2 — 74-D [psi^-]; 3 — 74-A/SUP35 [PSI^+]; 4 — 74-A/GuHCl [psi^-]. *б*: 1 — 74-D/SUP35 [PSI^+]; 2 — 74-D/GuHCl [psi^-]; 3 — 74-C/SUP35 [PSI^+]; 4 — 74-C/GuHCl [psi^-]; 5 — 74-B/SUP35 [PSI^+]; 6 — 74-B/GuHCl [psi^-]. Осадки из изогенных штаммов были выделены, очищены и экстрагированы, как указано в разделе «Материал и методика». За исключением исходного штамма 74-D [PSI^+], все [PSI^+]-штаммы получены как независимые трансформанты, несущие ген *SUP35* и проявляющие нонсенс-супрессию «strong»-типа; [psi^-]-штаммы получены из тех же трансформантов элиминацией [PSI^+]-фактора с помощью GuHCl. Протокол получения трансформантов, как и элиминации прионов, описан ранее (Невзглядова и др., 2008).

выраженным ослаблением окраски нескольких бэндов на электрофореграмме (ср. дорожки 1 и 2, 3 и 4 на рис. 2, *a*, 1 и 2, 3 и 4, 5 и 6 на рис. 2, *б*). Так как интенсивность окраски белков по Кумасси отражает их количество в препарате, мы полагаем, что в потомстве обработанных GuHCl клеток количество отдельных белков в осадочной фракции понижается. Данные, приведенные на рис. 3, относятся к штаммам, участвующим в цитодукции, — реципиенту, донору цитоплазмы и цитодуктанту.

Цитодуктанты были получены как митотические потомки гетерокариотических зигот в нескольких независимых скрещиваниях. Анализируя скрещивание донора цитоплазмы 74-E/SUP35 [PSI^+] (рис 3, *a*, дорожка 1) с реципиентом АН/В [psi^-] (дорожка 3), можно видеть, что хотя цитодуктанты (дорожки 4, 7) содержат ядро от АН/В, они получили несколько бэндов, соответствующих белкам [PSI^+]-донора. Некоторые из этих бэндов оказываются сильно редуцированными после конверсии цитодуктантов из [PSI^+]- в [psi^-]-состояние (ср. дорожки 4 и 5, 4 и 6, 7 и 8). Подобные же результаты получены в скрещивании того же реципиента АН/В [psi^-] с трансформантом 74-D/SUP35 [PSI^+] (рис. 3, *б*, дорожки 2 и 1 соответственно).

Электрофореграмма белков, содержащихся в осадке цитодуктанта С25, имеет ряд полос, присутствующих в родителе, доноре цитоплазмы, и отсутствующих в родителе-реципиенте (ср. дорожки 3 и 2, 3 и 1). На том же ри-

сунке можно видеть, что цитодуктант С12 содержит бэнды, типичные для родителя-донора цитоплазмы ОТ56 [PSI^+], которых нет в реципиенте АН/В (ср. дорожки 5 и 2, 5 и 4). Еще больше бэндов «передается» реципиенту АН/В от [PSI^+]-донора GT26 (рис. 3, *в*, дорожки 3, 4). Когда в качестве донора цитоплазмы брали штамм GT27 [$psi^- pin^-$], 2 из 10 [psi^-]-цитодуктантов (дорожки 6, 7) также отличались от реципиента (дорожка 2). По крайней мере, бэнд, соответствующий приблизительно 50 кДа, явно соответствовал бэнду от [$psi^- pin^-$] GT27. (Следует отметить, что этот же бэнд оказывается наиболее выраженным и у других независимо полученных цитодуктантов). Приведенные на рис. 3 данные говорят о том, что некоторые белки (часть из них не связана ни с Sup35, ни с Rnq1) могут «передаваться» цитодукцией. Тем не менее, хотя эти белки митотически стабильны в штамме-цитодуктанте и могут элиминироваться после воздействия GuHCl, они прионами не являются. Об этом говорит тот факт, что в препаратах, подвергнутых и не подвергнутых кипячению перед нанесением на ПААГ, они ведут себя одинаково, в то время как прионизированный белок без предварительного кипячения, вызывающего его мономеризацию, в ПААГ не входит.

Если передача при цитодукции прионов — установленный факт (Shewmaker, 2006; Wickner et al., 2006; Tuite, Cox, 2007), то передачу при цитодукции неприонизированных белков трудно себе представить, так как

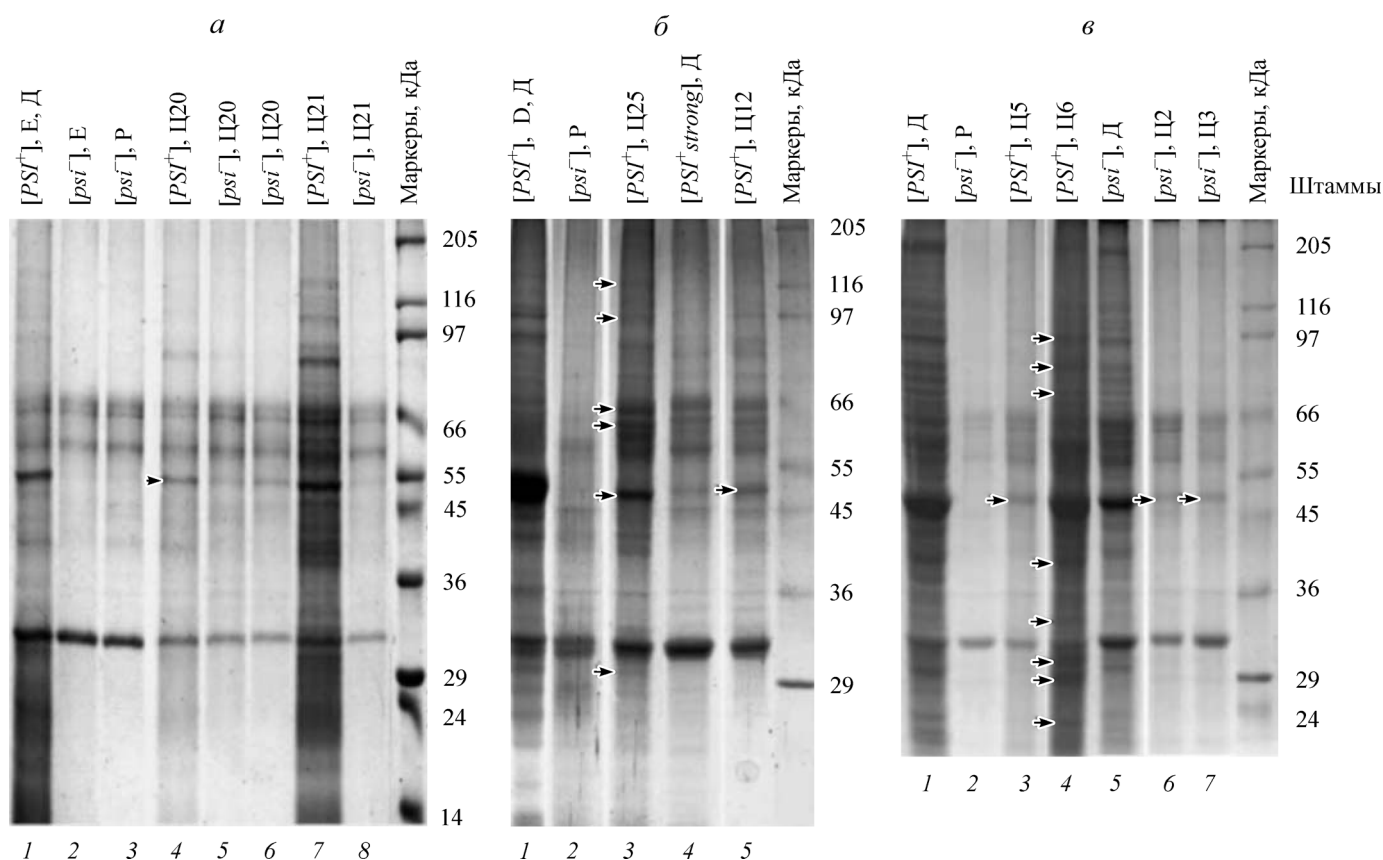


Рис. 3. Электрофореграммы осадочных белков, выделенных из цитодуктантов и родительских штаммов, разделенных в ПААГ — 9.5 (а) и 10 (б, в) %.

а: 1 — 74-E/SUP35 [$PSI^{+strong}$]; 2 — 74-E/GuHCl [psi^{-}]; 3 — реципиент В [psi^{-}]; 4 — C20 [PSI^{+}]/(74D-E)В; 5 — C20/HSP104 [psi^{-}]; 6 — C20/GuHCl [psi^{-}]; 7 — C21 [PSI^{+}]/(74D-E)В; 8 — C21/GuHCl [psi^{-}]. б: 1 — 74-D/SUP35 [PSI^{+}]; 2 — реципиент В [psi^{-}]; 3 — C25 [PSI^{+}]/(74D-D)В; 4 — OT56 [PSI^{+}]; 5 — C12 [PSI^{+}]/(OT56)В. в: 1 — GT26 [PSI^{+}]; 2 — реципиент В [psi^{-}]; 3 — C5 [PSI^{+}]/(GT26)В; 4 — C6 [PSI^{+}]/(GT26)В; 5 — GT27 [psi^{-}]; 6 — C2 [psi^{-}]/(GT27)В; 7 — C3 [psi^{-}]/(GT27)В. а-в представляют данные нескольких скрещиваний. Родительские штаммы, передавшие цитодуктанту [PSI^{+}]-фактор вместе с цитоплазмой, обозначены Д (донор), штамм, служащий реципиентом — Р, а цитодуктант — Ц. Кроме цитодуктантов представлены их производные [psi^{-}], полученные либо благодаря обработке GuHCl, либо с помощью плазмиды, несущей ген *HSP104* (а, дорожка 5). Стрелками отмечены бенды, общие для донора цитоплазмы и цитодуктанта, отсутствующие у штамма-реципиента.

механизмы, позволяющие обычным клеточным белкам передаваться цитодукцией, не описаны. Можно предположить, что наблюдаемое нами явление, скорее всего, имитирует цитоплазматическое наследование и возникает вследствие ассоциации подобных белков с прионами. Объяснение этому явлению мы приводим кратко в последней части этого раздела и более подробно в разделе «Обсуждение».

Идентификация прионзависимых белков. Чтобы идентифицировать осадочные белки, которые могут быть переданы или утрачены (полностью или частично) в результате прионотропных воздействий, мы использовали 2D-электрофорез с последующим MALDI-анализом. Для этого было поставлено несколько экспериментов, условно обозначенных буквами. В опыте А (рис. 4) мы отбирали те пятна, которые присутствовали на 2D-электрофореграмме цитодуктанта С6[PSI^{+}]/(GT26)В и отсутствовали в [psi^{-}]-штамме АН/В. Данные этого эксперимента позволяют визуализировать белки, переданные при цитодукции. Белки, идентифицированные в этом и других подобных экспериментах, указаны в табл. 1. В эксперименте С сравнивали 2D-электрофореграммы осадочных белков цитодуктанта С6[PSI^{+}]/(GT26)В и штамма [psi^{-} pin⁻] GT27, изогенного GT26. Целью этого эксперимента было выявить белки, передача которых при цито-

дукции не была связана с [PSI^{+}]-фактором. В табл. 1 С1 означает осадочные белки, присутствующие в штамме С6[PSI^{+}]/(GT26)В и отсутствующие в GT27, а С2 — общие для этих [PSI^{+}]- и [psi^{-}]-штаммов. Так как осадочные белки С6[PSI^{+}]/(GT26)В отсутствуют в реципиентном штамме АН/В (данные эксперимента А), белки С2 можно рассматривать формально как переданные цитодукцией. При такой постановке опыта можно было ответить на вопрос о том, какие из осадочных белков зависят от [PSI^{+}]-фактора, а какие попадают в осадок благодаря какому-то иному прионам.

В эксперименте Е отбирали осадочные белки из штамма С6 после применения к ним метода Крындушкина (Kryndushkin et al., 2003) (см. следующую часть раздела). Так как в этом случае белки изолировали из полимерной фракции, они, скорее всего, также относятся к прионассоциированным белкам. В дополнение к осадочным белкам, изолированным в 2D-электрофорезе, мы также делали попытку найти белки, способные после прохождения в концентрирующем 1.8%-ном агарозном геле двигаться в разделяющем 7%-ном ПААГ-SDS на уровне, превышающем мол. массу 205 кДа, несмотря на их низкую молекулярную массу (эксперимент D). В штамме АН/В нам удалось найти один такой белок, Cus1p, который, несмотря на мол. массу около 50 кДа, оказывался в верхней

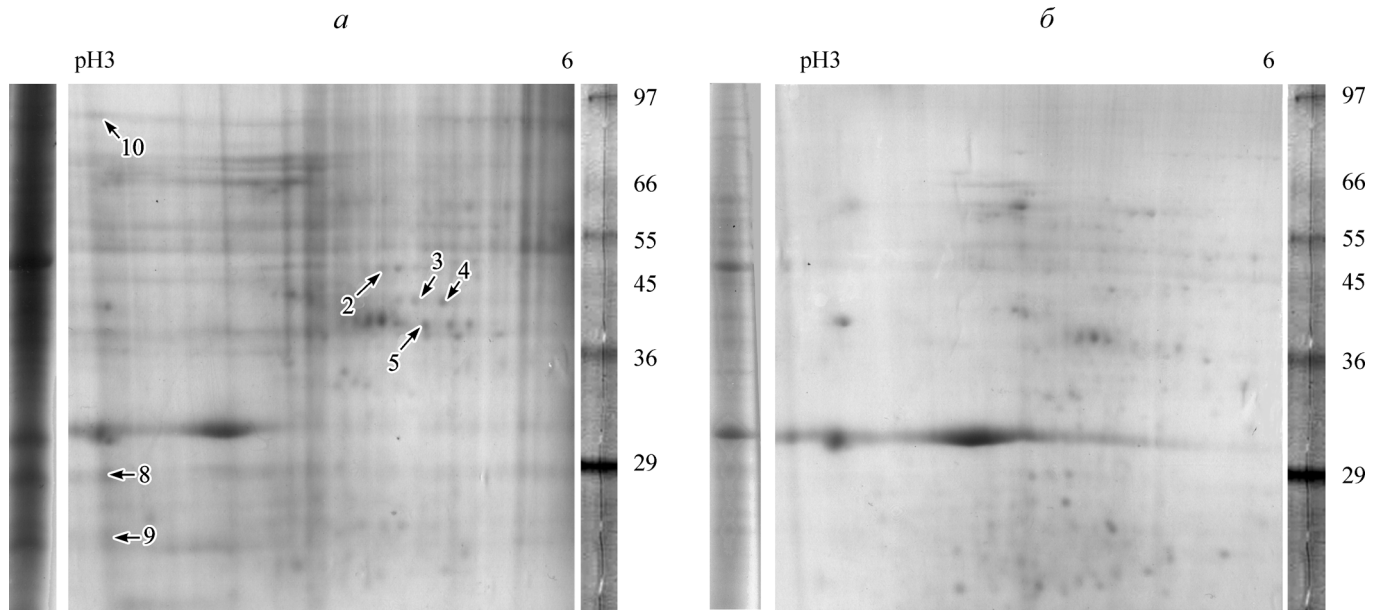


Рис. 4. Осадочные белки после разделения в 2D-электрофорезе, окрашенные Кумасси (эксперимент А).

а — цитодуктант С6 [*PSI*⁺]/(GT26)В, б — реципиент АН/В. Штаммы выращены на среде YEPD, содержащей 100 мг/л аденина. Левая вертикальная полоска представляет результат 1D-электрофореза, правая — маркеры молекулярной массы. Стрелками указаны пятна, которые присутствуют на 2D-электрофореграмме цитодуктанта и отсутствуют у реципиента. Номера пятен соответствуют идентифицированным белкам в табл. 1.

Таблица 1

Список идентифицированных прионов и прионассоциированных белков

Белок	Номер по классификации NCBI	Номер точки (эксперимент)	Функция белка	Мол. масса, кДа ^а	PI ^а	Число пептидов ^б	Найденная последовательность, % ^в
Sup35p ^г	—	—	Прионовый белок [<i>PSI</i> ⁺]	—	—	—	—
Rnq1p	NP_009902	3а (А) 4а (А)	Прионовый белок [<i>PIN</i> ⁺]	42.554	6.13	10	25
Hsp104p	NP_013074	70-3 (С2)	Шаперон	101.972	5.31	16	21
Ssb1p (HSP70 family)	NP_010052	733b (С2)	»	66.561	5.32	28	53
Hsp42p	NP_010456	08 (Е)	»	42.791	4.99	12	30
Hsp26p	NP_009628	14 (Е) 15 (Е) 17 (Е) 18 (Е)	»	23.865	5.31	9 9 8 6	43 43 38 37
Hsp78p	NP_010544	67а (С1) 68а (С1) 69а (С1)	Шаперон митохондриальный	91.280	8.17	27 32 29	39 42 38
Ssc1p (HSP70 family)	NP_012579	01 (Е)	То же	70.585	5.48	12	21
Eno2p	NP_012044	2а (А) 78а (С2) 12 (Е)	Кошаперон, метаболизм глюкозы	46.885	5.67	17 15 9	50 34 23
Eno1p	NP_011770	79а (С2) 90-4 (С2) 5 (Е) 6 (Е)	Метаболизм глюкозы	46.601	6.04	17 10 18 15	40 20 40 41
Adh1p	NP_014555	5а (А) 84а (С2) 86а (С2)	» »	36.826	6.21	18 8 11	55 28 41
Cdc19p	NP_009362	77а (С2)	» »	54.564	8.0	10	23
Fba1p	NP_012863	83-а4 (С2)	» »	39.596	5.51	8	29

Таблица 1 (продолжение)

Белок	Номер по классификации NCBI	Номер точки (эксперимент)	Функция белка	Мол. масса, кДа ^а	PI ^а	Число пептидов ^б	Найденная последовательность, % ^в
Pdc1p	NP_013145	76a (C2) 83-5 (C2)	» »	61.457	5.8	19	36
Pgk1p	NP_009938.2	80a (C2) 81a (C2)	» »	44.552	6.73	22	50
Tdh2p	NP_012542	22-с (E)	» »	35.824	6.46	6	15
Tri1p	NP_010335	87a (C2) 16-a (E)	Метаболизм глюкозы, реакция на окислительный стресс	26.795	5.86	9	39
Ald4p	NP_015019	76b (C2)	Метаболизм глюкозы в митохондриях	56.688	6.31	14	32
Aco1p	NP_013407	10a (A) 730b (C2)	Цикл Кребса	85.315	8.17	27	28
Yhb1p	NP_011750	83-a3 (C2)	Реакция клетки на окислительный стресс	44.618	5.86	13	53
Sod2p	NP_011872	754 (C2)	То же, защита митохондрий	25.758	8.49	5	33
Pab1p	NP_011092	21 (E) 66a (C1)	Трансляция (инициация) Связывание поли(А)	64.304	5.71	30	49
Rpl2ap or Rpl2bp	NP_116688 NP_012246	8a (A)	Трансляция, белки Рибосомы	27.261	11.10	13	62
Rpl8bp	NP_013055	8b (A)	Белки Рибосомы	28.094	10.02	12	41
Rps6bp	NP_009740	8с (A)	» »	26.980	10.44	8	30
Rpl10p	NP_013176	9a (A)	» »	25.345	10.03	9	36
Rpl9ap	NP_014332	9b (A)	» »	21.644	9.66	6	26
Grs1p	NP_009679	67b (C1)	Трансляция, аминокислотирование тРНК, терминация транскрипции	75.364	5.71	16	22
Act1p	NP_116614	4b (A)	Цитоскелет, актин, реакция на окислительный стресс,	41.678	5.44	7	21
		82-b (C2)	синтез GDP-маннозы, синтез и стабильность клеточной стенки			14	47
Psa1p	NP_010228	84b (C2)		39.541	5.95	6	21
Lpd1p	NP_116635	03-b (E)	Дегидрогеназа	54.010	8.11	8	17
Peo4p	NP_015171	10 (E)	Протеиназа	44.471	4.70	13	27
Ilv5p	NP_013459	72a (C2) 85-3 (C2) 11 (E)	Синтез лейцина, изолейцина и валина	44.341	9.10	21	57
						18	50
						20	49
Leu4p	NP_014295	66b (C1)	То же	65.123	5.43	22	37
Cus1p	NP_013967	109a (D)	Сборка сплайсосомы	50.221	8.87	6	20
Msc1p	NP_013578	03-a (E)	Мейотическая рекомбинация	59.552	7.06	12	21
Por1p	NP_014343	89-3 (C2) 22-b (E)	Структура митохондрий, порин	30.410	7.70	18	81
						8	30
Qcr2p	NP_015517	83-b3 (C2) 19 (E) 22-a (E)	Дыхание	40.453	7.67	11	31
						13	39
						6	21
Qcr7p	NP_010818	90-3 (C2)	»	14.556	5.62	8	69

Примечание. ^а Теоретические значения. ^б Число пептидов, идентифицированных при помощи MALDI, совпадающих с пептидами данного белка. ^в Доля (в %) перекрытия идентифицированного белка экспериментально найденными пептидами. ^г Был идентифицирован при помощи иммуноблот-анализа. Эксперименты — на электрофореграмме 2D-(A, C1, C2, E) или 1D-(D) электрофореза отбирали пятна, содержащие осадочные белки следующих штаммов: белки штамма С6 [PSI⁺]/(GT26)В, которые отсутствовали в пробах [psi⁻] штамма В (сокращенное от АН/В) (А); белки штамма С6[PSI⁺]/(GT26)В, которые отсутствовали в пробах штаммов GT27 (C1) и АН/33; белки [psi⁻] штамма GT27, которые присутствовали у С6 [PSI⁺]/(GT26)В и отсутствовали у штамма АН/В (C2); осадочные белки штамма С6 [PSI⁺]/(GT26)В, отсутствующие в аналогичной пробе штамма АН/В — из обогащенного белковыми полимерами материала, который задержался в стартовой области геля (по методу: Kryndushkin et al., 2003) (E); участок бэнда штамма АН/В [psi⁻] с мол. массой около 200 кДа (D).

Т а б л и ц а 2

**Группировка белков по их способности взаимодействовать друг с другом и число молекул каждого белка
(указано в скобках) в клетках дрожжей**

Группа белков							
Группа взаимодействия функциональная группа	SUP35	RNQ1	NEW1	SWI1 и PRB1	ADH1	Мини	Не взаимодействующие с идентифицированными белками
Прионы Шапероны и кошапероны Белки метаболизма глюкозы и цикла Кребса	Sup35 ^{pr} (78 900) Hsp104p (32 800) Ssb1p (170 000)	Rnq1p (1140)	Hsp26p (19 300) Hsp42p (1470) Aco1p (96 700) Cdc19p (291 000)		<u>Eno2p</u> (2610) Adh1p(?) <u>Eno2p</u> (2610) Fba1p (1 020 000) Pdc1p (8970) Pgc1p (314 000) Tdh2p (121 000) Tpi1p (207 000)	Hsp78p (2990)(C1) Ssc1p(?) Eno1p (76 700)	Ald4p (22 200)
Белки трансляции	Grs1p (98 400)(C1) Pab1p (198 000)(C1)		Rpl2ap (?) или Rpl2bp (4050) Rpl8bp (80 200) Rpl9ap (52 400) Rpl10p(?) Rps6bp (38 800) Yhb1p (13 000)				
Белки окислительного стресса Другие белки	Sod2p (10 900) Act1p (?)	Ptv5p (883 000)	Por1p (?) Psa1p (97 100) <u>Qcr2p</u> (35 700) <u>Qcr7p</u> (10 100)	<u>Cus1p_Swi</u> (1830) Pep4p Prb (?)			Leu4p (6630)(C1) <u>Lpd1p</u> (24 600) <u>Msc1p</u> (1070)

Примечание.^a Идентифицирован при помощи иммуноблот-анализа. Таблица создана на основе базы данных: Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>), 20.02. 2009. Группировка белков основана на способности идентифицированных в настоящей работе белков взаимодействовать с белками известных прионов (или других белков, идентифицированных в настоящей работе, способных взаимодействовать с прионами). Число молекул на клетку указано также на основе Базы данных генома дрожжей. Подчеркнуты названия генов, присутствующих в количестве, меньшем чем 50 000 молекул на клетку. Курсивом показаны названия генов, которые относятся к нескольким группам. Подробности приведены в тексте раздела «Результаты». Вспросительный знак означает отсутствие данных по количеству белка в Базе данных. C1 указывает белки, найденные только в опыте C1.

части ПААГ, на уровне маркера 205 кДа. В соответствии с сахаромичетной базой данных этот белок способен взаимодействовать с недавно открытым прионом — фактором Swi1, участвующим в перестройках хроматина (Du et al., 2008).

Во всех приведенных выше экспериментах, суммированных в табл. 1, было идентифицировано 38 белков, многие из них были выявлены в разных опытах. В табл. 1 указаны названия белков в соответствии с базой данных NCBI, их номер, эксперимент и номер пятна, выявленного на соответствующем 2D-электрофореze, как это показано на рис. 4. (Большинство белков было идентифицировано также и в других экспериментах, не описываемых в настоящей работе).

Табл. 2 суммирует данные анализа идентифицированных белков и классифицирует их по функциональным группам и по принципу белок-белковых взаимодействий. Белки, способные взаимодействовать с членами разных групп, для разгрузки таблицы указываются только при одной из этих групп, как правило той, с которой у данного белка оказывается большее сродство. Так, белки Qcr2p, Qcr7p и Rps6bp (принадлежащие к группам SUP35+NEW1) показаны при группе NEW1, Hsp104p (из SUP35+URE2) — при SUP35, Eno2p (из SUP35+ADH1) — при ADH1, Cus1p (из SUP35+SWI1) — при SWI1.

Qcr2p и Qcr7p способны взаимодействовать с белком Tsa1p, идентифицированным в экспериментах, приведенных в нашей другой статье (Nevzglyadova et al., 2010), и принадлежащим к группам SUP35 и NEW1, и поэтому тоже считаются условно принадлежащими к этим же двум группам. Tdh2p способен взаимодействовать с Tdh3p, принадлежащим к группе ADH1, и поэтому считается и сам принадлежащим к этой же группе. Pab1p способен взаимодействовать с белком CUS1, принадлежащим к группам SUP35 и SWI1, но большинство взаимодействий с белками, идентифицированными нами в других экспериментах, свидетельствует о принадлежности Pab1p к группе SUP35. Sod2p способен взаимодействовать с Sod1p, идентифицированным в других наших экспериментах (Nevzglyadova и др., 2009) и на основе этих данных, вместе с Sod1p принадлежит к группе SUP35. Plv5p приписан к группе RNQ1, так как он способен взаимодействовать с Rnq1p-связывающим белком, не найденным в наших экспериментах. Per4p принадлежит к группе неамилоидного приона PCB1 (см. в тексте). Ald4p приписан к группе бекон, не взаимодействующих с другими белками в наших экспериментах, но, возможно, он все же принадлежит к группам SUP35 и NEW1. Об этом свидетельствуют взаимодействия с белками, не идентифицированными в наших экспериментах.

Белки, рассмотренные в табл. 2, подробно обсуждаются в следующем разделе.

Данные в пользу физического взаимодействия между прионзависимыми белками и прионами. Приблизительно 30 разных осадочных белков (изолированных в экспериментах A и C2) передается при цитодукции, подобно тому как передаются прионизированные белки. Для объяснения того, каким образом неприонизированные белки могут передаваться цитодукцией, можно выдвинуть по крайней мере два объяснения. Согласно первому, трансмиссия семян отдельных прионов в клетку реципиента катализирует переход соответствующих белков из растворенного состояния в агрегированное, что в свою очередь сопровождается формированием в клетках комплексов, включающих в

себя кроме прионов прион-ассоциированные белки. Вместе с прионами они попадают в осадочную фракцию. Согласно альтернативному объяснению, синтез некоторых растворенных белков может увеличиваться в присутствии $[PSI^+]$ -фактора (или иных прионизированных белков), и это чисто механически может приводить к их частичной седиментации вместе с агрегированными белками.

Чтобы проверить вторую гипотезу, мы проводили блот-гибридизацию белков, выделенных из осветленных лизатов и их осадков у $[PSI^+]$ - и $[psi^-]$ -штаммов, с антителами к Sup35p и Hsp104p. Мы выбрали две пары штаммов (рис. 5, дорожки 1—4 представляют одну пару, дорожки 5—8 — другую) и обнаружили, что они по-разному отвечали на прионизацию Sup35p. На рис. 5, а приводятся электрофореграммы исследуемых белков, окрашенных Кумасси. Интенсивность окраски у проб, соответствующих выровненным по количеству белков лизатам, одинакова (дорожки 3, 4 для одной изогенной пары и дорожки 7, 8 — для другой). В то же время полученные из лизатов $[psi^-]$ - и $[PSI^+]$ -клеток осадки значительно различаются своим белковым составом (дорожки 1, 2 для одной и 5, 6 для другой изогенной пары). На рис. 5, б дорожки 2, 4 представляют положительный иммунный ответ на оба антитела белков, выделенных из осадка и лизата $[PSI^+]$ -штамма со сверхпродукцией Sup35p. У $[psi^-]$ -штамма (дорожки 1, 3) количество белка Sup35p в лизате оказалось сниженным, а белок Hsp104 вообще не был обнаружен. Может быть, это вызвано тем, что при процедуре осветления грубого лизата седиментация при 5000 g сопровождается его переходом в агрегированное состояние совместно с предположительным неизвестным прионом. Дорожки 6 и 8 на рис. 5, б представляют белки из $[PSI^+]$ -цитодуктанта (из осадка и лизата соответственно), которые при сравнении с дорожками 5 и 7, представляющими белки из $[psi^-]$ -реципиента, различаются только в осадочных фракциях. Гипотезе о сверхсинтезе прионассоциированных белков у прионсодержащих штаммов противоречит тот факт, что в осадках $[psi^-]$ - и $[PSI^+]$ -штаммов в первой паре количество белка Hsp104 оказывается одинаковым (ср. дорожки 1 и 2 на рис. 5, б). Противоречивые ответы у разных изогенных пар также не говорят в пользу сверхсинтеза как фактора, определяющего переход белков в агрегированное состояние.

Чтобы проверить наличие физического взаимодействия прионассоциированных белков с прионами, был поставлен эксперимент E. Применяя метод Крындушкина (Kryndushkin et al., 2003) к осадочным белкам из цитодуктанта C6 $[PSI^+]$ /(GT26)В и реципиента АН/В, мы вырезали верхнюю 10-миллиметровую полоску ПААГ и элюировали содержащиеся в ней мелкие агрегаты белков. Белки перереосадили и растворяли в буфере для 2D-электрофореze, а затем после разделения 2D-электрофорезом отбирали те точки штамма C6, которые отсутствовали в реципиенте. После их идентификации по MALDI оказалось, что группа белков, элюированная из участка ПААГ, обогащенного полимерами, в большей мере повторяла осадочные белки, выделенные нами ранее. Из 14 белков в эксперименте E 7 были идентифицированы ранее, в эксперименте A, из оставшихся 3 оказались шаперонами, а 1 — белком, участвующим в метаболизме глюкозы (табл. 1). Эти данные говорят о том, что даже если $[PSI^+]$ приводит к увеличению синтеза некоторых белков (благодаря своеобразному молекулярному стрессу), эти белки все равно мобилизуются в белковые агрегаты.

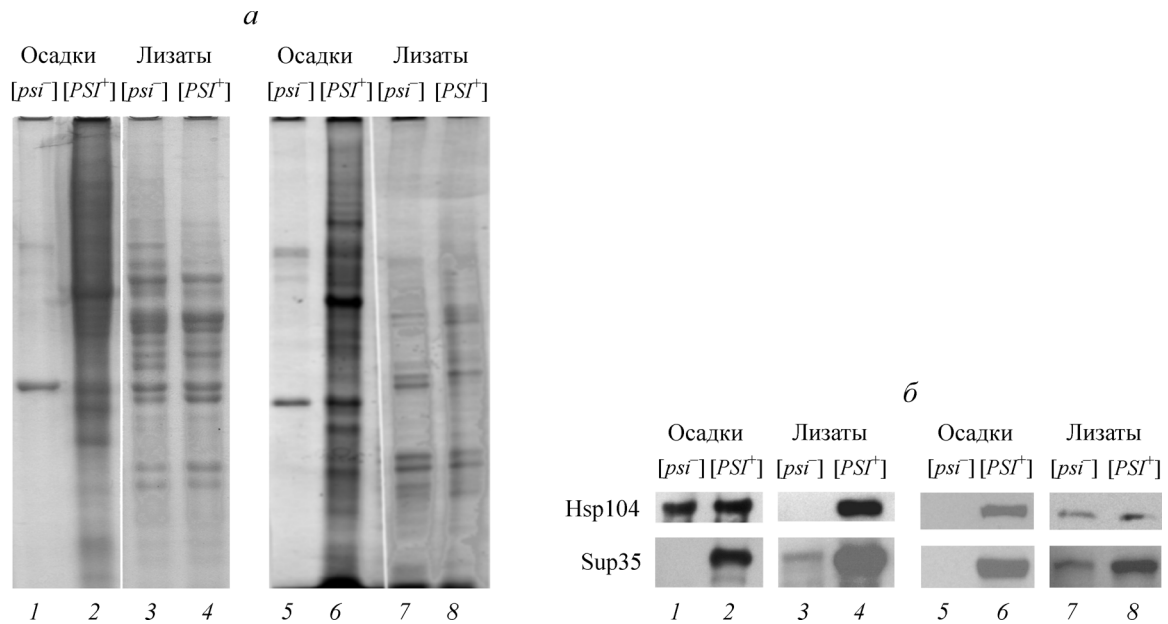


Рис. 5. Вестерн-блоты белков из лизатов и их осадков, выделенных из клеток изогенных $[psi^-]$ - и $[PSI^+]$ -штаммов.

a — пробы, окрашенные Кумасси; *б* — Вестерн-блоты. 1, 2 — осадочные белки из штамма 74-C/GuHCl $[psi^-]$ и 74-C/SUP35 $[PSI^+]$ соответственно; 3, 4 — белки из осветленных лизатов, полученных из клеток тех же штаммов; 5, 6 — осадочные белки из АН/В и С6 $[PSI^+]$ /(GT26)В соответственно; 7, 8 — белки из осветленных лизатов, полученных из клеток тех же штаммов. Клеточные лизаты после откручивания от бус просветляли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин (Jung et al., 2000). После этого брали 20 мкг лизата на пробу, пересаждали, растворяли в буфере, содержащем 3% β -МЕ, и кипятили в течение 10 мин перед нанесением в лунки. Белки разделяли в 10%-ном SDS-ПААГ, переносили на мембраны типа PVDF и обрабатывали антителами против белков Sup35p и Hsp104p.

Обсуждение

Оптимизация условий выделения прион-зависимых белков. Задача настоящей работы состоит в скрининге белков, так или иначе связанных с прионами (прионзависимых или прионассоциированных). Для решения этой задачи мы модифицировали процедуры получения осадков из грубых лизатов дрожжей таким образом, чтобы они содержали как можно больше агрегированных молекул и их комплексов. После механического разрушения клеток стеклянными шариками пробы откручивали в щадящих условиях при 100 г в течение 1 мин, а затем осадки грубых лизатов получали центрифугированием при 1000 г в течение 30 мин. Сравнимые экстрагированные из осадков белки принадлежали к изогенным штаммам, различающимся прионовым содержанием. При этом изменение прионного состава вызывали разными прионотропными воздействиями и контролировали независимыми методами. Так, наличие SUP35p в осадках из $[PSI^+]$ -штамма и отсутствие в осадках из $[psi^-]$ -штаммов (полученных в результате обработки клеток GuHCl) были показаны иммуноблотингом (рис. 1, *a—б*), а присутствие Rnq1p в цитодуктанте и отсутствие в $[psi^- pin^-]$ -реципиенте — при помощи 2D-электрофореза с последующим MALDI-анализом (табл. 1). Эти данные подтверждают, что прионовый состав осадков грубых лизатов изучаемых нами пар штаммов менялся в соответствии с примененным прионотропным воздействием. Сравнивая экстрагированные из осадков грубых лизатов белки в ПААГ и 2D-электрофорезе, мы наблюдали значительные различия у этих белков, хотя сами по себе они не являлись прионами (их прохождение через сито ПААГ не зависело от кипячения проб). Так как мы использовали штаммы, различающиеся только прионовым составом, естественно

полагать, что изменения, которые мы в этом составе вызываем, как раз и служат причиной наблюдаемых различий. Иначе говоря, включение белков из осадков грубых лизатов в состав агрегатов зависит от примененного прионотропного воздействия. Естественно предположить, что эти белки оказываются в составе агрегатов в результате взаимодействия с прионовыми фибриллами. Белки, присутствие которых в осадках коварирует с изменением прионного содержания, можно называть прионассоциированными. Теоретически к ним могут относиться также белки, синтез которых стимулируется тем или иным прионом и которые, связываясь с ним или с каким-либо клеточным агрегатом, присоединяются к осадочной фракции. При этом наши данные не дают возможности судить о химической природе взаимодействий выявленных нами белков с прионами и с другими прионассоциированными белками. Белок-белковые взаимодействия, приведенные в базе данных для генома сахаромикетов, были выявлены на основе самых разных генетических и биохимических тестов, поэтому мы можем говорить о прионассоциированных белках только в самом широком смысле.

Цитодукция. Интересно и на первый взгляд парадоксально, что идентифицированные нами белки ведут себя при цитодукции как прионы — они прослеживаются как у штамма, донора цитоплазмы, так и у цитодуктантов. Тем не менее у нас нет ни собственных биохимических, ни литературных данных, позволяющих считать их прионизируемыми белками. Литературные свидетельства, представленные в геномной базе данных сахаромикетов, ясно говорят о том, что эти белки должны быть прионассоциированными. Вряд ли можно считать простым совпадением то, что более 50 % белков, идентифицированных в нашей работе, относятся к группе белков, взаимодействие

которых с прионизируемыми белками прямо или косвенно было установлено ранее (табл. 2).

О непосредственной связи идентифицированных белков с прионами свидетельствуют и вышеприведенные данные опыта, поставленного по методу Крындушкина (Kryndushkin et al., 2003): многие белки, общие для донора и цитодуктанта, оказались связанными с небольшими агрегатами, мигрирующими из агарозного концентрирующего геля в верхнюю область разделяющего ПААГ. Это позволяет предположить, что хотя идентифицированные белки сами не могут передаваться цитодукцией, не являясь прионами, они могут присоединяться к агрегатам и, следовательно, седиментировать вместе с прионами. Можно сказать, что белки, выделенные из цитодуктантов и идентифицированные нами, имитируют прионовое наследование, так как следуют за ними. Механизм того, как прионзависимые белки могут оказываться в осадках грубых лизатов цитодуктанта, представляется нам следующим образом. От донорной $[PSI^+]$ -клетки в результате ее скрещивания с $[psi^-]$ -реципиентом в гетерокарион приходит цитоплазма, обогащенная прионизируемыми молекулами белков, не обязательно только Sup35p, но и неизвестных. Благодаря шаперонам они дают семена, переходящие в дочернюю клетку (цитодуктант), где снова превращаются в фибриллы (Satpute-Krishnan, Serio, 2005). В свою очередь фибриллы являются аттрактантами для других прионзависимых белков, участвующих в их «жизненном цикле». Прионзависимые белки связываются с прионами и седиментируют вместе с ними. В результате в осадках грубых лизатов $[PSI^+]$ -цитодуктанта мы находим белки, которых нет в осадках изогенного $[psi^-]$ -реципиентного штамма, так как у него из-за отсутствия прионов они находятся в растворимом состоянии.

Функция и спектр взаимодействия идентифицированных прионзависимых белков. Список белков, определенных с помощью 2D-электрофореза и идентифицированных с помощью MALDI-анализа, насчитывает 35 наименований (табл. 1). 47 % белков представляют собой шапероны и энзимы, вовлеченные в метаболизм глюкозы. Однако среди идентифицированных белков следует отметить еще две функциональные группы — это белки, участвующие в трансляции и в клеточной реакции на окислительный стресс. Пользуясь базой данных для генома сахаромикетов, мы установили «знакомство» идентифицированных белков друг с другом. Для этого выяснялись их взаимодействия во всех возможных попарных комбинациях. Анализа такого рода до нас не использовали. Оказалось, что по признаку знакомства белки достаточно четко делятся на отдельные группы. (При этом между членами разных групп пересечения достаточно малочисленны.) Группы белков, способные взаимодействовать с тем или иным прионом, соотносены с классификацией, основанной на функции идентифицированных белков в клетке (табл. 2). Некоторые группы содержат прионы или белки, которые, судя по базе данных, способны взаимодействовать с прионизируемыми белками. Для краткости выделенные нами группы названы или по имени относящегося к ним приона, или другого, характерного для группы белка. Из 35 идентифицированных белков, приобретающих агрегированное состояние в ответ на прионотропные воздействия, 22 способны взаимодействовать с прионами или белками, взаимодействующими с прионами.

11 белков, идентифицированных при помощи MALDI, способны взаимодействовать с Sup35p (или с другими

белками, идентифицированными в данной работе и способными взаимодействовать с этим прионом): *Act1p*, *Cus1p*, *Eno2p*, *Grs1p*, *Hsp104p*, *Pab1p*, *Qcr2p*, *Qcr7p*, *Rps6Bp*, *Sod2p* и *Ssb1p*. Часть белков (выделено курсивом) принадлежит только к группе SUP35p. Из них *Ssb1p* — также важный компонент шаперонного обеспечения, необходимого для размножения прионов (Chernoff et al., 1999). Сам прионизируемый белок Sup35p был идентифицирован при помощи иммуноблот-анализа.

Более 30 % идентифицированных в нашей работе белков взаимодействуют прямо или опосредованно с гипотетическим прионом $[NU^+]$ (NEW1): *Aco1p*, *Cdc19p*, *Hsp26p*, *Hsp42p*, *Por1p*, *Psa1p*, 4 белка большой субъединицы рибосомы, *Yhb1p* (все они взаимодействуют только с *New1p*), а также *Qcr2p*, *Qcr7p* и *Rps6Bp*, которые взаимодействуют также и с группой Sup35p. Обширная группа NEW1 позволяет предположить, что прион $[NU^+]$, который достаточно редко включают в список доказанных дрожжевых прионов (Harrison et al., 2007), присутствует в наших штаммах и играет важную роль в формировании белковых агрегатов. Мы надеемся прояснить наличие (или отсутствие) приона $[NU^+]$ в наших дальнейших экспериментах.

Группа белков, участвующих в трансляции, представляет большой интерес. Она может быть связана с присутствием $[NU^+]$ в наших штаммах, так как 6 из 8 идентифицированных нами белков, участвующих в трансляции, способны взаимодействовать с *New1p*. Еще один белок этой группы (*Rps6Bp*) связан с Sup35p. Также следует отметить, что белки трансляции были найдены в полиглутаминовых модельных агрегатах (Wang et al., 2007, 2008). Таким образом, белки трансляции имеют тенденцию связываться с весьма разными прионами. Их роль не кажется тривиальной и требует уточнения.

Кроме самого *Rnq1p* (найденного в эксперименте A), мы не обнаружили белков, связанных с $[PIN^+]$. Исключением служит один белок — *Plv5p*, взаимодействующий с не идентифицированными в настоящей работе белками группы RNQ1. *Hsp104p* — основной шаперон, ответственный за образование прионовых семян (Chernoff et al., 1993), оказался способным взаимодействовать как с Sup35p, так и с *Ure2p*.

Группа белков, вовлеченных в метаболизм глюкозы, названная по имени белка *Adh1p*, содержит 7 белков: *Adh1p*, *Eno2p*, *Fba1p*, *Pdc1p*, *Pgk1p*, *Tdh2p*, и *Tpi1p*. Один из членов этой группы, *Eno2p*, взаимодействует также с SUP35. Все же данные из литературы (Erjavec et al., 2007; Wang et al., 2008), скорее указывают на независимость этой группы, так как белки группы ADH1 входят и в состав полиглутаминовых агрегатов, не связанных с Sup35p.

4 идентифицированных белка не участвуют ни в каких взаимодействиях. (Хотя косвенные данные, полученные из геномной базы, говорят о возможной связи одного из этих белков *Ald4p* с Sup35p и *New1p*.)

Белки-кандидаты на роль новых дрожжевых прионов. Среди идентифицированных нами белков неслучайным кажется присутствие *Sod2p* и *Yhb1p*, которые участвуют в клеточном ответе на окислительный стресс. Результаты недавних исследований указывают на значительное перекрытие между процессами, вовлеченными в прионизацию, и реакцией клетки на окислительный стресс (Sitia, Molteni, 2004; Cashikar et al., 2005; Watt et al., 2005; Erjavec et al., 2007; Herczenik, Gebbink, 2008). Есть данные (Glabe, 2008) об аккумуляции агреги-

рованной супероксиддисмутазы при амиотропном латеральном склерозе (amyotrophic lateral sclerosis). Было показано, что мутантные формы Sod1p при этом заболевании имеют амилоидную структуру (Elam et al., 2003; Banci, 2008). В нашей последующей работе (Невзглядова и др., 2010) мы кроме Sod2p идентифицировали и Sod1p. Так как этот белок способен взаимодействовать с группой SUP35, мы получили некоторые основания расположить Sod1p и Sod2p в группе SUP35. В любом случае, к какой бы группе они ни относились, обнаружение этих белков в осадках грубых лизатов наших штаммов представляет значительный интерес, так как указывает, что среди прионассоциированных белков находятся как белки, повреждаемые при окислительном стрессе (белки группы ADH1), так и белки, осуществляющие клеточный ответ на него.

Не исключено, что по аналогии с данными, полученными на высших организмах, Sod1p может амилоидизироваться и в клетках дрожжей. Другим возможным кандидатом на роль нового для дрожжей амилоида (или приона) является Cus1p. Cus1p имеет мол. массу около 50 кДа, тем не менее мы выявили его в ПААГ-SDS на уровне, соответствующем 205 кДа. Такое местоположение Cus1p может быть объяснено как следствие появления в осадочной фракции промежуточной формы амилоида — префибриллярных олигомеров, подробно рассмотренных в теоретической работе (Glabe, 2008).

Таким образом, возможность амилоидизации Cus1p и Sod1/2p явно заслуживает дальнейшего изучения. Она является тем более интригующей, что названные выше белки не являются NQ-богатыми в отличие от всех известных собственных прионов дрожжей. Тем не менее было показано, что NQ-небогатый прионизирующий домен белка HET-s грибка *Podospora*, слитый с GFP, способен в дрожжевых клетках самовоспроизводиться как прион (Taneja et al., 2007). Это показывает, что в дрожжевых клетках существует механизм, поддерживающий прионизацию не NQ-богатых белков.

Отсутствие зависимости ряда прионассоциированных белков от $[PSI^+]$. Сравнение $[PSI^+]$ -цитодуктанта с $[psi^-]$ -культурой GT27 (которая содержит в осадке необычно много белков) дало нам возможность определить, какие из прионассоциированных белков зависят от $[PSI^+]$ -фактора, а какие нет (табл. 1). Оказалось, что большинство белков, общих для $[psi^-]$ GT27 и C6 $[PSI^+]$, относится к группе ADH1. Это 6 из 7 белков (табл. 1, эксперимент C2). 5 других белков относятся к группе NEW1: Aco1p, Cdc19, Por1p, Psa1p и Yhb1p. Неожиданным оказалось присутствие в $[psi^-]$ GT27 7 белков (Act1p, Hsp104p, Qcr2p, Qcr7, Sod2p, Ssb1p и Eno2p), взаимодействующих с белками группы SUP35.

Можно предположить, что они связаны не только с Sup35p, но и с другими прионами. Это кажется вероятным, если принять во внимание выполняемые ими функции: часть из них является шаперонами и кошаперонами, а часть — белками цитоскелета. Данные, полученные в эксперименте C2, имеют особое значение, так как противоречат наиболее простой гипотезе, объясняющей, почему в осадках грубых лизатов у $[PSI^+]$ -клеток оказывается большее число белков, чем у $[psi^-]$ -партнеров. Согласно этой гипотезе, некоторое количество белков с увеличенной молекулярной массой и измененной конформацией, образующееся при неправильном прочтении знаков конца трансляции при воздействии $[PSI^+]$ -фактора, может связываться с другими белками, прежде всего с шаперонами, и увлекать их в осадочную фракцию. (Хотя подобное счи-

тывание знаков терминации не может быть массовым, так как естественные знаки терминации в отличие от возникающих в середине гена нонсенс-мутаций находятся в особом нуклеотидном контексте, минимизирующем возможность считывания.)

Возможность амилоидизации белков, принадлежащих к мини-группе и к группе Adh1p. Наши данные говорят о том, что к большой группе белков, обнаруженных в осадках грубых лизатов $[psi^-]$ -штамма GT27, такое объяснение явно не подходит, как и к описанному ранее Cus1p (так как он тоже был найден в $[psi^-]$ -штамме АН/В). Здесь же стоит отметить группу белков, найденную в эксперименте E, в котором белки «заманивали» в верхнюю полосу ПААГ методом Крындущкина (Kryndushkin et al., 2003). Из этих 14 белков, локализованных там же, где находятся полимеры, лишь один (Sod2p) принадлежал только к группе Sup35. Это наводит на мысль о присутствии в штаммах других прионов, возможно, не выявленных ранее. Мини-группа из 3 белков (Eno1p, Hsp78p и Ssc1p), 2 из которых (выделены курсивом) являются шаперонами, служит косвенным подтверждением такой возможности. Из этой группы, правда, Hsp78p был идентифицирован только в эксперименте C1 и не может быть однозначно причислен к истинным прионассоциированным белкам. Однако Eno1p и Ssc1p были найдены в более доказательном эксперименте E во фракции белков, обогащенных полимерами.

Другим кандидатом на роль прионизируемого белка мог бы стать какой-то член группы ADH1. Идентификация подобной многочисленной группы белков, участвующих в метаболизме глюкозы, указывает на их неслучайное появление среди осадочных белков и особую роль.

Недавно появились данные двух групп исследователей, посвященные белкам, ассоциированным с очищенными агрегатами, содержащими $[PSI^+]$ -прион (Bagriantsev et al., 2008) и прионоподобный полиглутаминовый домен, кодируемый первым экзоном гена хантинтина, клонированного в дрожжах (Wang et al., 2007, 2008).

В работах этих авторов, как и в нашей, идентифицированы белки, которые в основном относятся к шаперонам и кошаперонам. Если одни авторы (Bagriantsev et al., 2008) ограничиваются описанием только наиболее обильных в агрегатах шаперонов, то другие (Wang et al., 2007, 2008) отмечают, что изученные ими полиглутаминовые агрегаты содержат на удивление много белков, участвующих в метаболизме глюкозы, включая Adh1p, Fba2p и Eno2p. Совпадение наших результатов с данными из литературы (Wang et al., 2007, 2008) позволяет думать, что в обоих случаях идентифицированные белки имели общее происхождение — были получены из одних и тех же молекулярных комплексов. Ими могут быть либо агресомы (Wang, 2008), либо иные агрегаты, участвующие в амилоидном метаболизме.

Ванг и соавторы (Wang et al., 2007, 2008) объясняют присутствие гликолитических энзимов в полиглутаминовых агрегатах их чувствительностью к окислительному стрессу или склонностью гликолитических энзимов вступать во взаимодействия с хантингином, что было установлено на клетках млекопитающих. Наши данные согласуются только с первым объяснением: так, в своих опытах мы выявили практически те же белки гликолиза, но при этом не имели дела с клонированным экзоном гена хантинтина.

То, что какой-то из белков группы ADH1 может перейти в амилоидное состояние и в таком виде потянуть за

собой в осадок остальные белки этой группы, находит косвенное подтверждение в другой работе (Erjavec et al., 2007). Из 6 идентифицированных этими авторами карбонилированных белков гликолиза 5 (Eno2p, Pdc1p, Fba1p, Adh1p и Tri1p) были найдены и нами. Если учесть, что карбонилированием клетка метит поврежденные белки неправильной конформации в ходе окислительного стресса, то эти данные могут стать независимой «уликой» их способности к агрегированию и, возможно, также к амилоидизации. Существенно то (Erjavec et al., 2007), что среди карбонилированных белков оказываются белки группы ADH1, а не белки контрольной группы, тоже вовлеченные в энергетический метаболизм и обильно присутствующие в клетке. Здесь хотелось бы заметить, что эти данные (Erjavec et al., 2007) и наши некоторым образом дополняют друг друга. Дело в том, что ряд белков, в основном принадлежащих к группе ADH1, по количеству своих молекул в клетке сильно превосходят большинство других белков. Нельзя исключить возможность того, что они увлекаются в осадки, чисто механически связываясь с ними. Это не кажется вероятным для белков, количество которых в клетке много меньше (табл. 2). Впрочем, для наших опытов, даже для самых часто встречающихся белков, приведенное объяснение очень маловероятно, так как мы отбираем для анализа только те белки, которые отсутствуют в осадках грубых лизатов изогенной пары. В связи с данными литературы (Erjavec et al., 2007) хотелось бы также отметить, что среди найденных нами прионозависимых белков находятся белки окислительного стресса — Sod2p (изолированный в двух разных экспериментах), Yhb1p, Tdb2p и Acl1.

Другой примечательный факт в рассматриваемой работе (Erjavec et al., 2007) состоит в том, что группа ADH1 оказывается связанной с шаперонами. Дело в том, что при старении белки гликолиза, окисляясь, претерпевают повреждение и метятся за счет карбонилирования. Карбонилированные белки связываются с белковыми агрегатами, содержащими Hsp104p, и в составе агросомы остаются в материнской клетке при цитокинезе. Шапероны не только взаимодействуют с карбонилированными белками, но некоторые из них карбонилируются сами. Это имеет прямое отношение к нашим результатам. Из 9 не связанных с гликолизом белков (группа шаперонов и прочих), способных карбонилироваться (Erjavec et al., 2007), в наших опытах идентифицированы Ssb1, Ssc1p и Act1p. Первые два из них шапероны, а третий — белок цитоскелета, участвующий в динамике агросом. Так как в наших опытах найдены также Hsp104p и ко-шаперон Eno2p, то очевидно, что белки группы ADH1 имеют достаточное шаперонное обеспечение для возможной прионизации.

Предполагаемая связь выявленных прионассоциированных белков с агросомами. Присутствие белков, выполняющих независимые функции в агрегационных комплексах, нуждается в осмыслении. Нам представляется существенным, что в комплексы попадают вместе и белки, вредные для клетки, и белки, которые вовлечены в ответ клетки на повреждения. К первым относятся амилоидизированные белки, включая прионы, а также меченные карбонилированием поврежденные кислородным стрессом белки гликолиза. Они становятся объектом манипулирования других белков, призванных клеткой их обезвредить или уничтожить. К этой второй категории белков относятся прежде всего шапероны, которые борются с неправильной конформацией белков, но могут примыкать и некоторые другие белки,

так или иначе участвующие в защитной функции. Если белки второй группы не справляются с задачей исправления или разрушения поврежденных белков и сами при этом повреждаются или необратимо связываются с поврежденными белками, то они вместе со своими «клиентами» упаковываются в агросомы и выводятся из игры. Это подтверждается данными литературы (Wang et al., 2008), которые показывают, что привлечение полиглютаминовых полипептидов в агросомы снижает их токсичность для клетки.

Следует отметить, что в своих опытах мы нашли в осадках не только множество «белков-целителей» (шаперонов), но также и «белок-разрушитель» — протеазу Pcp4p. Что касается этого белка, то особый интерес представляет его связь с неамилоидным прионом дрожжей [β] (Roberts, Wickner, 2003). Механизм этой связи состоит в следующем. Вакуолярная протеаза А, кодируемая *PEP4*, участвует в протеолитической активации протеазы В. У делеционного мутанта *pep4 Δ* протеаза В начинает активироваться автокаталитически. При росте на неферментируемых источниках углерода, когда ген протеазы В (*PRB1*) дерепрессирован, подобная автокаталитическая активация, раз возникнув, может продолжаться бесконечно. То, что мы нашли Pcp4p среди белков, связанных с амилоидными прионами, может свидетельствовать о том, что амилоидные и неамилоидные прионы могут связываться в клетке с белками схожих наборов.

Кроме того, в агрегированном состоянии (в осадочной фракции) мы нашли поли(А)-связывающий белок Pab1p, который характерен для стрессовых гранул (Buchan et al., 2008). Это позволяет предположить, что в штаммах [*PSI*⁺] индуцируется еще одна форма белковых агрегатов — стрессовые гранулы. Возможно, в конечном итоге и они вовлекаются в агросомы.

Следует оговориться, что при такой классификации отведенная некоторым ферментам гликолиза роль является явно упрощенной. Так, белок Eno2p одновременно и участвует в метаболизме гликолиза, и является кошапероном. Создается впечатление, что один и тот же белок при разных условиях может выполнять в клетке разные роли. Неоднозначной является и функция шаперонов в клетке. Есть справедливое суждение об их амбивалентной роли (Rikhvanov et al., 2007). С одной стороны, они призваны исправлять белки с неправильной конформацией, а с другой — служат прионам, которые в ходе эволюции научились использовать их в целях своего распространения. Агросомы, упаковывая вместе разные белки, кардинально решают проблему белков, представляющих собой «группу риска», и тем самым обеспечивают выживаемость клетки. Классификация, предложенная нами, несмотря на определенную условность, помогает представить, почему функционально разные белки вовлекаются вместе в агрегаты, найденные нами в осадках клеточных грубых лизатов.

Перспективы предложенного нами подхода. Агрегированные белки, идентифицированные нами и другими авторами, оказались общими или сходными. Данные, полученные с применением совершенно разных подходов, говорят о том, что агрегаты возникают в клетке в ответ как на окислительный стресс, так и на конформационные нарушения белков (включая амилоидизацию и прионизацию). Наш методический подход, основанный на изучении белков, осаждаемых из грубых лизатов клеток, подвергнутых разным прионотропным воздействиям («генетическому» очищению), выявляет те

же основные белки, что и полученные при обычном биохимическом очищении агрегатов. В то же время наш подход в ряде случаев имеет то преимущество, что он не направлен на очистку какого-то определенного комплекса и позволяет идентифицировать сразу множество белков, вовлеченных в ответ клетки на амилоидизацию, повреждения, вызванные окислительным стрессом, и прочие конформационные изменения. Кроме того, предложенное нами деление идентифицированных белков по группам взаимодействия, возможно, позволит облегчить поиск новых белков, способных к прионизации. На такую мысль наводит анализ мини-группы и группы ADH1, которые не связаны с известными прионами, но содержат шапероны, способные взаимодействовать с белками данной группы (табл. 2).

Еще одно, более частное замечание. Несколько лет назад мы (Невзглядова et al., 2004) показали, что характер трансмиссии ядер при почковании дрожжевых гетерокаррионов меняется после обработки хлоридом гуанидина штаммов, участвующих в скрещивании, а сама трансмиссия связана с апоптотической гибелью одного из ядер. Из этого мы сделали вывод о связи процессов апоптоза и прионизации в клетках дрожжей. Недавняя работа подтверждает наше предположение (Wang et al., 2008). Авторы показали, что агросомы — последнее прибежище дрожжевых прионов — связаны с полярным тельцем веретена, управляющим расхождением ядер в гетерокаррионе. К тому же последние работы показали, что по крайней мере один белок, участвующий в апоптозе (Mca1p), может прионизироваться (Nemecsek et al., 2009). Тем самым гипотетическая связь между прионами и апоптозом оказывается вполне реальной, а список ролей, выполняемых прионами в клетках дрожжей, явно расширяется. Действительно, уже в процессе работы над этой статьей пришло сообщение о способности к прионизации дрожжевого глобального транскрипционного корепрессора Cys8p (Patel et al., 2009).

Мы благодарим Л. М. Миронову, Ю. О. Чернова, А. П. Галкина и Г. А. Журавлеву за предоставление дрожжевых штаммов, плазмид и антител.

Работа выполнена при финансовой поддержке С.-Петербургского научного центра РАН, Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 07-04-01454 и 09-04-00750), а также программы «Ведущие научные школы» (НШ 1961.2008.4) и президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (2008—2012).

Список литературы

- Невзглядова О. В., Артемов А. В., Миттенберг А. Г., Михайлова Е. В., Кузнецова И. М., Туроверов К. К., Сойдла Т. Р. 2009. Влияние красного пигмента на амилоидизацию белков у дрожжей. Цитология. 52 (1) : 80—93.
- Невзглядова О. В., Кузнецова И. М., Артемов А. В., Михайлова Е. В., Туроверов К. К., Сойдла Т. Р. 2008. Сравнительная оценка содержания амилоида и прионов в клетках дрожжей. Цитология. 50 (1) : 40—48.
- Северин С. Е., Соловьев Г. А. 1989. Практикум по биохимии. М.: Изд-во МГУ. 508 с.
- Bagriantsev S. N., Gracheva E. O., Richmond J. E., Liebman S. W. 2008. Variant-specific $[PSI^+]$ infection is transmitted by Sup35 polymers within $[PSI^+]$ aggregates with heterogeneous protein composition. Mol. Biol. Cell. 19 : 2433—2443.
- Banci L., Bertini I., Boca M., Giroto S., Martinelli M., Valentine J. S., Vieru M. 2008. SOD1 and amyotrophic lateral sclerosis: mutations and oligomerization. PLoS ONE. 3 : e1677.
- Buchan J. R., Muhlrud D., Parker R. 2008. P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Biol. 183 : 441—455.
- Cashikar A. G., Duenwald M., Lindquist S. L. 2005. A chaperone pathway in protein disaggregation: HSP26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by HSP104. J. Biol. Chem. 280 : 23 869—23 875.
- Chernoff Y. O. 2004. Cellular control of prion formation and propagation in yeast. In: Prions and prion diseases: current perspectives. Wymondham: Horizon Bioscience. 257—303.
- Chernoff Y. O. (Ed.). 2007. Protein-based inheritance. Austin, Texas: Landes Bioscience. 137 p.
- Chernoff Y. O. 2008. Identity determinants of infectious proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 105 : 13 191—13 192.
- Chernoff Y. O., Lindquist S. L., Ono B., Inge-Vechtomov S. G., Liebman S. W. 1995. Role of the chaperone protein hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor $[PSI^+]$. Science. 268 : 880—884.
- Chernoff Y. O., Newnam G. P., Kumar J., Allen K., Zink A. D. 1999. Evidence of a protein mutator in yeast: role of the Hsp70-related chaperone Ssb in formation, stability, and toxicity of the $[PSI^+]$ prion. Mol. Cell Biol. 19 : 8103—8112.
- Chernoff Y. O., Uptain S. M., Lindquist S. L. 2002. Analysis of prion factors in yeast. Meth. Enzymol. 351 : 499—537.
- Chernova T. A., Allen K. D., Wesoloski L. M., Shanks J. R., Chernoff Y. O., Wilkinson K. D. 2003. Pleiotropic effects of Ubp6 loss on drug sensitivities and yeast prion are due to depletion of the free ubiquitin pool. J. Biol. Chem. 278 : 52 102—52 115.
- Cox B. S., Byrne L., Tuite M. F. 2007. Prion stability. In: Protein-based inheritance. Austin, Texas: Landes Bioscience. 56—72.
- Derkatch I. L., Liebman S. W. 2007. Prion-prion interactions. In: Protein-based inheritance. Austin, Texas: Landes Bioscience. 39—55.
- Du Z., Park K.-W., Yu H., Fan Q., Li L. 2008. Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Nature Genetics. 40 : 460—465.
- Elam J. S., Taylor A. B., Strange R., Antonyuk S., Doucette P. A., Rodriguez J. A., Hasnain S. S., Hayward L. J., Valentine J. S., Yeates T. O., Hart P. J. 2003. Amyloid-like filaments and water-filled nanotubes formed by SOD1 mutant proteins linked to familial ALS. Nat. Struct. Biol. 10 : 461—467.
- Erjavec N., Larsson L., Grantham J., Nystrom T. 2007. Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p. Genes Develop. 21 : 2410—2421.
- Glabe C. G. 2008. Statistical classification of toxic amyloid oligomers. J. Biol. Chem. 283 : 29 639—29 643.
- Griffith J. S. 1967. Self-replication and scrapie. Nature. 215 : 1943—1044.
- Harrison L. B., Yu Z., Stajich J. E., Dietrich F. S., Harrison P. M. 2007. Evolution of budding yeast prion-determinant sequences across diverse fungi. J. Mol. Biol. 368 : 273—282.
- Herczenik E., Gebbink M. F. B. G. 2008. Molecular and cellular aspects of protein misfolding and disease. FASEB J. 22 : 2115—2133.
- Jones G. W., Masison D. C. 2003. *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 mutations affect $[PSI^+]$ prion propagation and cell growth differently and implicate Hsp40 and tetrapeptide repeat co-chaperones in impairment of $[PSI^+]$. Genetics. 163 : 495—506.
- Jung G., Jones G., Wegryzn R. D., Masison D. C. 2000. A role for cytosolic Hsp70 in yeast $[PSI^+]$ prion propagation and $[PSI^+]$ as a cellular stress. Genetics. 156 : 559—570.
- Kryndushkin D. S., Alexandrov I. M., Ter-Avanesyan M. D., Kushnirov V. V. 2003. Yeast $[PSI^+]$ protein aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. J. Biol. Chem. 278 : 49 636—49 643.
- Kushnirov V. V., Alexandrov I. M., Mitkevich O. V., Shkudina I. S., Ter-Avanesyan M. D. 2006. Purification and analysis of prion and amyloid aggregates. Methods. 39 : 50—55.

- Kushnirov V. V., Vishnevskaya A. B., Alexandrov A. M., Ter-Avanesyan M. D. 2007. Prion and nonprion amyloids: a comparison inspired by the yeast Sup35 protein. In: Protein-based inheritance. Austin, Texas: Landes Bioscience. 73—82.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 : 680—685.
- Lian H. Y., Jiang Y., Zhang H., Jones G. W., Perrett S. 2006. The yeast prion protein Ure2: structure, function and folding. *Biochim. biophys. acta*. 1764 : 535—545.
- Lian H. Y., Zhang H., Zhang Z.-R., Loovers H. M., Jones G. W., Rowling P. J. E., Itzhaki L. S., Zhou J.-M., Perrett S. 2007. Hsp40 interacts directly with the native state of the yeast prion protein Ure2 and inhibits formation of amyloid-like fibrils. *J. Biol. Chem.* 282 : 11 931—11 940.
- Nemecek J., Nakayashiki T., Wickner R. B. 2009. A prion of yeast metacaspase homolog (Mca1p) detected by a genetic screen. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 106 : 1892—1896.
- Nevezglyadova O. V., Artemov A. V., Mittenberg A. G., Mikhailova E. V., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Soidla T. R. 2010. Yeast protein aggregates, containing chaperones and glucose metabolism enzymes. In: Molecular chaperones: roles, structures and mechanisms. Hauppauge, New York: Nova Publishers.
- Nevezglyadova O. V., Artyomov A. V., Mikhailova E. V., Soidla T. R. 2004. The impact of manipulations with cytoplasmically inherited factors on nuclear transmission and degradation in yeast heterokaryons. *Curr. Genet.* 45 : 273—282.
- Patel B. K., Gavin-Smyth J., Liebman S. W. 2009. The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion. *Nature Cell Biol.* 11 : 344—349.
- Prusiner S. B. (Ed.). 2004. Prion biology and diseases. 2nd ed. Cold Spring Harbor; New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. 1050 p.
- Rikhvanov E. G., Romanova N. V., Chernoff Y. O. 2007. Chaperone effects on prion and nonprion aggregates. In: Protein-based inheritance. Austin, Texas: Landes Bioscience. 83—92.
- Roberts B. T., Wickner R. B. 2003. A class of prions that propagate via covalent auto-activation. *Genes Develop.* 17 : 2083—2087.
- Satpute-Krishnan P., Serio T. R. 2005. Prion protein remodeling confers an immediate phenotypic switch. *Nature*. 437 : 262—265.
- Sharma D., Stanley R. F., Masison D. C. 2009. Curing of yeast [URE3] prion by the Hsp40 cochaperone Ydj1p is mediated by Hsp70. *Genetics*. 181 : 129—137.
- Sherman F., Fink G. R., Hicks J. B. 1986. Laboratory course manual for methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor; New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. 186 p.
- Sitia R., Molteni S. N. 2004. Stress, protein (mis)folding, and signaling: the redox connection. *Sci. STKE*. 239 : e27.
- Takahashi A., Hara H., Kurahashi H., Nakamura Y. 2007. A systematic evaluation of the function of the protein-remodeling factor Hsp104 in [PSI⁺] prion propagation in *S. cerevisiae* by comprehensive chromosomal mutations. *Prion*. 1 : 69—77.
- Taneja V., Maddelein M. L., Talarek N., Saupe S. J., Liebman S. W. 2007. A non-Q/N-rich prion domain of a foreign prion, [Het-s], can propagate as a prion in yeast. *Mol. Cell*. 27 : 67—77.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 76 : 4350—4354.
- Tuite M. F., Cox B. S. 2007. The genetic control of the formation and propagation of the [PSI⁺] prion in yeast. *Prion*. 1 : 101—109.
- Uversky V. N. 2008. Amyloidogenesis of natively unfolded proteins. *Curr. Alzheimer Res.* 5 : 260—287.
- Uversky V. N., Oldfield C. J., Dunker A. K. 2008. Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Annu. Rev. Biophys.* 37 : 215—246.
- Wang Y., Meriin A. B., Costello C. E., Sherman M. Y. 2007. Characterization of proteins associated with polyglutamine aggregates: a novel approach towards isolation of aggregates from protein conformation disorders. *Prion*. 1 : 128—135.
- Wang Y., Meriin A. B., Zaarur N., Romanova N. V., Chernoff Y. O., Costello C. E., Sherman M. Y. 2008. Abnormal proteins can form aggresome in yeast: aggresome-targeting signals and components of the machinery. *FASEB J.* 23 : 451—463.
- Watt N. T., Taylor D. R., Gillott A., Thomas D. A., Sumudhu W., Perera S., Hooper N. G. 2005. Reactive oxygen species-mediated β -cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 280 : 35 914—35 921.
- Wickner R. B. 1994. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for an prion analog in *S. cerevisiae*. *Science*. 264 : 566—569.
- Wickner R. B., Edskes H. K., Shewmaker F. 2006. How to find a prion: [URE3], [PSI⁺] and [beta]. *Methods*. 39 : 3—8.
- Wickner R. B., Edskes H. K., Shewmaker F., Nakayashiki T., Engel A., McCann L., Kryndushkin D. 2007. Yeast prions: Evolution of the prion concept. *Prion*. 1 : 94—100.
- Wickner R. B., Shewmaker F., Kryndushkin D., Edskes H. K. 2008. Protein inheritance (prions) based on parallel in-register β -sheet amyloid structures. *BioEssays*. 30 : 955—964.
- Zakharov I. A., Yarovoy B. 1977. Cytoinduction as a new tool in studying the cytoplasmic heredity in yeast. *Mol. Cell. Biochem.* 14 : 15—18.
- Zhou R. Y., Li X. L., Li L. H., Li X. Y., Feng F. J. 2008. Evolution and differentiation of the prion protein gene (PRNP) among species. *J. Heredity*. 99 : 647—652.

Поступила 21 IV 2009

COMPARISON OF CRUDE LYSATE PELLETS OF ISOGENIC STRAINS
OF YEAST WITH DIFFERENT PRION COMPOSITION: IDENTIFICATION OF A SET
OF PRION-ASSOCIATED PROTEINS

O. V. Nevezglyadova,¹ A. V. Artemov,¹ A. G. Mittenberg,¹ E. I. Kostyleva,¹ E. V. Mikhailova,¹
K. V. Solovyov,² I. M. Kuznetsova,¹ K. K. Turoverov,¹ T. R. Soidla¹

¹ Institute of Cytology RAS and ² Institute of Experimental Medicine RAMS, St. Petersburg; e-mail: ovena43@yahoo.com

A new approach: comparative analysis of proteins of the pellets of crude cell lysates of isogenic strains of *Saccharomyces cerevisiae* differing by their prion composition permitted to identify a large group of prion-associated proteins in yeast cells. 2D-electrophoresis followed by MALDI-analysis of a recipient [*psi*⁻] strain and of [PSI⁺] cytoductant led to identification of 35 proteins whose aggregation state responded to a shift of prion(s) content. Approximately half of these proteins belonged to functional groups of chaperones and enzyme involved in glucose metabolism. Notable were also proteins involved in translation, in oxidative stress response and in protein degradation. The data obtained are compared with the results of other groups who used other approaches to detecting proteins involved in prion aggregates.

Key words: amyloid, prion, heterokaryon, cytoinduction, *Saccharomyces cerevisiae*.