

№4 1998 год

ОБЩАЯ БИОЛОГИЯ И ЧАСТНАЯ ГЕНЕТИКА ПРИОНОВ

(Краткий обзор)

Нейродегенеративные заболевания человека: куру, болезнь Кройцфельда-Якоба, синдром Герштона-Штресслера-Шейнкера, семейная смертельная бессонница, а также заболевания животных: скрэпи овец и коз, аналогичные заболевания оленей, норок, мышей, крыс, хомяков, кошек и, наконец, губчатая болезнь мозга крупного рогатого скота (она же коровье бешенство, или сумасшествие коров), распространившиеся в последние годы в Англии, привлекают внимание медиков, биологов, политиков и широких слоев населения, особенно в странах ЕЭС. Все эти болезни вызывает белковый инфекционный агент – прион, за исследование которого С.Прусинер был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине за 1997 г.

Одну из таких болезней у человека, куру, или «смеющуюся смерть», открыл в Новой Гвинее, в племени форе, Даниель Карлтон Гайдушек (Гайдузек) в середине 50-х годов. Симптомы – прогрессирующее нарушение координации движений, сопровождаемое приступами беспричинного смеха и заканчивавшееся летальным исходом. Болезнь признали инфекционной, а причиной ее распространения оказался ритуальный каннибализм в племени форе. Стоит отметить, что болезнь Кройцфельда-Якоба была описана Якобом значительно раньше, в 1921 г. Как выяснили значительно позже (в 1981 г. – Пат Мерц, а в 1982 г. – Стэнли Прусинер), для мышей, инфицированных скрэпи, характерной особенностью головного и спинного мозга больных животных является наличие белковых тяжей, которые представляют собой агрегаты одного из белков нервной системы, функция которого до сих пор окончательно не установлена. Кроме того, спинной и головной мозг больных людей и животных напоминает губку, откуда и пошло общее название этой группы заболеваний – губчатые болезни мозга.

В 1959 г. Уильям Хэдлоу обратил внимание на сходство симптомов куру и скрэпи овец. Особо следует отметить длительный инкубационный период (годы), характерный для обоих заболеваний. Считалось, что переносчиком скрэпи является т.н. «медленный» вирус, который так никогда и не был выделен. В 1963 г. Гайдушек попытался передать куру шимпанзе. Через два года у зараженных обезьян появились первые симптомы заболевания.

В 1971 г. животным была передана болезнь Кройцфельда-Якоба, имеющая сходные симптомы с куру и распространенная в разных районах мира. В 1976 г. Д.К.Гайдушек удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине «за открытие новых механизмов происхождения и распространения инфекционных заболеваний» (совместно с Барухом Бламбергом). Тем не менее до «механизмов» было еще далеко.

Как показала Т.Алпер в 1966 г., «медленные» вирусы, точнее, инфекционное начало оказалось устойчивым к ионизирующим излучениям, ультрафиолетовому свету, формальдегиду. Никаких вирусов, передающих куру и другие нейродегенеративные заболевания, до сих пор обнаружить не удалось. Инфекционное начало оказалось ассоциировано с белковыми тяжями, обнаруживаемыми в головном и спинном мозге больных. Белок, составляющий эти тяжи (обозначенный как PrPSc от *scrapie*), более устойчив к температурным воздействиям и расщеплению протеазами, нежели его нормальная форма. При этом он имеет ту же первичную структуру, что и нормальный, растворимый белок (обозначение – PrPC) здоровых людей.

Сначала Гриффит выдвинул, а затем в 1982 г. С.Прусинер развил гипотезу, известную теперь как гипотеза «только белок» (protein only). Родилось слово «прион» (prion), представляющее собой перестановку в слове «pro-in» – белковый инфекционный агент.

Наряду с инфекционными, а также т.н. спорадическими формами рассматриваемых заболеваний, известны их «семейные» формы или наследственная предрасположенность к этим болезням. Последние оказались связанными с изменениями в гене PRNP (открытом в 1985 г. Ч.Вайссманном и С.Прусинером, а также Л.Худом), который оказался консервативным у млекопитающих (и найден даже у кур, хотя о соответствующих нейродегенеративных заболеваниях у них ничего не известно). Мутации в этом гене приводили к большей восприимчивости к инфекции, т.е. к сокращению инкубационного периода после заражения или заболеванию без всякой инфекции. Эти мутации могли приводить к обычным аминокислотным заменам в различных положениях полипептидной цепи. Другой тип мутаций связан с характерной особенностью белка PrP: в N-терминальной его части пять раз повторен октапептид Pro(GlnHis)GlyGlyGly(Gly)- TrpGlyGln.

Эта часть белка особенно консервативна. Некоторые семейные формы нейродегенеративных заболеваний ассоциируются с увеличением числа этих повторов за счет дополнительных 2–9 октапептидов. Кроме того, известны примеры нормального популяционного полиморфизма по этому гену и, соответственно, белку человека. Так, например, в положении 129 может находиться как Val, так и Met.

Преобладание *beta*-слоев в белке PrPSc (43% *beta*-слоев, 30% *alpha*-спиралей) является его характерным отличием от белка PrPC (3% *beta*-слоев, 42% *alpha*-спиралей). Похоже, что эти N-терминальные повторы существенны для «прионизации» нормального PrPC, хотя их полная делеция не препятствует прионизации молекулы.

Сенсация «белковой наследственности» в чистом виде просуществовала недолго. Тем не менее она внесла некоторые уточнения в «центральную догму» молекулярной биологии. Структуру белка PrP, как нормального, так и инфекционного, кодирует ген PRNP. В случае спорадических форм болезни этот белок спонтанно (?) изменяет свою конформацию. Появляется белок, который далее изменяет укладку всех вновь синтезируемых молекул: PrPC > PrPSc. Известны т.н. линии, или штаммы приона, т.е. его формы, различающиеся инфекционностью и инкубационным периодом. Эти различия между линиями приона объясняют существованием разных конформационных форм белка PrPSc. При этом считается, что его первичная структура остается неизменной.

Необходимость гена PRNP для восприимчивости к прионной инфекции и развития болезни показали Ч.Вайсманн и А.Агуцци (1993). Мыши, лишённые гена PRNP (они вполне жизнеспособны), устойчивы к прионной инфекции. Попутно этот эксперимент поясняет, что смертелен не дефект гена, кодирующего прион, а «отравление мозгов» белком-прионом. Повышенная экспрессия PRNP у мышей приводит к появлению приона и развитию заболевания, что согласуется с предположением об увеличении вероятности спонтанной перестройки молекулы PrP^C > PrP^{Sc} в пересчете на клетку как следствие увеличения концентрации нормального белка.

Важный вопрос о межвидовом переносе прионов также исследован в последнее время. Мыши со своим геном PRNP проходят более длинный инкубационный период при заражении прионом хомячка, нежели трансгенные мыши, у которых экспрессируется не свой ген, а перенесенный из хомячка. Этот эксперимент актуален в связи с вопросом о возможности заражения человека от крупного рогатого скота. Вспомним эпизоотию коровьего бешенства (mad cow disease, или BSE-bovine spongiform encephalopathy) в Великобритании. Попытки заражения коровьим прионом трансгенных мышей, экспрессирующих одновременно собственный ген PRNP и человеческих PRNP, поначалу дали отрицательный результат, однако в дальнейшем мыши все же заболели. Более того, 21 случай нетипичной болезни Кройцфельда-Якоба, описанный в Англии, оказался результатом заражения людей прионом крупного рогатого скота. Нетипичность этого заболевания заключается в более молодом возрасте пациентов – около 40 лет, – в то время как обычно заболевают люди около 60. Белок-прион этих больных по своему взаимодействию с протеиназой-K очень похож на прион коров и отличается от типичных прионов, встречающихся при болезни Кройцфельда-Якоба. Кроме того, все заболевшие несли метионин в положении 129 белка PrP. Этот факт интересен также в связи с проблемой нейтральности белкового полиморфизма.

Очередной прорыв в области «прионологии» сулит привлечение нового объекта – дрожжей-сахаромицетов. Как саркастически заметил Ч.Вайсманн, «феномены, обнаруженные у высших эукариот, приобретают дополнительную респектабельность, если их находят также и у дрожжей» (1994). Так что же у дрожжей? И какое отношение они имеют к заболеваниям нервной системы?

В 1965 г. Б.Кокс описал у дрожжей цитоплазматический (т.е. неядерный и немитохондриальный) наследственный фактор [PSI], который, как позже выяснилось, является (слабым) доминантным омнипотентным нонсенс-супрессором, т.е. в его присутствии читаются все три стоп-кодона.

В 1971 г. Ф.Лакрут описал еще один фактор с такой же схемой наследования, [URE3], при наличии которого клетки дрожжей приобретают способность использовать уреидосукцинат в качестве источника азота.

Можно избавиться от этих факторов, если выращивать клетки на среде с 5мМ гуанидин-гидрохлоридом, однако такое изгнание, по крайней мере для [PSI]-фактора, обратимо, т.е. «вылеченные» клетки могут снова спонтанно приобретать фактор [PSI]. Это указывает на сохранение в клетке (в ее геноме?) структуры, необходимой для образования [PSI] de novo. Физическая природа описанных цитогенов оставалась загадкой до последнего времени.

Сначала удалось более или менее разобраться с [PSI]-фактором. В 1993 г. было показано, что амплификация ядерного гена SUP35 на плазмиде средней копийности эффективно индуцирует в клетке [PSI⁻] появление [PSI]-фактора. Вскоре аналогичные данные были получены для системы «фактор [URE3] – ядерный ген URE2». Это сделал Рид Уикнер, предложивший одновременно гипотезу, согласно которой [PSI] и [URE3] представляют собой дрожжевые прионы.

Остановимся на системе «[PSI] – SUP35», как на более детально разработанной. Мутации sup45 и sup35, описанные у дрожжей-сахаромицетов (первоначально как sup1 и sup2, соответственно) еще в 1964 г., хорошо известны как рецессивные омнипотентные нонсенс-супрессоры.

В последние годы идентифицированы продукты генов SUP35 и SUP45. Эти гены кодируют белки, входящие в комплекс терминации трансляции. Продукт SUP45 – фактор терминации eRF-1, узнающий все три стоп-кодона. Продукт гена SUP35 – фактор терминации eRF-3, который делает процесс терминации ГТФ-зависимым и высокоэффективным. Эти белки работают в едином комплексе.

Отметим две интересные особенности белка Sup35p:

1) 2/3 его с С-терминального конца проявляют значительную гомологию трансляционному фактору элонгации эукариот EF-1 α (бактериальный гомолог – EF-Tu) и необходимы для обеспечения жизнеспособности клетки;

2) в оставшейся N-терминальной части можно видеть характерные аминокислотные повторы, напоминающие повторы в белке PrP и, по-видимому, также склонные к образованию *beta*-слоев. Именно в этом участке локализована давно описанная Б.Коксом мутация PNM2 (Psi по more), препятствовавшая сохранению [PSI] в клетке. Для жизнеспособности клетки наличие или отсутствие этой части белка безразлично.

В 1995 г. были получены данные о том, что [PSI] можно индуцировать не только амплификацией SUP35, но и его сверхэкспрессией. Более того, показано, что [PSI]-фактор – это именно белок-продукт SUP35. Введение сайт-направленным мутагенезом сдвига считывания в 20-й кодон (генерирующий сразу за ним нонсенс-кодон) блокирует индукцию [PSI], несмотря на то, что в клетке сохраняется сверхэкспрессия гена, регистрируемая по количеству мРНК SUP35.

У одного и того же штамма дрожжей можно индуцировать разные [PSI]-факторы, отличающиеся по стабильности и по способности к супрессии разных нонсенс-аллелей.

На основании делеционного анализа SUP35 удалось локализовать участок гена и, соответственно, белка, отвечающего за индукцию и сохранение [PSI]-фактора в клетке. Для этого была использована серия делеций, полученных М.Д.Тер-Аванесяном и В.В.Кушниковым. Индукцию [PSI] блокирует сравнительно небольшая делеция *delta*Bst: теряются около 50 аминокислотных остатков (нуклеотиды 58-202), захватывающая часть упоминавшихся уже аминокислотных повторов (нуклеотиды 165-288). Этот участок безразличен для жизнеспособности клетки, но для прионизации он необходим.

Таким образом, [PSI] – это прионизированный фактор терминации eRF-3, который частично или полностью утрачивает функцию терминации трансляции (отсюда – omnipotentная нонсенс-супрессия).

Для превращения eRF-3 в [PSI] необходима оптимальная экспрессия гена HSP104, кодирующего один из шаперонов дрожжей. Как показали Ю.О.Чернов и др., инактивация, а также сверхэкспрессия этого гена приводят к потере [PSI]. Физическое взаимодействие дрожжевого шаперона HSP104 с eRF-3 дрожжей и белком млекопитающих PrP показано in vitro. Более того, показано, что в штаммах [PSI⁺] eRF-3 образует олигомерные скопления, которые никогда не образуются в штаммах [PSI⁻]. Наконец, С.Линдквист и др. удалось показать олигомеризацию прионного белка дрожжей in vitro. Эту серию работ завершили исследования М.Д.Тер-Аванесяна и др., продемонстрировавшие эффективное «размножение» дрожжевого приона в бесклеточной системе.

По-видимому, явление прионизации и «размножение» белка-приона, открытое как частное явление у млекопитающих, широко распространены в природе. Так, продукт одного из генов вегетативной несовместимости (Het-s) у гриба *Podospora anserina* также имеет прионную природу. Многие вопросы остаются неясными в этой быстро развивающейся области биологии: как происходит переход нормального белка в прионную форму, как первичный прион превращает вновь синтезируемые молекулы в собственное подобие и т.д.

Во всяком случае, уже сейчас можно предполагать, что в клетке наряду с классическими матрицами последовательности ДНК и РНК, кодирующими чередование аминокислотных остатков в белках, могут существовать и конформационные, или пространственные матрицы, определяющие пространственную укладку полипептидов и тем самым ответственные за явления эпигенетического наследования и эпигенетической изменчивости.

Основные обзоры:

1. Инге-Вечтомов С.Г. Цитогены и прионы: цитоплазматическая наследственность без ДНК? // Соросовский образовательный журнал. 1996. N5. С.11-18.
2. Кушниров В.В., Тер-Аванесян М.Д., Смирнов В.Н. Структурное и функциональное сходство белков дрожжей Sup35p и Ure2p и прионов млекопитающих // Молек. биол. 1995. 29: 427-430.
3. Aguzzi A., Weissmann C. Prion research: the next frontiers // Nature. 1997. 389: 795-798.
4. Almond J., Pattison J. Human BSE // Nature. 1997. 389: 437-438.
5. Anderson R.M., Donnelly C.A., Ferguson N.M., Woolhouse M.E.J., Watt, Udy H.J., MaWhinney S., Dunstan S.P., Southwood T.R.E., Wilesmith J.W., Ryan J.B.M., Hoimville L.J., Hillerton J.E., Austin A.R., Wells G.A.H. Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle // Nature. 1996. 382: 779-788.
6. Cox B.S. Prion-like factors in yeast // Current Biol. 1994. 4: 744-748.
7. Horwich A.L., Weissman J.C. Deadly conformations — protein misfolding in prion disease // Cell. 1997. 89: 499-510.
8. Lindquist S. Mad cows meet Psychotic yeast: The expansion of the prion hypothesis // Cell. 1997. 89: 495-498.
9. Prusiner S.B. Inherited prion diseases // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. 91: 4611-4614.
10. Prusiner S.B. Molecular biology and pathogenesis of prion disease // TIBS. 1996. December: 482-487.
11. Weissmann C. The Prion Connection: Now in Yeast? // Science. 1994. 264: 528-530.
12. Wickner R.B. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae* // Science. 1994. 264: 566-569.
13. Wickner R.B., Masison D.C., Edskes H.K. [PSI] and [URE3] as yeast prions // Yeast. 1995. 11: 1671-1685.

Образование и «размножение» дрожжевого приона in vitro:

1. Glover J.R., Kowal A.S., Schirmer E.C., Patino M.M., Liu J.J., Lindquist S. Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺], a heritable prion-like factor of *S.cerevisiae* // Cell. 1997. 89: 811-819.
2. King C.-Y., Tittman P., Gross H., Geber R., Aebi M., Wuthrich K. Prion-inducing domain 2-114 of yeast Sup35 protein transforms in vitro into amyloid-like filaments // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. 94: 6618-6622.
3. Paushkin S.V., Kushnirov V.V., Smirnov V.N., Ter-Avanesyan M.D. In vitro propagation of the prion-like state of yeast Sup35 protein // Science. 1997. 277: 381383.
4. Schirmer E.C., Lindquist S. Interactions of the chaperone Hsp104 with yeast Sup35 and mammalian PrP // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. 94: 13932-136-937.

С.Г.Инге-Вечтомов,
кафедра генетики и селекции
С.-Петербургского государственного университета