

БЕЛКОВАЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ: КОНФОРМАЦИОННЫЕ МАТРИЦЫ И ЭПИГЕНЕТИКА

С.Г. Инге-Вечтомов, А.С. Борхсениус, С.П. Задорский

Кафедра генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета
e-mail: inge@SI2444.spb.edu; inge@sgi.usr.pu.ru

Введение

Ряд нейродегенеративных заболеваний (губчатых энцефалопатий) человека и других млекопитающих связаны с белковой инфекцией. К числу таких болезней относятся: куру, семейная бессонница, болезнь Гершмана-Штресслера-Шайнкера, болезнь Кройцфельда-Якоба у людей, а также бычья губчатая энцефалопатия ("коровье бешенство"), скрэпи у овец, коз, оленей, мышей, хомяков и других животных (1).

Концепция прионов – инфекционных белков, переносящих эти заболевания, поначалу казалась достаточно безумной для того, чтобы в конце-концов за ее обоснование С. Прусинеру вручили в 1997 г. Нобелевскую премию (2). Такая концепция косвенно подразумевала некоторый механизм воспроизведения белков. Это противоречило Центральной догме молекулярной биологии (3), в основу которой положены матричные процессы: репликация, транскрипция, трансляция, ответственные за воспроизведение и реализацию генетической информации.

Конформационные матрицы

В действительности концепция прионов лишь дополнила Центральную догму (см. рис. 1) (4), поскольку вскоре выяснилось, что нет приона без структурного гена. В то же время на уровне белка действительно работает механизм воспроизведения, но не аминокислотной последовательности, а конформации. Единожды попав в клетку (тем или иным способом), белок-прион перестраивает вновь синтезированные гомологичные полипептидные цепи своего клеточного предшественника "по своему образу и подобию". Таким образом, это тоже матричный процесс.

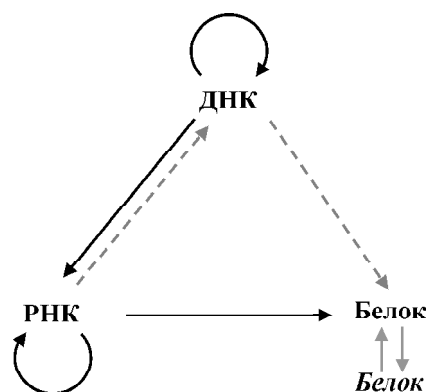


Рис. 1. Центральная догма молекулярной биологии Ф. Крика (По: (3) с дополнением (4)).

В отличие от Центральной догмы, в которой рассматриваются линейные матрицы последовательности, или матрицы первого рода, здесь мы имеем дело с матрицами пространственными, или конформационными, – матрицами второго рода.

Матрицы первого рода лежат в основе воспроизведения, а также реализации генетической информации. Матрицы второго рода преимущественно работают на уровне реализации генетической информации в традиционном понимании этого термина, точнее – после трансляции. Подробнее о матричном принципе в биологии изложено в работе (см. (5)). Тем не менее матричные процессы второго рода дают примеры механизмов наследования в митозе и мейозе, примеры изменчивости, напоминающей мутационный процесс. Эти события и механизмы следует классифицировать как эпигенетические.

Под эпигенетикой мы будем понимать различные механизмы наследственности и изменчивости, лишь косвенно связанные с кодированием наследственной информации в виде нуклеотидных последовательностей ДНК (РНК). Вслед за Р.Н. Чураевым их можно назвать неканоническими механизмами наследственности

ти и изменчивости (см. (6)). Разнообразие этих механизмов, видимо, велико: от модификации (метиляции) оснований в ДНК до пост-трансляционных перестроек белков. На последнем механизме мы остановимся более подробно, отталкиваясь от явления прионизации и последующего "размножения" прионов.

Прионы дрожжей как модельная эпигенетическая система

Механизмы, лежащие в основе прионизации белковой молекулы, по-видимому, широко распространены в природе. Феномен прионов – лишь крайнее их проявление, которое удобно исследовать. Это фенотип, без которого генетический анализ невозможен. Тем не менее даже этот, по-видимому, частный феномен характерен не только для млекопитающих, у которых он обнаружен впервые, но и для низших эукариот – грибов (табл.). Наиболее подробно он исследован у дрожжей (7, 8). В последнем случае прионы представляют собой цитоплазматические наследственные детерминанты, что создает определенные преимущества для их исследования. Другим удобным свойством дрожжевых прионов является возможность их элиминации из клетки при выращивании дрожжей на 5 мМ хлориде гуанидина (ГГХ) (9).

Таблица

Прионы грибов

Прион (прионоподобный детерминант)	Ген	Виды
[PSI ⁺]	SUP35	<i>S. cerevisiae</i>
[URE3]	URE2	<i>S. cerevisiae</i>
[PIN ⁺]	RNQ1	<i>S. cerevisiae</i>
[Het-s]	Het-s	<i>P. anserina</i>
[ISP ⁺]	?	<i>S. cerevisiae</i>
[ASP ⁺]	??	<i>S. cerevisiae</i>

Подобно прионам млекопитающих прионы грибов представляют собой конформационные варианты обычных клеточных белков. Последние могут спонтанно претерпевать конформационные перестройки (обогащение β-слоями), после чего они приобретают ряд но-

вых свойств, прежде всего способность к агрегации за счет взаимодействия β-слоев и образование так называемых амилоидов (своего рода процесс биологической кристаллизации с переходом в нерастворимую форму), становятся кислото- и протеазоустойчивыми (10, 11). При этом частично или полностью теряется собственная функциональная активность прионизирующихся белков. Клетка или организм становятся дефектными по функции белка-предшественника приона. Такие преобразования повторяют фенотип мутантов, которые могут возникать по соответствующим структурным генам. Делеция такого структурного гена или его части приводит к невозможности "воспроизведения" приона. Все это можно проиллюстрировать на примере наиболее разработанной модели прионизации: структурный ген SUP35 / прион [PSI] у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Цитоплазматический наследственный фактор [PSI⁺], проявляющийся как omnipotentный нонсенс-супрессор (см. (8)) (а также супрессор некоторых сдвигов считывания (12)), является прионной изоформой белка-фактора терминации трансляции eRF3 – продукта гена SUP35 (рис. 2). Известны структурные особенности eRF3, ответственные за процесс прионизации, по крайней мере, некоторые цис- и трансдействующие факторы, необходимые для этого процесса.

За прионизацию отвечают M- и N-домены этого белка (рис. 3), обогащенные аспарагином, глутамином и другими аминокислотами, способными образовывать β-слои, взаимодействующие в дальнейшем при формировании агрегатов (далее оба эти домена будут обозначены просто как объединенный N-домен). C-домены при этом не взаимодействуют и направлены в сторону от амилоидного тяжа, который представляет собой переплетенные нанотрубки (13). C-домен отвечает за функцию терминации трансляции (14). Его делеция летальна. Домены N и M можно удалять. Это не приводит к летальному эффекту, но препятствует прионизации (15). Генетические конструкции, объединяющие NM-домены с другими белками, делают их способными к прионизации. Отсюда и название "прионизирующий" пептид.

Прионизацию следует рассматривать как многостадийный процесс (рис. 4): включаю-

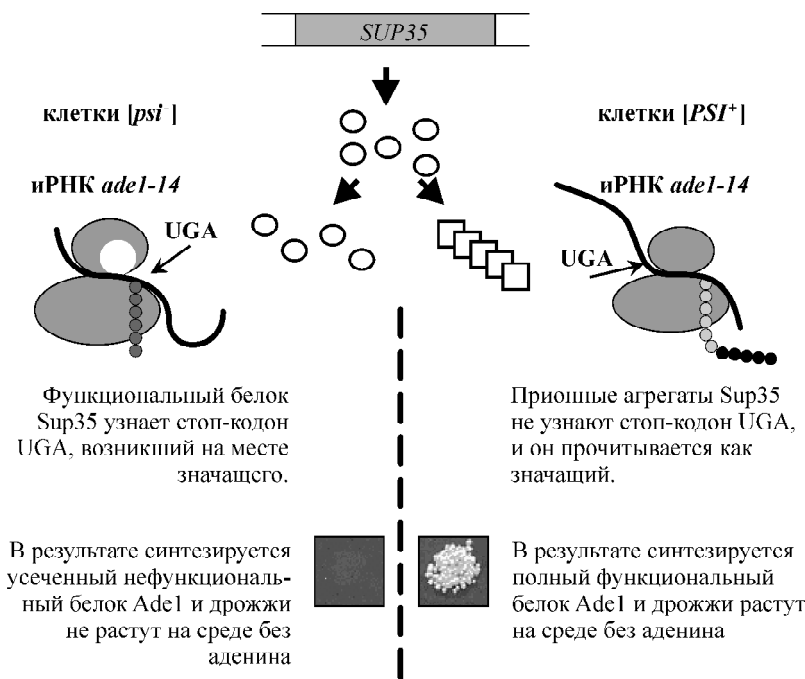


Рис. 2. Нонсенс-супрессия – фенотипическое проявление прионизации фактора терминации трансляции eRF3, кодируемого геном SUP35 у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

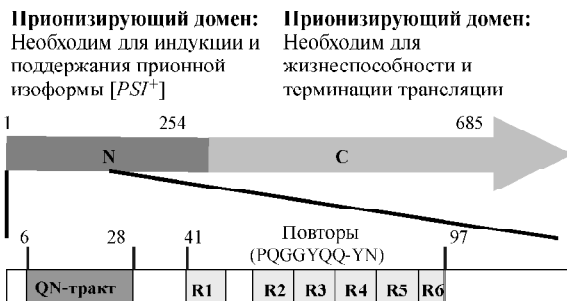


Рис. 3. Структура гена SUP35 и белка eRF3 у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

ший стадию инициации, о которой мы имеем смутное представление, и стадии роста и размножения прионных агрегатов. Последний этап обусловлен отщеплением от крупных агрегатов олигомеров меньшего размера – так называемых семян. Последние попадают в дочерние клетки и служат затравкой для роста новых агрегатов. Так происходит размножение приона. В этом процессе ведущая роль принадлежит шаперонам, прежде всего Hsp104, "отгрызающему" семена, а также одному из белков Ssa – Hsp 70 (16). При желании можно

увидеть агрегаты дрожжевого приона [PSI], если слить прионизирующий пептид с зеленым флюоресцирующим белком GFP (рис. 5).

Проанализировав аминокислотную структуру известных прионизирующих пептидов, Дж. Вейсман и М. Мичелич составили список белков дрожжей, обогащенных повторами аспарагина и глутамина. Такие белки являются потенциальными прионами. У дрожжей в этот список попало 107 белков, что составляет около 2 % всех их белков, а у дрозофилы 472 белка, что составляет около 3,5 % всех ее белков (17). Для некоторых белков из "списка Вейсмана" уже

показано, что их прионизирующий пептид, присоединенный к eRF3 вместо собственного N-домена, обеспечивает его прионизацию. Число потенциальных прионов, видимо, не исчерпывается "списком Вейсмана". К прионизации могут быть способны и белки иного аминокислотного состава.

Прионные сети

Прионизация отдельного белка – это не изолированное событие, а, скорее всего, отражение существования некоторых прионных сетей, пронизывающих клетку. На это указывает зависимость появления одних прионов от наличия других.

Так, прион [PSI] не может появиться в клетке, если в ней нет другого приона – [PIN] – Prion inducibility (см. табл.). [PIN] – продукт структурного гена *RNQ1* (18, 19), функция которого пока не известна. Его идентифицировали при тотальном секвенировании генома дрожжей. Функции [PIN] в образовании [PSI] могут выполнять и некоторые другие прионы дрожжей (18). Таким образом, прионные сети,

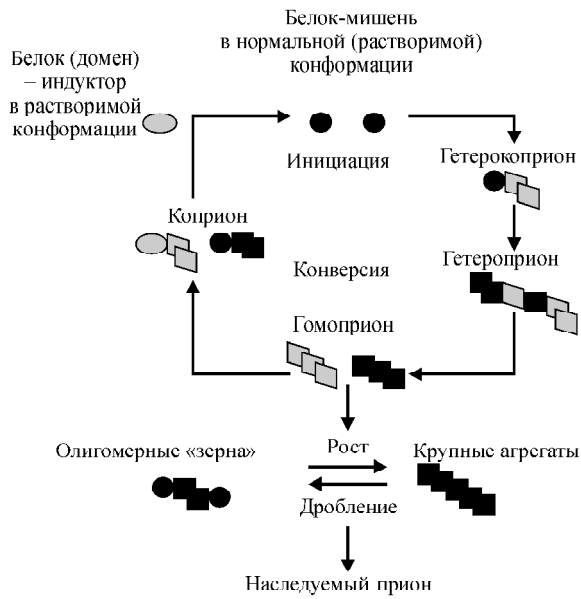


Рис. 4. Последовательные стадии прионизации клеточного белка-предшественника приона.

или каскад прионизации, – это отражение реальности системы протеома в клетке, когда изменения одного белка сказываются на структуре и функциях других белков. Следовательно, прионизация – это взаимодействие не только гомологичных, но и гетерологичных полипептидов. Точно так же можно показать, что существует не только взаимосвязь прионизация-прионизация, как в случае прионных сетей, но и мутация-прионизация. Так, на фоне некоторых мутаций *sup35* возникают (или селектируются) прионоподобные факторы ([ISP], [ASP]) – антисупрессоры. Это нехромосомные детерминанты, изгоняемые ГГХ и по ряду свойств очень похожие на прионы (20, 21). Правда, их структурные гены еще не идентифицированы.

Обсуждая проблему прионизации белков, следует помнить, что в настоящее время мы "ищем под фонарем, а не там, где потеряли". В нашем распоряжении есть супрессорный фенотип, сопровождающий превращение белка Sup35p в прион [PSI]. За этим превращением легко следить. В то же время известен ряд клеточных процессов и структур, связанных с перестройкой белков или их комплексов. Среди них динамика цитоскелета – сборка и разборка микротрубочек, сборка и разборка ядерной оболочки в каждом митозе высших эукариот (дрожжам в этом отношении меньше повезло, у них митоз и мейоз происходят по закрытому типу и ядерная оболочка никогда не исчезает). Последнее время цитологи все чаще обращаются к рассмотрению клеточного ядра как своеобразного ансамбля самособирающихся и разбирающихся микрокомпарментов, создающих своего рода хромосомные территории и эпигенетически регулирующих и репликацию, и транскрипцию (см., например, (22)). К числу таких процессов относится и образование спайдерина – нитей паутины паукообразных (23). Это все процессы своеобразной биологической кристаллизации, очень напоминающие прионизацию.

То есть, говоря "прионизация", следует помнить, что это, по-видимому, лишь частное проявление механизмов более широкого биологического значения. К сожалению, чаще всего эти превращения не сопровождаются четкими фенотипическими изменениями, за которыми можно было бы следить в эксперименте.

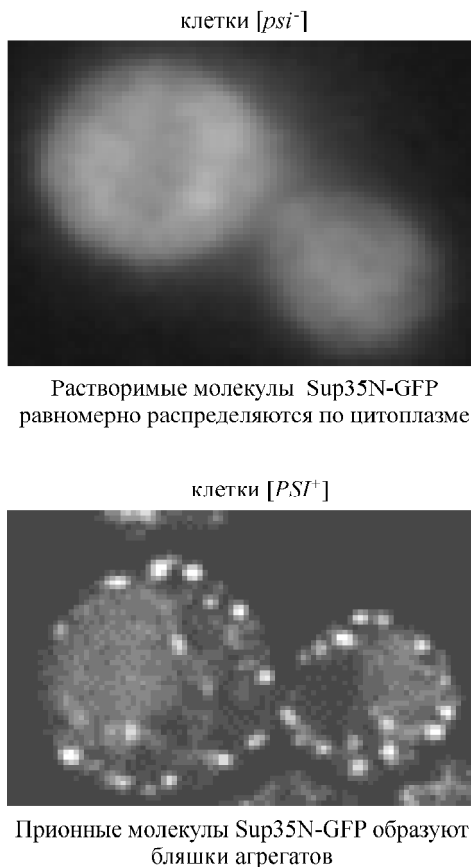


Рис. 5. Визуализация прионных агрегатов в клетках дрожжей.

К протеомному конструированию

Ситуация, правда, не безнадежна. На первых порах можно использовать прионы дрожжей как модельную эпигенетическую систему, в которой можно конструировать искусственные белковые структуры, отталкиваясь от того, что мы уже знаем о прионизации и ее механизмах. Поначалу следует опираться на тот же супрессорный фенотип и далее конструировать структуры с предсказуемыми фенотипами. Мы начали конструировать искусственные белковые структуры, используя сборку приона *[PSI]* как поточную линию, пытаясь предсказать результаты нашего вмешательства в этот процесс.

Напомним, что при образовании амилоидных фибрилл в ходе прионизации фактора eRF3 взаимодействуют только со своими N-доменами, в то время как C-домены в этом взаимодействии не участвуют (см. рис. 3). Мы решили заменить C-домен на белок, имеющий четвертичную структуру (Ade2p), то есть состоящий из идентичных субъединиц, и тем самым заставить взаимодействовать и C-домены. Сконструировали гибридную структуру *SUP35NM-ADE2*. Если ввести такую конструкцию на плазмиде в нормальную клетку с обычными *SUP35* и *ADE2* в геноме, то можно ожидать образования тройственного комплекса. Здесь будут взаимодействовать и N- и C-домены (рис. 6).

Должно ли это облегчить образование приона? Согласно нашим предсказаниям, должно и, судя по данным эксперимента, так и происходит. Это выражается в более эффективной прионизации фактора терминации даже при умеренной экспрессии гибридной конструкции – при введении ее в клетку на центромерной плазмиде. При этом наблюдается высокоэффективная нонсенс-супрессия, чего не бывает при введении *SUP35* на центромерной плазмиде. Правда, согласно рис. 6, следует ожидать образования не стандартного приона, а "урода". Этим, по-видимому, объясняется то, что наследование такого необычного гетероприона нарушается (24).

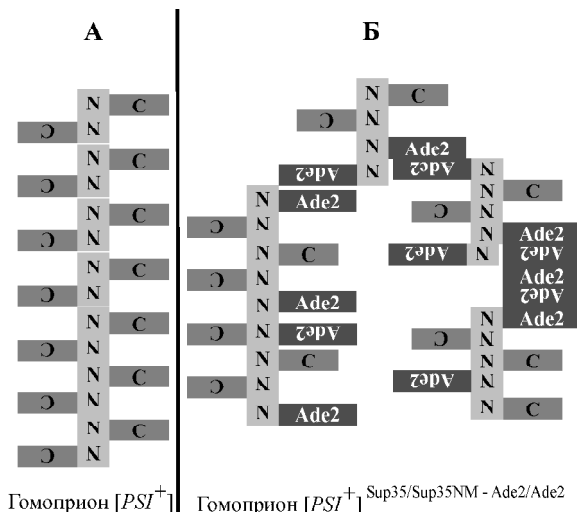


Рис. 6. Схематическое изображение взаимодействия доменов при образовании амилоидных фибрилл обычного дрожжевого гомоприона *[PSI]*-продукта гена *SUP35* (А) и тройного комплекса – гетероприона, содержащего белки *Sup35p*, *Sup35N-Ade2p* и *Ade2p*, в котором могут взаимодействовать как N-, так и C-домены белков.

Заключение

Почему это все может быть интересно в общебиологическом плане? Во-первых, потому что упомянутые матрицы первого и второго рода наверняка взаимодействуют между собой. Например, прионизация фактора терминации трансляции eRF3, кодируемого геном *SUP35*, – это модель такого (хотя и косвенного) взаимодействия. И последствия этого взаимодействия известны – нонсенс-супрессия и супрессия некоторых мутаций типа "сдвиг рамки считывания". То есть увеличивается частота ошибок трансляции или, правильнее, – уровень неоднозначности этого матричного процесса. А если прионизации подвергнется белок, участвующий в репликации или репарации, или белок хроматина? Так, например, в "списке Вейсмана" находим фактор SWI/SNF-белок, участвующий в преобразованиях хроматина. Его прионизирующий пептид заменяет прионизирующий пептид eRF3, т.е., похоже, этот фактор действительно способен прионизоваться (правда, последствия пока не известны). Поскольку взаимодействия матричных процессов первого и второго

рода – это реальность, а не фантазия, то следовательно, модификационная и наследственная изменчивость могут быть связаны неслучайно, однако не в ламаркистском понятии целесообразности, а в плане взаимообусловленной частоты событий. Во-вторых, это направление исследований в действительности относится к проблеме белок-белковых взаимодействий. Известно, что такие взаимодействия обеспечиваются некоторыми консервативными аминокислотными последовательностями. Но если они консервативны, то почему белок-белковые взаимодействия специфичны? Известно, что в нефизиологических условиях многие белки образуют амилоиды, например, тот же гемоглобин. Эволюция выработала механизмы, контролируемые, ограничивающие и канализирующие подобные события. Так, например, существует специальный шаперон для глобина (25). Кроме того, естественный отбор был направлен на канализацию в сторону специфического взаимодействия даже универсальных, предназначенных для белок-белковых взаимодействий аминокислотных последовательностей. Так, универсальный мотив SH3 для взаимодействия белков сигнальной трансдукции строго канализирован соседними аминокислотами для специфических взаимодействий в белках одного вида организмов. А если ввести ортологичный белок другого вида, эта специфичность утрачивается (26). Это путь к пониманию эволюции протеома, балансирующего на грани универсальности и специфичности. В-третьих, многие события, нарушающие баланс в протеоме, будь то мутации или прионизации в широком смысле этого слова или создание трансгенных организмов, требуют какого-то периода балансировки системы, ее стабилизации. Мы не случайно приводили примеры взаимодействий: прионизация–прионизация и мутация–прионизация. Если первичное событие – перестройка (модификационная) ядерной оболочки в каком-то ее компартменте, то следствием этого события может быть нарушение взаимодействия оболочки с хромосомами, что потребует компенсаторных генетических событий, например, хромосомных перестроек. Тем самым мы ло-

гически подходим к ситуации, о которой говорит В.Н. Стегний(27, 28), и можем по-новому взглянуть на роль модификаций в эволюционном процессе.

Авторы благодарят Юлию Викторовну Сопову за критические замечания при прочтении рукописи.

Работа выполнена при поддержке грантов CRDF/Минобразования РФ (ST-012; ST-012-02/Y1-B-12-06; ST-012-02/Y1-B-12-02) и гранта РФФИ (03-04-49335).

Литература

1. Prusiner S.B. Inherited prion diseases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 4611–4614.
2. Prusiner S.B. Prions // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 13363–13383.
3. Crick H.F.C. On protein synthesis // Symp. Soc. Exptl Biol. 1958. V. 12. P. 138–163.
4. Инге-Вечтомов С.Г. Прионы дрожжей и Центральная догма молекулярной биологии // Вестник РАН. 2000. Т. 70, № 3. С. 195–202.
5. Инге-Вечтомов С.Г. Матричный принцип в биологии // Экологическая генетика. 2003. Т. VI. С. 4–13.
6. Чураев Р.Н. Об одной неканонической теории наследственности // Современные концепции эволюционной генетики / Ред. В.К. Шумный, А.Л. Маркель. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2000. С. 22–32.
7. Wickner R.B., Masison D.C., Edskes H.K. [PSI] and [URE3] as yeast prions // Yeast. 1995. V. 11. P. 1671–1685.
8. Инге-Вечтомов С.Г., Миронова Л.Н., Аленин В.В., Борхсениус А.С. Прионы, синтез белка и клеточный цикл // Вестник СПб университета. Сер. 3. Биология. 1999. № 24. Вып. 4. С. 53–71.
9. Tuite M.F., Mundy C.R., Cox B.S. Agents that cause a high frequency of genetic change from [psi+] to [psi-] in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 1981. V. 98. P. 691–711.
10. King C.-Y., Tittman P., Gross H. *et al.* Prion-inducing domain 2-114 of yeast Sup35 protein transforms *in vitro* into amyloid-like filaments // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 6618–6622.
11. 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. V. 277. P. 381–383.
12. Куликов В.Н., Тиходеев О.Н., Форафонов Ф.С. и др. Супрессия мутации "сдвиг

- рамки считывания" в результате частичной инактивации факторов терминации трансляции у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. 2001. Т. 37, № 5. С. 602–609.
13. Perutz M.F., Finch J.T., Berriman J., Lesk A. Amyloid fibers are water-filled nanotubes // Proc. Natl Acad. Sci USA. 2002. V. 99. P. 5591–5595.
 14. Zhouravleva G., Frolova L., Le Goff X. *et al.* Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors eRF1 and eRF3 // EMBO J. 1995. V. 14. P. 4065–4072.
 15. Ter-Avanesyan M.D., Kushnirov V.V., Dagkesamanskaya A.R. *et al.* Deletion analysis of the SUP35 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two nonoverlapping functional regions in the encoded protein // Mol. Microbiol. 1993. V. 7. P. 683–692.
 16. Zhouravleva G.A., Alenin V.V., Inge-Vechtomo S.G., Chernoff Y.O. To stick or not to stick: prion domains from yeast to mammals // Recent Res. Devel. Mol. Cell. Biol. 2002. V. 3. P. 185–218.
 17. Michelitsch M.D., Weissman J.S. A census of glutamine/asparagines-rich regions: Implications for their conserved function and the prediction of novel prions // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 11910–11915.
 18. Derkatch I.L., Braadley M.E., Hong J.Y., Liebman S.W. Prions affect the appearance of other prions: the story of [PIN+] // Cell. 2001. V. 106. P. 171–182.
 19. Osherovich L.Z., Weissman J.S. Multiple Gln/Asn-rich prion domains confer susceptibility to induction of the yeast [PSI+] prion // Cell. 2001. V. 106. P. 183–194.
 20. Volkov K.V., Aksenova A.Yu., Soom M.J. *et al.* Non-Mendelian determinant involved in the control of translation accuracy in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 2002. V. 160, N 1. P. 25–36.
 21. Sopova J.V., Zadorsky S.P., Inge-Vechtomo S.G. Novel antisuppressor determinant [ASP⁺] of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // XXI Intern. Conf. on Yeast Genetics and Molecular Biology. Gotheburg, Sweeden. Abstracts. Yeast. V. 20, N S1. P. S291.
 22. Chromosome research. Organization inside the cell nucleus / Ed. H.J. Lipps, C. Cremer. 2003. V. 11. № 5. Special issue.
 23. Kenney J.M., Knight D., Wise M.J., Vollrath F. Amyloidogenic nature of spider silk // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. P. 4156–4163.
 24. Борхсениус А.С., Саснаускас К., Гедвилайте А., Инге-Вечтомов С.Г. Химерные прионы дрожжей с нестабильным наследованием // Генетика. 2002. Т. 38, № 3. С. 300–305.
 25. Luzatto L., Notaro R. Haemoglobin's chaperone // Nature. 2002. V. 417. P. 704–705.
 26. Zarrinpar All., Sang-Hyun Park, Lim W.A. Optimization of specificity in cellular protein interaction network by negative selection // Nature. 2003. V. 426. P. 676–680.
 27. Стегний В.Н. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. Новосибирск: Изд-во Новосибирского ун-та. 1993. 110 с.
 28. Стегний В.Н. Сальтационное видообразование: средовые механизмы // Эволюционная биология. Томск, 2002. С. 109–117.