

ПРИОНЫ И АМИЛОИДЫ КАК ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ МАТРИЦЫ ПРОТЕОМА

© 2023 г. С. Г. Инге-Вечтомов^{a,b,*}, А. П. Галкин^{a,b,**}, Г. А. Журавлёва^{a,***},
А. А. Нижников^{a,c,****}, С. П. Задорский^{a,b,*****}

^aСанкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

^bСанкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Санкт-Петербург, Россия

^cВсероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Пушкин, Россия

*E-mail: ingevechtomov@gmail.com

**E-mail: a.galkin@spbu.ru

***E-mail: g.zhuravleva@spbu.ru

****E-mail: a.nizhnikov@spbu.ru

*****E-mail: s.zadorsky@spbu.ru

Поступила в редакцию 28.04.2023 г.

После доработки 30.07.2023 г.

Принята к публикации 10.08.2023 г.

Исследования амилоидов до недавнего времени были направлены исключительно на выявление их роли в возникновении опасных заболеваний человека и животных. Однако они широко распространены в природе и участвуют в регуляции жизненно важных процессов у представителей всех трёх доменов живого мира: архей, бактерий и эукариот. Дискуссионным остаётся вопрос о биологической значимости особого класса амилоидов — прионов. Открытие новых функциональных амилоидов обусловлено развитием биоинформатических и протеомных методов идентификации белков, формирующих амилоиды. В обзоре представлен путь от изучения патологических амилоидных образований к исследованию адаптивных амилоидов у бактерий, растений и животных. Показана важность амилоидной структуры, основанной на принципе матричного копирования конформации, как одной из важнейших форм надмолекулярной организации белков.

Ключевые слова: амилоиды, прионы, конформационные матрицы, матричные процессы I и II рода, трансляция.

DOI: 10.31857/S0869587323090074, EDN: SQXVLD

Амилоиды как конформационные матрицы. Амилоиды — белковые фибриллярные агрегаты, обладающие особой кросс- β -структурой. Отли-

чительная черта амилоидных фибрилл — способность к росту за счёт присоединения новых мономеров белков, формирующих амилоиды. Присоединение мономера к амилоидной фибрилле сопровождается изменением его конформации. После присоединения она соответствует конформации других мономеров в составе фибриллы. Таким образом, амилоидные фибриллы служат конформационными (пространственными) матрицами для такого изменения [1–3].

Открытие и изучение амилоидов, в том числе их особого класса — прионов, отличающихся инфекционными свойствами и в ряде случаев способностью к наследованию, позволили модифицировать формулировку центральной догмы молекулярной биологии, описывающей доступные пути реализации генетической информации в живой клетке [4]. Согласно модифицированной

ИНГЕ-ВЕЧТОМОВ Сергей Георгиевич — академик РАН, профессор кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ, научный руководитель СПбФ ИОГен РАН. ГАЛКИН Алексей Петрович — доктор биологических наук, профессор кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ, директор СПбФ ИОГен РАН. ЖУРАВЛЁВА Галина Анатольевна — доктор биологических наук, профессор кафедры генетики и биотехнологии и лаборатории биологии амилоидов СПбГУ. НИЖНИКОВ Антон Александрович — профессор РАН, заведующий лабораторией протеомики надорганизменных систем ВНИИСХМ, профессор СПбГУ. ЗАДОРСКИЙ Сергей Павлович — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник СПбГУ, старший научный сотрудник лаборатории мутагенеза и генетической токсикологии СПбФ ИОГен РАН.

версии догмы, реализация генетической информации осуществляется через матричные процессы I рода (репликация, транскрипция, трансляция) и II рода, в которых участвуют не линейные, а пространственные (белковые) матрицы. В случае последних происходит копирование не первичной структуры белков, а их конформации [2, 5].

Изначально интенсивное изучение амилоидов было связано с их ролью в развитии ряда тяжёлых и, как правило, неизлечимых заболеваний человека и животных — амилоидозов [1, 6–8]. Однако начиная с 2000-х годов накопился большой массив данных, подтверждающих широкое распространение амилоидов в живой природе и их участие в осуществлении и регуляции различных жизненно важных процессов в клетке и организме [1, 9, 10].

Согласно современным молекулярно-биологическим представлениям, амилоидные агрегаты — упорядоченные фибриллярные белковые структуры, состоящие из межмолекулярных бета-складчатых слоёв, стабилизированных многочисленными водородными связями. Рост амилоидного олигомера (матрицы II рода) за счёт присоединения новых мономеров белка, изменяющих при этом свою конформацию, приводит к образованию протофибрилл, которые затем объединяются в фибриллы и крупные амилоидные агрегаты. Упорядоченность амилоидных агрегатов определяется тем, что межмолекулярные связи возникают между одними и теми же последовательностями взаимодействующих мономеров. Переход в амилоидную конформацию обычно сопровождается резким увеличением доли бета-слоёв во вторичной структуре белка [7, 11].

Уникальная структура амилоидных агрегатов определяет их исключительные физико-химические свойства: с одной стороны, повышенную устойчивость к различным воздействиям (в частности, к действию ионных детергентов, протеаз, повышенных температур), с другой — гибкость, эластичность и в ряде случаев способность к регулируемой сборке и разборке, что позволяет непатологическим амилоидам участвовать в выполнении структурной, защитной, запасющей и других жизненно важных функций [9, 10]. Необычайная устойчивость амилоидных агрегатов к повреждающим факторам, способность к самоорганизации и росту за счёт воспроизведения амилоидной конформации, а также (в случае некоторых амилоидов) к взаимодействию с нуклеиновыми кислотами, их защите от деградации позволяют предположить, что они могли играть важную роль на первых этапах возникновения жизни [12].

Амилоидозы. Актуальность исследования амилоидов в первую очередь связана с тем, что они могут способствовать развитию неизлечимых со-

циально значимых заболеваний, многие из которых называют амилоидозами. В настоящее время ассоциация с образованием амилоидных агрегатов установлена для более чем 40 заболеваний человека, поражающих различные органы и системы. Наиболее известные среди них — нейродегенеративные заболевания, такие как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона и др. [1, 7].

Амилоидозы могут быть системными и локальными и поражать почки, лёгкие, сердце, печень, головной мозг и т.д. Различают три их основных типа: спорадические, наследственные и инфекционные. Инфекционные (прионные) заболевания связаны с проникновением в организм с пищей или иным путём и последующим “размножением” чужеродных фибрилл прионного белка PrP^{Sc} (Scrapie Prion Protein) [6]. Причиной наследственных амилоидозов служат мутации, способствующие патологическому накоплению и (или) агрегации амилоидогенных белков. Спорадические амилоидозы — наиболее распространённая форма, их доля составляет примерно 95%. Причины их возникновения — предмет научных дискуссий и активных исследований.

Анализ данных по всем известным спорадическим амилоидозам человека показал, что в подавляющем большинстве случаев основными факторами риска возникновения этих заболеваний служат различные стрессовые воздействия, в частности, хронические инфекции, рак, нарушение кровоснабжения и травмы [13]. Более того, разные типы стресса вызывают либо сверхпродукцию, либо модификацию амилоидогенных белков, что индуцирует их патологическую агрегацию. Таким образом, при спорадических амилоидозах формирование цитотоксических фибрилл оказывается не первопричиной заболевания, а одним из важных элементов патологического каскада. Кроме того, вероятность развития многих амилоидозов чётко коррелирует с возрастом. Например, частота возникновения таких распространённых заболеваний, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, связанных с накоплением цитотоксических фибрилл бета-амилоида (A β) и альфа-синуклеина соответственно, экспоненциально увеличивается с возрастом. По всей вероятности, защитные системы организма, эффективно функционирующие у молодых людей, перестают работать в пострепродуктивный период, что приводит к накоплению, модификациям и агрегации потенциально амилоидогенных белков [13].

Прионы (от “proteinaceous infectious particles”) представляют собой особый класс амилоидов — инфекционные амилоиды. Их главное отличительное свойство — способность к инфицированию клеток (организмов), изначально не несущих прион. Очевидно, главным фактором, обуслов-

ливающим распространение прионных инфекций у млекопитающих, служит способность прионных частиц к размножению в организме хозяина, что подразумевает возможность расщепления прионных агрегатов на более мелкие фрагменты и, следовательно, увеличение числа инфекционных частиц (“семян” приона). В случае неинфекционных амилоидов новые амилоидные олигомеры и агрегаты образуются независимо от предсуществующих, при этом процесс амилоидогенеза включает только образование амилоидных агрегатов *de novo* и их рост [8, 14].

Прион PrP^{Sc}, вызывающий ряд неизлечимых нейродегенеративных заболеваний человека и других млекопитающих, представляет собой агрегированную форму нормального клеточного белка PrP (PrP^C) [6]. Частицы PrP^{Sc} после попадания в организм не расщепляются ферментами желудочно-кишечного тракта, проникают в фолликулярные дендритные клетки и запускают конформационные изменения белка PrP организма хозяина. Далее эти фибриллярные частицы через клетки периферической нервной системы транспортируются в мозг и запускают процесс нейродегенерации [15]. Прионная конверсия белка PrP вызывает болезнь кúру, связанную с ритуальным каннибализмом, болезни Крейтцфельда—Якоба, Герстмана—Штраусслера—Шейнкера, фатальную семейную бессонницу у людей и сходные заболевания млекопитающих. К этой же группе относятся коровье бешенство, или губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота (BSE, Bovine Spongiform Encephalopathy), способная развиваться у человека при поедании мяса заражённых животных [6]. Прионные свойства также выявлены экспериментально для белка альфа-синуклеина, агрегация которого ассоциирована с болезнью Паркинсона, однако, в отличие от частиц PrP^{Sc}, прионные фибриллы альфа-синуклеина, вероятно, не передаются естественным путём [8].

Генетический контроль трансляции и прионы дрожжей. Пониманию механизмов, лежащих в основе амилоидо- и прионогенеза, в немалой степени помогло исследование прионов низших эукариот, в частности пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и других грибов. У этих одноклеточных организмов прионы являются нехромосомными наследственными детерминантами белковой природы. Согласно одному из распространённых определений, прионы — инфекционные изоформы белков, способные к автокаталитическому воспроизведению [16]. Обычно прионными свойствами обладает определённый конформационный вариант нормального клеточного белка, образующий амилоидные агрегаты, которые служат конформационными матрицами для присоединения и укладки подобных белков.

Переход белков в прионную форму (прионизация), как правило, приводит к изменению их функциональной активности и возникновению различных фенотипов, которые наследуются в ряду поколений. Этот феномен получил название “белковая наследственность”, то есть наследование признаков, определяемых изменением конформации белка, без изменения нуклеотидной последовательности гена, кодирующего этот белок. При переходе белка в прионную форму его активность часто снижается, в результате клетка может приобретать фенотип, характерный для мутанта по соответствующему гену. В то же время в ряде случаев прионные агрегаты могут выполнять какие-либо новые функции в клетке, что приводит к появлению новых фенотипов, несвойственных соответствующим мутантам [16].

Сегодня известно около 10 прионов дрожжей-сахаромицетов и других низших эукариот [16, 17], а сама история изучения дрожжевых прионов началась с открытия Б. Коксом в 1965 г. нехромосомного наследственного детерминанта [*PSI*⁺], повышающего эффективность прочтения кодонов-терминаторов как значащих в ходе трансляции мРНК, что приводит к подавлению проявления нонсенс-мутаций [18]. Природа фактора [*PSI*⁺] оставалась загадкой в течение почти 30 лет. Лишь в начале 1990-х годов появились экспериментальные данные, позволившие идентифицировать [*PSI*⁺] как прионную форму белка Sup35 — дрожжевого фактора терминации трансляции [16].

Большую роль в идентификации природы [*PSI*⁺] сыграли исследования генетического контроля трансляции, проводимые на кафедре генетики и селекции Ленинградского (ныне — Санкт-Петербургского) государственного университета. История изучения гена *SUP35* — структурного гена фактора [*PSI*⁺], и функционально связанного с ним гена *SUP45* у *S. cerevisiae* насчитывает более 50 лет. В 1964 г. в лаборатории физиологической генетики ЛГУ получены мутации, которые приводили к супрессии нонсенс-мутаций всех трёх типов, или omnipotentной супрессии. Позднее аналогичные мутации были изолированы в других лабораториях мира, а соответствующие им гены названы *SUP35* и *SUP45* [19].

Мутации в генах *SUP35* и *SUP45* приводили к рецессивной omnipotentной супрессии, аллосупрессии, нарушениям клеточного цикла, а также многочисленным плейотропным эффектам. Данные генетических и биохимических исследований, накопленные к началу 1990-х годов, позволили прийти к выводу, что продукты генов *SUP35* и *SUP45* участвуют в контроле точности трансляции. Хотя ещё в ранних работах предполагалось участие белков Sup35 и Sup45 в терминации

трансляции, отсутствие гомологии с факторами терминации трансляции прокариот, а также антисупрессорного эффекта при сверхэкспрессии не давали возможности отнести их к факторам терминации трансляции. Предполагалось, что эти белки могут играть вспомогательную роль в терминации трансляции, взаимодействуя с её факторами или рибосомами [19]. В 1994 г. в лаборатории Л.Л. Киселёва совместно с рядом зарубежных лабораторий было установлено, что белок Sup45 является фактором терминации трансляции, способным узнавать стоп-кодона. Он получил название eRF1 и вместе с бактериальными белками RF1 и RF2 был отнесён к факторам терминации 1 класса. Данные, существенные для установления роли белка Sup35 как фактора терминации eRF3, получены годом позже [20, 21].

В конце 1980-х — начале 1990-х годов на кафедре генетики и селекции ЛГУ (СПбГУ) получены парадоксальные на тот момент данные: несмотря на то, что белок Sup35 является фактором терминации трансляции, его сверхпродукция приводит к нонсенс-супрессорному эффекту, то есть снижает эффективность терминации трансляции. Более того, у части клеток этот эффект сохранялся после окончания сверхпродукции Sup35 и стабильно наследовался в ряду поколений, но исчезал после инкубации таких клонов на среде с гидрохлоридом гуанидина — агентом, изгоняющим фактор $[PSI^+]$. Таким образом, сверхпродукция белка Sup35 приводила к возникновению фактора $[PSI^+]$ [17]. На основании этих данных Р. Викнер выдвинул гипотезу о том, что цитоплазматический детерминант $[PSI^+]$ представляет собой прионную форму белка Sup35. Одновременно учёный предположил, что другой неменделевский детерминант дрожжей $[URE3]$ — это прионная форма транскрипционного регулятора Ure2. Обе версии впоследствии подтвердились [16].

Исследования кафедры генетики и селекции СПбГУ под руководством С.Г. Инге-Вечтомова и лаборатории М.Д. Тер-Аванесяна позволили также выделить в составе белка Sup35 домен, отвечающий за образование и поддержание его прионной формы. Белки Sup35 большинства эукариот, за исключением некоторых простейших, имеют трёхдоменную структуру [19]. Показано, что N-домен дрожжевого белка Sup35 — не жизненно важный, однако требуется для прионизации Sup35 с образованием приона $[PSI^+]$. M-домен участвует в поддержании приона в ряду клеточных делений. C-концевой домен необходим и достаточен для участия белка Sup35 в терминации трансляции [14]. N-терминальный домен Sup35 отличается необычным аминокислотным составом. У дрожжей *S. cerevisiae* он характеризуется высоким содержанием остатков Q и N (45% по

сравнению со средним значением 10% для протеома дрожжей), а также G и Y (33% по сравнению со средним значением 8%). Домен содержит два субдомена, которые обуславливают прионоподобные свойства этого белка: QN-богатый район (аминокислоты, ак 6–33) и OR — участок олигопептидных повторов (ак 41–97). Присутствие последних (консенсус PQGGYQQ-YN), напоминающих по составу повторы в белке PrP млекопитающих (консенсус PHGGGWGQ), — одно из наиболее интересных свойств N-терминального домена Sup35. Способность Sup35 к прионизации ограничена только почкующимися дрожжами и, по-видимому, объясняется присутствием QN- и OR-участков, отсутствующих у гомологов Sup35 из других организмов [22].

Именно последовательность N-терминального домена позволяет подразделить гомологов eRF3 млекопитающих на два подсемейства. К первому относятся белки GSPT1 (или eRF3a), ко второму — белки GSPT2 (eRF3b) [19]. Хотя N-терминальные домены белков семейства eRF3 млекопитающих не проявляют значительного сходства с соответствующими доменами у низших эукариот, они тоже характеризуются необычным аминокислотным составом. Например, N-домены белка GSPT1 мыши и человека обогащены остатками P, S и G (10%, 15% и 20% соответственно). Вместо QN-участка и олигопептидных повторов, присутствующих в N-доме белка Sup35 дрожжей, субдомен N1 GSPT1 мыши, крысы и человека содержит протяжённые глициновые повторы и глицин-сериновые тракты.

Доказательством функциональной значимости N-терминального домена служит его сохранение в ходе эволюции. У всех секвенированных гомологов eRF3 (за исключением *Giardia lamblia*) присутствует N-терминальный домен. Предполагается, что он может участвовать в образовании комплекса терминации трансляции, а также во взаимодействии с другими белками [22]. Некоторые из белков, взаимодействующих с Sup35 (например, Slal и Upf1), могут влиять на его агрегацию [16, 17]. В то же время для многих белков, влияющих на агрегацию, прямое взаимодействие с Sup35 не доказано. Также возможно, что некоторые белки, контактирующие с растворимым Sup35, не способны взаимодействовать с его агрегированной формой [23].

Подобно приону млекопитающих PrP^{Sc}, для которого свойственно присутствие различных штаммов [6, 11], в случае приона $[PSI^+]$ также обнаружены разные варианты, которые отличаются друг от друга по структуре агрегатов, стабильности, эффективности супрессии и другим характеристикам [3, 24].

Различные прионы способны взаимодействовать друг с другом в клетках дрожжей, что может проявляться как стимуляция или, наоборот, ингибирование возникновения или поддержания одного приона в присутствии другого. Так, возникновение приона $[PSI^+]$ при сверхпродукции белка Sup35 или его делеционных вариантов, содержащих N-домен, возможно только в присутствии другого приона — $[PIN^+]$ (от “Psi Inducible”) — агрегированной формы белка Rnq1, или других прионов, функционально замещающих $[PIN^+]$. С другой стороны, присутствие приона $[PSI^+]$ негативно влияет на возникновение $[URE3]$ при сверхпродукции белка Ure2.

Имеющиеся данные говорят о разнообразии влияния прионов друг на друга, при этом характер такого влияния может отличаться для разных вариантов (штаммов) прионов [24, 25]. Кроме того, в рамках концепции белковой наследственности описан феномен “полиприонного” наследования признаков: белки Swi1 и Rnq1, в норме не взаимодействующие друг с другом, в прионной форме могут взаимодействовать, что приводит к появлению нового фенотипа — нонсенс-супрессии [26]. Таким образом, по аналогии с моногенным и полигенным наследованием, в рамках концепции белковой наследственности выделяются типы моноприонного и полиприонного наследования [27].

Исследования с использованием модели дрожжевого приона $[PSI^+]$ оказались чрезвычайно полезны для понимания механизмов поддержания и распространения прионов, роли белков-шаперонов в этом процессе и основных отличий инфекционных амилоидов (прионов) от неинфекционных. Показано, что на поддержание приона $[PSI^+]$ влияют многочисленные белки-шапероны. Прежде всего необходим промежуточный уровень шаперона Hsp104. Делеция гена *HSP104*, а также ингибирование белка Hsp104 с помощью химических агентов, таких как гидрохлорид гуанидина, приводит к изгнанию $[PSI^+]$. Этот шаперон также необходим для поддержания других дрожжевых прионов [17]. Hsp104 участвует в расщеплении амилоидных фибрилл прионных белков на более мелкие фрагменты (прионные “семена” или пропагоны), которые затем могут быть переданы дочерним клеткам при делении. Именно образование прионных “семян” необходимо для инфекционности/наследуемости амилоидов. Эта гипотеза впервые сформулирована в лаборатории М.Д. Тер-Аванесяна [14]. Для правильной работы белка Hsp104 необходимо участие молекулярных шаперонов, входящих в группы Hsp90, Hsp70 и Hsp40. Из последней группы наиболее важен для поддержания приона $[PSI^+]$

белок Sis1 [28]. Кроме шаперонов, в поддержании прионов принимают участие внутриклеточные факторы сортировки белков (Cur1, Btn2 и Hsp42), а также ряд других белков [28, 29].

До сих пор активно обсуждается вопрос о том, могут ли прионы дрожжей и других низших эукариот быть полезными для клеток-хозяев (по крайней мере при определённых условиях окружающей среды) или являются “молекулярными” болезнями, скорее вредными для клеток. Сравнение скорости роста нескольких штаммов $[PSI^+]$ и $[psi^-]$ показало, что фактор $[PSI^+]$ не влияет на скорость роста клеток дрожжей при обычных условиях культивирования в лаборатории [30]. В то же время систематическое сопоставление фенотипа штаммов $[PSI^+]$ с изогенными штаммами $[psi^-]$ в различных условиях позволило предположить, что присутствие фактора $[PSI^+]$ в клетках дрожжей может обеспечивать селективные преимущества за счёт экспрессии псевдогенов или нетранслируемых в обычных условиях 3'-участков мРНК [31].

Согласно другой точке зрения, прион $[PSI^+]$ — “болезнь” содержащих его дрожжевых клеток [16]. По всей видимости, обе версии имеют право на существование, а соотношение пользы и вреда прионов зависит от генотипа клеток, несущих прион, и условий внешней среды. Последствия прионизации сходны с последствиями миссенс-мутаций — в обоих случаях происходят наследуемые изменения структуры и функциональной активности белка. Более того, прионизация обычно ведёт к инактивации белка и порой к приобретению новой функции. В соответствии с этим в большинстве случаев прионизация должна приводить к негативным последствиям, но иногда возникновение прионов может быть адаптивным. По крайней мере для одного приона низших эукариот, $[Het-S]$ гриба *Podospora anserina*, показано наличие функциональной роли — участие в контроле несовместимости гифов [32].

В поисках новых амилоидов: биоинформатика и экспериментальная протеомика. В последние годы обнаруживается всё больше белков, способных к образованию амилоидных фибрилл и выполняющих свою функцию в амилоидной форме. Функциональные амилоиды обнаружены почти во всех основных группах организмов. Среди многообразных функций амилоидов и амилоидоподобных белков можно отметить формирование биоплёнок у бактерий, регуляцию биогенеза и структуры клеточной стенки у дрожжей, участие в контроле оогенеза и сперматогенеза у позвоночных и беспозвоночных, регуляцию долговременной памяти, контроль полимеризации меланина у животных и др. [9, 10]. Прогресс в открытии

новых функциональных амилоидов и оценке распространённости этого феномена в живой природе в немалой степени связан с развитием биоинформатических и протеомных методов идентификации белков, формирующих амилоиды. Кратко рассмотрим некоторые из этих методов и приведём примеры недавно открытых функциональных амилоидов.

Идентификация каждого нового амилоида — весьма заметное событие, поскольку, несмотря на бурное развитие методологии исследования амилоидных свойств белков, включая высокоразрешающие методы структурного анализа [7], проблема поиска амилоидов в протеомах различных организмов сохраняет свою актуальность. К сожалению, в настоящее время не существует методов, которые позволяли бы выявить в каком-либо биологическом образце все белки, образующие амилоиды, однако существуют подходы, способные быстро и эффективно сузить круг поисков. Так, в последние годы создан целый ряд биоинформатических подходов, направленных на выявление в белках участков, склонных к амилоидогенезу. Участки можно разделить на две основные группы: обогащённые Q и/или N и обогащённые гидрофобными остатками. Именно обогащённость последовательностей структурных белков прионов дрожжей и некоторых патологических амилоидов млекопитающих Q и N стала особенностью, использованной в первой работе по биоинформатическому поиску амилоидоподобных белков в протеомах различных организмов [33].

Позже было разработано более 20 вычислительных методов, основанных на выявлении специфичных для амилоидных белков свойств первичной или пространственной структуры, машинном обучении, а также консенсусных подходов, сочетающих в себе несколько алгоритмов [34]. Существующие биоинформатические подходы не учитывают весь комплекс факторов, определяющих склонность белка к амилоидогенезу *in vivo*, таких как уровень продукции, внутри- и межмолекулярные взаимодействия, посттрансляционные модификации и локализация [34]. Вероятно, наиболее перспективны для дальнейшего совершенствования методологии предсказания амилоидных свойств алгоритмы, основанные на машинном обучении, однако их развитие существенно ограничено небольшим набором белков, амилоидные свойства которых экспериментально доказаны *in vivo*.

Большую роль в росте числа идентифицированных амилоидных белков играют появившиеся в последние годы методы экспериментальной протеомики. Разработана и успешно апробирована методология поиска и идентификации амилоидов в любых тканях, включающая протеомный

скрининг и иммунопреципитацию амилоидных фибрилл из исследуемых организмов [35].

Метод протеомного скрининга основан на универсальном свойстве амилоидных фибрилл — их высокой устойчивости к обработке при комнатной температуре такими ионными детергентами, как додецилсульфат натрия (sodium dodecyl sulfate, SDS). Большинство белковых агрегатов и комплексов при обработке 1% SDS диссоциируют до мономеров, тогда как амилоидные фибриллы остаются интактными. После обработки белкового лизата ионным детергентом фракция, содержащая высокомолекулярные амилоидные фибриллы, отделяется от прочих белков с помощью ультрацентрифугирования и после промывки обрабатывается трипсином. Пептиды идентифицируются с помощью масс-спектрометрии, что позволяет выявлять конкретные белки, представленные во фракции SDS-устойчивых высокомолекулярных агрегатов. Необходимо учитывать, что, помимо амилоидов, некоторые другие фибриллярные структуры и агрегаты также устойчивы к обработке ионными детергентами. Таким образом, этот метод не идентифицирует конкретные амилоиды, однако позволяет значительно сузить круг белков — кандидатов на роль амилоидов. Из списка выявленных в протеомном скрининге белков с помощью биоинформатических подходов и анализа литературных данных определяются наиболее перспективные кандидаты.

На следующем этапе с помощью первичных антител проводится иммунопреципитация одного из перспективных белков, выявленных с помощью протеомного скрининга. Затем белок за счёт кратковременного изменения кислотности отделяется от магнитных шариков и антител. Такой подход позволяет выделять из организма нативные амилоидные фибриллы, не разрушая их структуру. В конце проводится анализ структуры фибрилл с помощью электронной микроскопии, а также окрашивание амилоидспецифичными красителями [35].

Методологию успешно использовали для поиска и идентификации амилоидных белков в клетках дрожжей *S. cerevisiae* и мозге позвоночных животных. В частности, выявлен амилоидный белок FXR1 в нейронах головного мозга млекопитающих [36]. Всё это открывает новые перспективы для системного поиска и идентификации патологических и функциональных амилоидов у организмов с аннотированным геномом.

Амилоиды прокариот и их роль в формировании надорганизменных взаимодействий. История изучения амилоидов бактерий началась с классических исследований коллектива лаборатории М. Чапмана, в которых были продемонстрирова-

ны амилоидные свойства курлина CsgA — основного структурного компонента фибрий (ворсинок) Р-типа у *Escherichia coli* [37]. Позднее был опубликован ряд работ, позволивших выявить новые бактериальные амилоиды, выполняющие разнообразные функции, включая формирование биоплёнок, регуляцию активности токсинов, регуляцию транскрипции и преодоление поверхностного натяжения [9, 38].

Амилоиды, идентифицированные у архей, вовлечены в образование экстраклеточных оболочек и биоплёнок [38]. В настоящее время известно уже более 30 амилоидов прокариот, контролирующих взаимодействия “патоген—хозяин”, большинство из которых участвует в формировании биоплёнок различными микроорганизмами, обеспечивая их прикрепление к тканям хозяина и иным поверхностям и выступая в качестве факторов вирулентности [38]. Принимая во внимание тот факт, что число патогенных для человека видов бактерий превышает 1.5 тыс. и более 60% из них образуют биоплёнки [39], позволяющие им выживать при взаимодействии с хозяином, можно ожидать, что реальное число бактериальных амилоидов может превышать 1 тыс. При этом такие амилоиды являются функциональными для бактерий, продуцирующих их, и патогенными для многоклеточных хозяев [38].

Другой аспект, раскрывающий роль амилоидов прокариот в надорганизменных взаимодействиях, обнаружен недавно при изучении клубеньковых бактерий — группы альфапротеобактерий порядка *Rhizobiales*, имеющих большое значение для сельского хозяйства благодаря их способности фиксировать атмосферный азот в симбиозе с бобовыми, что в свою очередь позволяет существенно сократить дозы минеральных удобрений. Показано, что два белка (RopA и RopB) бактерии *Rhizobium leguminosarum*, имеющие предсказанную структуру поринов и локализацию в наружной мембране, образуют амилоидные фибриллы на поверхности бактериальных клеток, которые находятся в стационарной фазе [40]. Более того, такие же фибриллы были обнаружены на поверхности бактериоидов — выделенных из корневых клубеньков гороха дифференцированных клеток *R. leguminosarum*, осуществляющих фиксацию атмосферного азота [41]. Эти данные свидетельствуют в пользу вовлечённости амилоидов клубеньковых бактерий во взаимодействия с растением-хозяином, хотя их конкретную биологическую роль ещё предстоит установить.

В целом амилоиды прокариот обладают значительным разнообразием функций и опосредуют надорганизменные взаимодействия в системах “патоген—хозяин” и “симбионт—хозяин”.

Амилоиды растений: запасание белка в семенах и пищевая ценность растительных продуктов. Открытие амилоидов у растений — пример успешного применения биоинформатических подходов для предсказания возможных функций и локализации амилоидных белков. Несмотря на то, что амилоидные белки идентифицированы у архей, бактерий, грибов и животных, включая человека, растения до недавнего времени оставались белым пятном на “карте мира” амилоидов.

Масштабный биоинформатический скрининг, проведённый при помощи алгоритма SARP в протеомах многочисленных видов наземных растений с секвенированными геномами, показал, что белками растений, которые наиболее обогащены участками, склонными к амилоидогенезу, являются запасные белки с консервативными доменами CUPIN [42]. Экспериментальная проверка этих данных на семенах посевного гороха *Pisum sativum* L. подтвердила биоинформатические предсказания. Установлено, что запасной глобулин гороха вицилин, имеющий два домена CUPIN1, образует в семенах амилоиды, которые накапливаются при созревании, а затем разбираются при прорастании зародыша [43]. Амилоидогенез запасных белков обеспечивает стабилизацию запаса питательных веществ семян, так как амилоиды — один из наиболее устойчивых к различным воздействиям вариантов надмолекулярной организации белков. Примечательно, что клетки растений, в отличие от человеческих, имеют молекулярные системы, позволяющие разбирать крупные амилоидные комплексы. Идентификация этих систем может представлять потенциальную ценность для биомедицины.

Кроме того, амилоиды запасных белков не перевариваются протеазами желудочно-кишечного тракта в условиях, приближенных к физиологическим [43], то есть присутствие амилоидных скоплений в семенах снижает их пищевую ценность. Это открывает перспективы для поиска аллелей генов, кодирующих запасные белки, не образующие протеазоустойчивые агрегаты, для их дальнейшего использования в селекции. Однако в настоящее время отсутствуют данные, позволяющие сделать заключение о том, насколько изменение протеазоустойчивости агрегирующих белков повлияет на выживаемость семян.

Таким образом, амилоидогенез запасных белков семян служит консервативным механизмом, не только обеспечивающим стабилизацию белков семян при долговременном хранении, в том числе в неблагоприятных условиях, но и снижающим их пищевую ценность.

Функциональные амилоиды позвоночных. Открытие в начале XXI в. функциональных амилоидов у позвоночных указывает на то, что само по

себе наличие кросс- β -структур не может считаться патогенным фактором. Ряд белков в норме функционирует в организме в амилоидной форме. По всей вероятности, цитотоксичность патологических амилоидов определяется их специфическими взаимодействиями с определёнными рецепторами, другими белками или липидами, что провоцирует апоптоз (программируемую гибель клеток). Вместе с тем многие амилоидные белки выполняют жизненно важные функции. Функциональные амилоиды в организме позвоночных могут играть запасующую, структурную, защитную и регуляторную роль [9, 10]. Целый ряд гормональных пептидов эндокринной и нейроэндокринной систем мыши запасается в виде амилоидных фибрилл в секреторных гранулах. При секреции амилоидные фибриллы расщепляются под воздействием неизвестного фактора, и пептиды функционируют в мономерной форме [44]. Биоинформатический анализ даёт основания полагать, что эти гормоны запасаются в амилоидной форме у представителей всех классов позвоночных. Кроме того, фрагмент белка PMEL17 в меланосомах пигментных клеток образует амилоидные фибриллы, которые служат каркасом, необходимым для синтеза и полимеризации меланина [45]. Так, формирование амилоидных фибрилл необходимо для наработки и запаса меланина, который поглощает ультрафиолетовые лучи и тем самым защищает организм от лучевого повреждения. Консервативные амилоидогенные последовательности в составе белка PMEL17 выявлены не только у млекопитающих, но и у других позвоночных.

С помощью методологии протеомного скрининга и идентификации амилоидов показано, что РНК-связывающий белок FXR1 функционирует в нейронах головного мозга крысы и в культуре клеток нейроblastомы человека в амилоидной форме [36]. Амилоидные олигомеры и фибриллы этого белка связывают различные молекулы РНК, включая мРНК, кодирующую ключевой провоспалительный цитокин TNF- α , и препятствуют их трансляции. Молекулы РНК, взаимодействующие с амилоидными гранулами FXR1, нечувствительны к обработке РНКазой А. Есть основания полагать, что при стрессовых воздействиях амилоидные фибриллы FXR1 инактивируются в составе крупных стресс-гранул, что может способствовать трансляции мРНК, кодирующей цитокин TNF- α . Получены данные о том, что амилоидогенная последовательность FXR1 эволюционно консервативна, и этот белок функционирует в амилоидной форме в нейронах головного мозга рептилий, амфибий, птиц и млекопитающих [46].

Новейшие данные, рассмотренные в настоящем обзоре, позволяют констатировать существенное изменение представлений об амилоидах, долгое время считавшихся исключительно патогенными структурами, и показывают важность амилоидной структуры (в основе которой лежит принцип матричного копирования конформации) как одного из важнейших вариантов надмолекулярной организации белков. Более того, конформационные белковые матрицы участвуют не только в выполнении жизненно важных функций у архей, бактерий и эукариот, включая человека, но и в формировании надорганизменных симбиотических систем.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Разделы работы “В поисках новых амилоидов: биоинформатика и экспериментальная протеомика”, “Функциональные амилоиды позвоночных” подготовлены при поддержке гранта РФФИ № 20-14-00148-П, раздел “Генетический контроль трансляции и прионы дрожжей” — при поддержке гранта РФФИ № 23-14-00063, раздел “Амилоиды прокариот и их роль в надорганизменных взаимодействиях” — в рамках гранта Президента РФ (МД-2302.2022.5), раздел “Амилоиды растений” — в рамках государственного задания Минобрнауки РФ (тема FGEW-2021-0007).

ЛИТЕРАТУРА

1. Нижников А.А., Антонец К.С., Инге-Вечтомов С.Г. Амилоиды: от патогенеза к функции // Биохимия. 2015. № 9. С. 1356–1375.
2. Инге-Вечтомов С.Г. От хромосомной теории к матричному принципу // Генетика. 2015. № 4. С. 397–408.
3. Kushnirov V.V., Dergalev A.A., Alieva M.K., Alexandrov A.I. Structural bases of prion variation in yeast // Int. J. Mol. Sci. 2022. № 23 (10). 5738.
4. Crick F. Central dogma of molecular biology // Nature. 1970. V. 227. P. 561–563.
5. Андрейчук Ю.В., Задорский С.П., Жук А.С. и др. Связь матричных процессов I и II рода: амилоиды и стабильность генома // Молекулярная биология. 2020. № 5. С. 750–775.
6. Prusiner S.B., Scott M.R. Genetics of prions // Annu. Rev. Genet. 1997. V. 31. P. 139–75.
7. Chiti F., Dobson C.M. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade // Annu. Rev. Biochem. 2017. V. 86. P. 27–68.
8. Галкин А.П., Велижанова М.Е., Сопова Ю.В. и др. Прионы и неинфекционные амилоиды млекопитающих — сходства и отличия // Биохимия. 2018. № 10. С. 1476–1489.
9. Otzen D., Riek R. Functional Amyloids // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2019. № 11 (12). a033860.

10. *Sergeeva A.V., Galkin A.P.* Functional amyloids of eukaryotes: criteria, classification, and biological significance // *Curr. Genet.* 2020. № 5. P. 849–866.
11. *Horwich A.L., Weissman J.S.* Deadly conformations – protein misfolding in prion disease // *Cell.* 1997. № 4. P. 499–510.
12. *Maury C.P.J.* Origin of life. Primordial genetics: Information transfer in a pre-RNA world based on self-replicating beta-sheet amyloid conformers // *J. Theoret. Biol.* 2015. V. 382. P. 292–297.
13. *Galkin A.P., Sysoev E.I.* Stress response is the main trigger of sporadic amyloidoses // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. № 22 (8). 4092.
14. *Ter-Avanesyan M.D., Kushnirov V.V.* Structure and replication of yeast prions // *Cell.* 1998. № 1. P. 13–16.
15. *Heikenwalder M., Julius C., Aguzzi A.* Prions and peripheral nerves: a deadly rendezvous // *J. Neurosci. Res.* 2007. V. 85. P. 2714–2725.
16. *Wickner R.B., Edskes H.K., Son M. et al.* Yeast prions compared to functional prions and amyloids // *J. Mol. Biol.* 2018. № 20. P. 3707–3719.
17. *Liebman S.W., Chernoff Y.O.* Prions in yeast // *Genetics.* 2012. № 4. P. 1041–1072.
18. *Cox B., Tuite M.* The life of [PSI] // *Curr. Genet.* 2018. № 1. P. 1–8.
19. *Inge-Vechtomov S., Zhouravleva G., Philippe M.* Eukaryotic release factors (eRFs) history // *Biol. Cell.* 2003. V. 95. P. 195–209.
20. *Kisselev L.L., Frolova L.Y.* Termination of translation in eukaryotes: new results and new hypotheses // *Biochemistry.* 1999. № 1. P. 8–16.
21. *Trubitsina N., Zemlyanko O., Moskalenko S., Zhouravleva G.* From past to future: suppressor mutations in yeast genes encoding translation termination factors // *Bio. Comm.* 2019. № 2. P. 89–109.
22. *Inge-Vechtomov S., Zhouravleva G., Chernoff Y.* Biological roles of prion domains // *Prion.* 2007. V. 4. P. 228–235.
23. *Журавлёва Г.А., Бондарев С.А., Землянко О.М., Москаленко С.Е.* Роль белков, взаимодействующих с факторами терминации трансляции eRF1 и eRF3, в регуляции трансляции и прионизации // *Молекулярная биология.* 2022. № 2. С. 206–226.
24. *Derkatch I.L., Liebman S.W.* Prion-prion interactions // *Prion.* 2007. № 3. P. 161–169.
25. *Галкин А.П., Миронова Л.Н., Журавлёва Г.А., Инге-Вечтомов С.Г.* Прионы дрожжей, амилоидозы млекопитающих и проблема протеомных сетей // *Генетика.* 2006. № 11. С. 1–13.
26. *Nizhnikov A.A., Ryzhova T.A., Volkov K.V. et al.* Interaction of Prions Causes Heritable Traits in *Saccharomyces cerevisiae* // *PLOS Genetics.* 2016. № 12 (12). e1006504.
27. *Galkin A.P.* Prions and the concept of polyprionic inheritance // *Curr. Genet.* 2017. № 5. P. 799–802.
28. *Barbitoff Y.A., Matveenko A.G., Zhouravleva G.A.* Differential interactions of molecular chaperones and yeast prions // *J. Fungi.* 2022. № 8 (2). 122.
29. *Matveenko A.G., Barbitoff Yu.A., Jay-Garcia L.M. et al.* Differential effects of chaperones on yeast prions: CURrent view // *Current Genetics.* 2017. № 2. P. 317–325.
30. *Eaglesstone S.S., Cox B.S., Tuite M.F.* Translation termination efficiency can be regulated in *Saccharomyces cerevisiae* by environmental stress through a prion-mediated mechanism // *EMBO J.* 1999. № 7. P. 1974–1981.
31. *Shorter J., Lindquist S.* Prions as adaptive conduits of memory and inheritance // *Nat. Rev. Genet.* 2005. V. 6. P. 435–450.
32. *Daskalov A., Saupe S.J.* As a toxin dies a prion comes to life: A tentative natural history of the [Het-s] prion // *Prion.* 2015. № 3. P. 184–189.
33. *Michelitsch M.D., Weissman J.S.* A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2000. V. 97. P. 11910–11915.
34. *Navarro S., Ventura S.* Computational methods to predict protein aggregation // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2022. № 73. 102343.
35. *Belashova T.A., Valina A.A., Sysoev E.I. et al.* Search and identification of amyloid proteins // *Methods Protoc.* 2023. № 6 (1). 16.
36. *Sopova J.V., Koshel E.I., Belashova T.A. et al.* RNA-binding protein FXR1 is presented in rat brain in amyloid form // *Sci. Rep.* 2019. № 9 (1). 18983.
37. *Chapman M.R.* Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation // *Science.* 2002. V. 295. P. 851–855.
38. *Kosolapova A.O., Antonets K.S., Belousov M.V., Nizhnikov A.A.* Biological functions of prokaryotic amyloids in interspecies interactions: Facts and assumptions // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. № 21 (19). 7240.
39. *Jamal M., Ahmad W., Andleeb S. et al.* Bacterial biofilm and associated infections // *Journal of the Chinese Medical Association.* 2018. № 1. P. 7–11.
40. *Kosolapova A.O., Belousov M.V., Sulatskaya A.I. et al.* Two novel amyloid proteins, RopA and RopB, from the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* // *Biomolecules.* 2019. № 9 (11). 694.
41. *Kosolapova A.O., Belousov M.V., Sulatsky M.I. et al.* RopB protein of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* adopts amyloid state during symbiotic interactions with pea (*Pisum sativum* L.) // *Front. Plant. Sci.* 2022. № 13. 1014699.
42. *Antonets K.S., Nizhnikov A.A.* Predicting amyloidogenic proteins in the proteomes of plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. № 18 (10). 2155.
43. *Antonets K.S., Belousov M.V., Sulatskaya A.I. et al.* Accumulation of storage proteins in plant seeds is mediated by amyloid formation // *PLOS Biol.* 2020. № 18. e3000564.
44. *Maji S.K., Perrin M.H., Sawaya M.R. et al.* Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules // *Science.* 2009. V. 325. P. 328–332.
45. *Fowler D.M., Koulov A.V., Alory-Jost C. et al.* Functional amyloid formation within mammalian tissue // *PLoS Biol.* 2006. № 4. e6.
46. *Velizhanina M.E., Galkin A.P.* Amyloid properties of the FXR1 protein are conserved in evolution of vertebrates // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. № 23 (14). 7997.

PRIONS AND AMYLOIDS AS SPATIAL TEMPLATES OF THE PROTEOME

**S. G. Inge-Vechtomov^{1,2,#}, A. P. Galkin^{1,2,##}, G. A. Zhouravleva^{1,###}, A. A. Nizhnikov^{1,3,####},
and S. P. Zadorsky^{1,2,#####}**

¹*St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

²*Vavilov Institute of General Genetics, St. Petersburg Branch, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

³*All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology, Pushkin, Russia*

[#]*E-mail: ingevechtomov@gmail.com*

^{##}*E-mail: a.galkin@spbu.ru*

^{###}*E-mail: g.zhuravleva@spbu.ru*

^{####}*E-mail: a.nizhnikov@spbu.ru*

^{#####}*E-mail: s.zadorsky@spbu.ru*

Until recently, studies of amyloids were aimed exclusively at revealing their role in the occurrence of dangerous diseases in humans and animals. However, they are widely distributed in nature and are involved in the regulation of essential vital processes in representatives of all three domains of the living world: archaea, bacteria and eukaryotes. The question of the biological significance of the prions — a special class of amyloids, is still under discussion. The discovery of new functional amyloids became possible due to the development of the bioinformatic and proteomic methods for identification of amyloid-forming proteins. The review describes the way from the study of pathological amyloid structures to the investigation of adaptive amyloids in bacteria, plants, and animals. The importance of the amyloid structure, based on the principle of conformation template copying, as one of the most important forms of supramolecular organization of proteins is shown.

Keywords: amyloids, prions, conformational templates, type I and II template processes, translation.