

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Martin Bezdíčka**

Priony u kvasinek

Prions in yeast

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Praha, 2013

*Poděkování:* Rád bych poděkoval zejména své školitelce profesorce Zdeně Palkové za její trpělivost a vstřícnost a dále všem, kteří mě při psaní této práce podporovali.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 16.5.2013

Podpis

# Obsah

<b>Abstrakt .....</b>	<b>4</b>
<b>Úvod.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Kapitola: Znaky kvasinkových prionů.....</b>	<b>6</b>
1.1. Základní znaky kvasinkových prionů.....	6
1.2. Vznik prionů de novo. ....	8
1.2.1. Vznik prionů spojený se zvýšenou expresí daného proteinu .....	8
1.2.2. Další faktory ovlivňující vznik prionů de novo. ....	8
<b>2. Kapitola: Typy kvasinkových prionů.....</b>	<b>11</b>
2.1. Nejznámější kvasinkový prion [PSI <sup>+</sup> ]. ....	11
2.2. Prion [URE3].....	13
2.3. [PIN <sup>+</sup> ] jako prion, který je důležitý pro ostatní priony .....	14
2.4. Ostatní kvasinkové priony .....	16
<b>3. Kapitola: Chaperony ovlivňující kvasinkové priony. ....</b>	<b>18</b>
3.1. Chaperon Hsp104p a jeho vliv na kvasinkové priony. ....	18
3.2. Jiné chaperony ovlivňující kvasinkové priony.....	20
<b>4. Kapitola: Biologický vliv kvasinkových prionů .....</b>	<b>22</b>
4.1. Priony v přírodě a jejich význam.....	22
4.2. Priony kvasinek jako model pro studium savčích prionů .....	23
<b>Závěr .....</b>	<b>25</b>
<b>Přehled použité literatury .....</b>	<b>27</b>

## **Abstrakt**

Práce se zabývá kvasinkovými priony a jejich biologickým vlivem na kvasinky. Definuje základní znaky kvasinkových prionů, kterými se odlišují od ostatních proteinů. Práce seznamuje čtenáře s různými možnostmi vzniku prionů, jejich propagace a s konkrétními typy kvasinkových prionů, kde také popisuje funkce u nejprostudovanějších typů prionů. Zaměřuje se také na chaperony, které ovlivňují stav kvasinkových prionů v buňkách. Nahlíží na možnost podobnosti kvasinkových prionů a savčích prionů spojených s neurodegenerativními onemocněními.

**Klíčová slova:** Kvasinkové priony, znaky kvasinkových prionů, chaperony, neurodegenerativní onemocnění, *Saccharomyces cerevisiae*

The thesis describes yeast prions and their biological effects on yeast in general. It defines the basic characteristics of yeast prions, that distinguish prions from other proteins. The thesis introduces various possibilities of prion formation, and propagation as well as specific types of yeast prions, including various functions of most studied types of prions. The thesis also focuses on chaperones that affect the state of yeast prions in cells. Lastly, the thesis indicates similarities between yeast prions and mammalian prions that are related to neurodegenerative diseases.

**Key words:** Yeast prions, features of yeast prions, chaperones, neurodegenerative disease, *Saccharomyces cerevisiae*

## Úvod

Priony jsou zajímavé proteinové útvary, které se podílejí na různých molekulárních dějích u živočichů. Jsou to často procesy, kterým stále pořádně nerozumíme. Priony jsou známé u různých organismů, mezi které patří kvasinky, savci anebo i houby. I přes velké podobnosti jsou mezi priony různých organismů značné rozdíly ve funkcích. U člověka a dalších savců jsou priony spojené s neurodegenerativními onemocněními, jako je například bovinní spongiformní encefalopatie, kterou známe pod zkratkou BSE a mezi lidmi je známá jako nemoc šílených krav. Toto onemocnění se u člověka nazývá Creutzfeldt-Jakobova choroba. Většina těchto onemocnění končí smrtí. (Aguzzi et al., 2008; Prusiner, 1997)

Abychom nezískali dojem, že jsou priony pouze nebezpečné „šílené“ proteiny, které zabíjejí savce, musíme se zaměřit i na priony u jiných organismů. Pokud se podíváme na kvasinkové priony, tak v jejich případech jsou toxické projevy minimální. Dokonce většina kvasinkových prionů může být pro danou kvasinku výhodou ať už pro její přežívání v určitém prostředí či pro jiné funkce. Ve své práci se budu dále zabývat právě hlavně kvasinkovými priony a pokusím se ukázat rozdílné funkce těchto prionů ve srovnání s nebezpečnými savčími priony. Priony se také vyskytují u hub rodu *Podospora*, kterým priony napomáhají přizpůsobit se změnám v prostředí.

## **1. Kapitola: Znaky kvasinkových prionů**

Priony jsou přenosné proteiny, které se mohou buňkou efektivně šířit. Jejich zajímavostí je, že se dědí nemendelisticky (Aigle and Lacroute, 1975). Jedná se o normální buněčné proteiny, které buď ztratily nějakou funkci, nebo se jejich funkce pozměnila. Důležité je, že tyto proteiny jsou samy o sobě schopny změnit „normální“ (zdravou, neprionovou) formu proteinů. V podstatě navázáním prionu se změní normální zdravý protein v nový prion, čímž postupně stále více molekul daného proteinu v buňce získává prionové znaky. Toto v roce 1994 popsal Wickner ve své práci o prionu [URE3] (viz 2. Kapitola) (Wickner, 1994). Z hlediska nomenklatury se všechny priony uvádějí ve stejném formátu jako [PRION], což značí jejich dominantní, nemendelistické vlastnosti.

### **1.1. Základní znaky kvasinkových prionů**

Jak se dá vlastně takový prion poznat, to je otázka, na kterou možná neexistuje přesná odpověď. Základních znaků prionů je více a jsou důležité k dalšímu pochopení vlastností jednotlivých prionů (viz Tab. 1.). Priony dokáží tvořit takzvaný infekční stav amyloid, což je protein, který se nachází ve vláknité formě a obsahuje velký podíl beta-listů v křížové beta konformaci. Tato konformace je rezistentní proti proteázám (Kirschner et al., 2000). Amyloidy se v buňce ukládají extracelulárně, ale i intracelulárně (Westermarck et al., 2002). Dnes je známo sedm kvasinkových prionů, které navozují stav amyloidu. Všechny mají oblasti nazvané prionové domény (PrDs), které jsou bohaté na glutamin a asparagin („QN-rich domains“) (DePace et al., 1998). Tyto QN-bohaté oblasti napomáhají k shlukování jednotlivých prionových agregátů. Oproti kvasinkovým prionům neurodegenerativní savčí priony jsou naopak chudé na asparagin a glutamin, takže využívají jiné mechanismy ke své propagaci (Sherman, 2004). Bez prionové domény nemůže vzniknout prionový stav, proto je PrDs jedním z hlavních znaků prionů. PrDs dokáží navodit formování prionového stavu a také jsou potřebné k jeho propagaci. PrDs udrží prionový stav i bez zbytku proteinu (viz 3. Kapitola) (Ross et al., 2005).

<i>Prion</i>	[PSI <sup>+</sup> ]	[PIN <sup>+</sup> ]/[RNQ <sup>+</sup> ]	[URE3]	[SWI <sup>+</sup> ]	[MOT3]	[ISP <sup>+</sup> ]	[OCT <sup>+</sup> ]
<i>Protein</i>	Sup35	Rnq1	Ure2	Swi1	Mot3	Sfp1	Cyc8
<i>Fenotyp prionu</i>	Ztráta funkce	Funkce navíc	Ztráta funkce	Ztráta funkce	Ztráta funkce	Funkce navíc	Ztráta funkce
<i>Tvorba amyloidu</i>	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	-	-
<i>QN-rich doména</i>	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano
<i>Vznik zvýšenou expresí proteinu</i>	Ano	-	Ano	-	Ano	Ano	Ano
<i>Známé prionové varianty</i>	Ano	Ano	Ano	-	-	-	-
<i>Výskyt v přírodě</i>	Ne	Ano	Ne	-	-	-	-

Tab. 1. Tabulka vlastností prionů. Nevyplněné políčko znamená, že vlastnost nebyla prokázána, převzato z (Liebman and Chernoff, 2012)

Amyloid je tedy jakousi infekční variantou prionu. U kvasinkových prionů byly amyloidy poprvé studovány u nejpopsanějšího prionu [PSI<sup>+</sup>]. U tohoto prionu byly nalezeny různé dědičné varianty. (Derkatch et al., 1996). Tyto varianty jsou hodně podobné savčím prionovým variantám, ale na rozdíl od nich vznikají jiným způsobem. Různé varianty se liší poměrem nahromaděných prionových a neprionových agregátů, ze kterých poté priony vznikají a rostou. Na základě tohoto poměru pak vznikají „silné“ a „slabé“ formy prionu (Derkatch et al., 1999; Uptain et al., 2001). Při množení buněk může docházet k tomu, že každá obsahuje jiné varianty prionů. Ta varianta, která se dokáže rychleji replikovat, se může rychleji dostat do další populace a v ní stabilizovat. Stabilní varianta se stane neměnnou a dědí se do dalších populací (Bradley et al., 2002; Derkatch et al., 1996).

Existují také pravidla, která odlišují priony od ostatních replikonů, jako jsou například savčí viry a s těmito pravidly souvisí i vznik prionů. Priony mohou být takzvaně odléčeny (tj. prion z buňky zmizí), ale zároveň se může prion v této buňce objevit znovu de novo. Může tedy dojít k tomu, že buňka, pro kterou je za určité situace přítomnost prionu výhodná, dokáže sama měnit „stav prionu“ podle změn např. stresových situací do kterých se dostává. Navíc pokud dojde k zvýšené expresi daného normálního proteinu, tak může častěji docházet ke vzniku „abnormálních“ prionových proteinů (Chernoff et al., 1993). Priony buňku ovlivňují

svou přítomností a tím dochází k projevu určitého fenotypu. Tohoto fenotypu lze také dosáhnout delecí genu kódujícího protein, který je potřebný pro vznik prionu (Wickner, 1994).

## **1.2. Vznik prionů de novo**

### **1.2.1. Vznik prionů spojený se zvýšenou expresí daného proteinu**

Zvýšená exprese daného proteinu zvyšuje pravděpodobnost vzniku prionů, přestože k tomuto procesu nemusí vždy dojít. Přitom nemusí být exprimován celý protein, ale i přechodně zvýšenou expresí samotných PrDs je šance na vznik prionů de novo ještě větší než pokud dojde k zvýšené expresi celých proteinů. De novo vznik prionů zvýšenou expresí daného proteinu je spojen s různými nekontrolovatelnými změnami proteinu a v chaperonech, které jinak napomáhají správnému sbalení a vzniku proteinu. Při zvýšené expresi daného proteinu nemusí chaperony stíhat správně sbalovat velké množství proteinů. Zároveň díky větší koncentraci mohou špatně sbalené proteiny unikat degradačním systémům. Je také větší možnost, že se při těchto koncentracích lépe shlukují monomery potřebné ke vzniku prionu (viz 3. Kapitola) (Derkatch et al., 1996; Chernoff et al., 1993; Wickner, 1994).

### **1.2.2. Další faktory ovlivňující vznik prionů de novo**

Zvýšená exprese nemusí být dostatečná pro vznik prionu de novo. Často jsou k tomu potřebné ještě další faktory jako třeba přítomnost dalšího prionu či jeho části, která dokáže vznik nového prionu ovlivnit. K takovým prionům patří [PIN<sup>+</sup>], který se také jinak označuje [RNQ<sup>+</sup>], protože vzniká z proteinu Rnq1p (viz 2. Kapitola) (Derkatch et al., 2001; Treusch and Lindquist, 2012). Tento prion zvyšuje svou přítomností pravděpodobnost vzniku jiných prionů jako je nejprozkoumanější [PSI<sup>+</sup>] nebo [URE3] (Bradley et al., 2002; Derkatch et al., 2001). Dále také ovlivňuje vznik prionů u zástupce hub *Podospora* (Taneja et al., 2007).

[PIN<sup>+</sup>] se podílí na takzvaném „cross-seeding“ u [PSI<sup>+</sup>]. Neboli pravděpodobně dokáže odstranit z buňky faktory, které zabraňují tvorbě prionu [PSI<sup>+</sup>]. Dále zde vznikne tzv. iniciační jádro, které je důležité pro „cross-seeding“ a vznik prionu [PSI<sup>+</sup>] de novo z heterologních Sup35p QN-rich proteinů (Derkatch et al., 2001). Existují také modely, které navozují cross-



seeding jiným způsobem. Vyčištěné Rnq1p PrDs vytvářejí infekční vlákna in vitro. Tato vlákna navozují vznik vláken u Sup35p a tím i vznik prionu (Vitrenko et al., 2007a). U bakterií takto vznikají za přítomnosti amyloidu další amyloidy (Garrity et al., 2010).

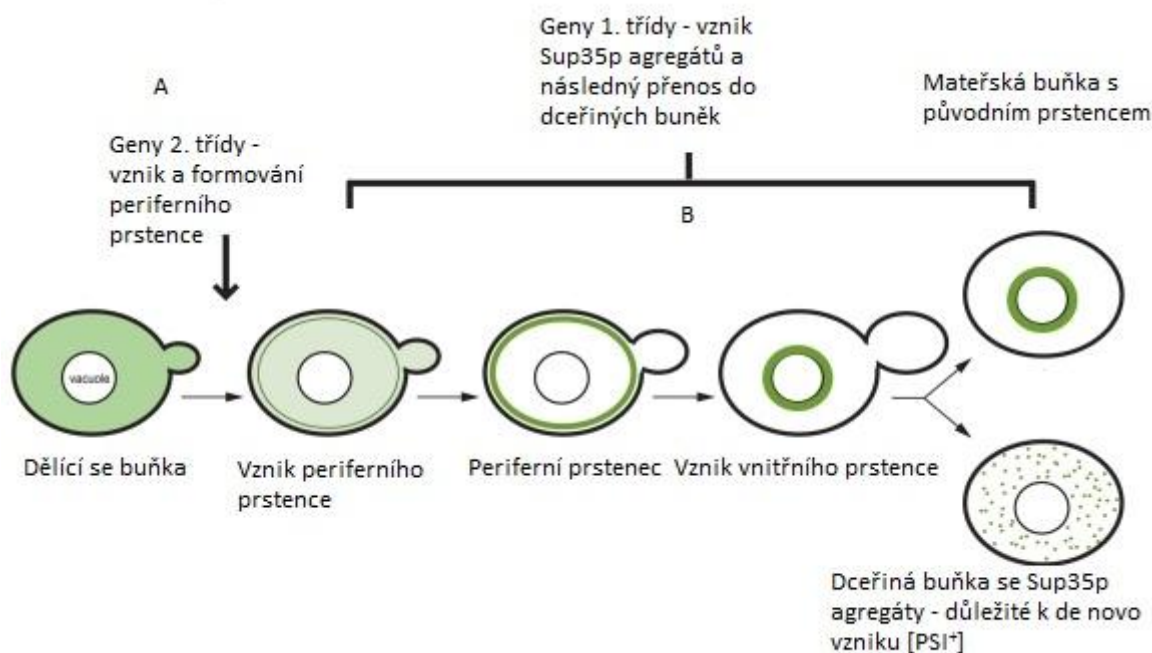
Spontánní de novo vznik prionů je specifický pro každý druh prionu a závisí hodně i na okolním prostředí. Již zmíněný [PIN<sup>+</sup>], který ovlivňuje vznik [PSI<sup>+</sup>] pomocí cross-seeding, má také vliv na spontánní vznik [PSI<sup>+</sup>] (Derkatch et al., 2001; Derkatch et al., 2000; Derkatch et al., 1997; Derkatch et al., 1996). Spontánní vznik [PSI<sup>+</sup>] se vyskytuje s mírou  $5,8-7,1 \times 10^{-7}$  za generaci, přičemž spontánní vznik nezávisí na přítomnosti [PIN<sup>+</sup>] (Allen et al., 2007; Lancaster et al., 2010). Spontánní vznik prionů závisí hlavně na prostředí, např. pokud je buňka vystavena déle nějakému stresu jako je chlad, byl pozorován spontánní vznik prionu [URE3]. I u [PSI<sup>+</sup>] či [PIN<sup>+</sup>] byl pozorován spontánní vznik těchto prionů jako reakce na delší stresové změny. Při stresových situacích může záležet na počtu špatně sbalených proteinů či změn u množství Hsp proteinů (chaperonů), které kontrolují správné sbalování a vznik proteinů (Derkatch et al., 2000).

Mohlo by se zdát, že prion [PIN<sup>+</sup>] patří mezi nejdůležitější faktory hrající roli při vzniku prionů de novo. Velmi důležité však mohou být právě i chaperony. Není zcela jasné, jakým způsobem ovlivňují vznik prionů, ale jejich mutacemi může docházet k tomu, že se buď zvyšuje, nebo snižuje pravděpodobnost vzniku prionu, např. takzvaných „silných“ a „slabých“ variant, které se liší v pravděpodobnosti udržení prionového stavu (Park et al., 2006). Chaperony mohou ovlivňovat de novo vznik prionů i pomocí změn, které se dějí v nich (např. změny podjednotek chaperonů). Procesy, které vedou k de novo vzniku prionů spojené se chaperony jsou však často závislé na přítomnosti [PIN<sup>+</sup>]. Ani chaperony tedy nejsou úplně samostatnými spouštěči de novo vzniku prionů (viz 3. Kapitola) (Chernoff et al., 1999; Kryndushkin et al., 2011).

Zcela samostatně mohou ovlivnit de novo vznik prionů změny v ubiquitinovém systému. Ubiquitin - proteasomový systém je známý pro svůj důležitý podíl na degradaci špatně sbalených či nefungujících proteinů. U de novo vzniku nejznámějšího prionu [PSI<sup>+</sup>] hrají změny v tomto systému významnou roli. Například při delecii genu UBC4 kódujícího enzymy důležité pro správnou funkci ubiquitinového systému, dochází v buňce k velkým změnám. Chaperony Hsp104p, které svou zvýšenou expresí mohou odstraňovat přebytečné

priony [PSI<sup>+</sup>], jsou v odléčování neefektivní, neboť dochází díky deleci genu UBC4 k resistenci [PSI<sup>+</sup>] proti odléčovací schopnosti Hsp104p a výsledkem je formování [PSI<sup>+</sup>] de novo. Žádný ze zmíněných procesů není závislý na prionu [PIN<sup>+</sup>], ale důležitá je přítomnost neprionového stavu Rnq1p (Allen et al., 2007).

De novo vznik a předávání prionů pomocí zvýšené exprese Sup35p do dceřiných buněk mohou být ovlivněny mutacemi v genech aktinového cytoskeletu při dělení buňky (Obr. 1). Při dělení buňky vzniká Sup35p aktinový iniciační periferní prsteneček a také vnitřní Sup35p prsteneček. Tyto prstence jsou kódovány geny, jejichž delece lze zastavit formování prionu při dělení do dceřiných buněk. Do těchto procesů jsou zapojeny dvě třídy aktinových genů, mezi geny pro aktinové proteiny 1. třídy patří např. *Bug1*, *Bem1*, *Arf1* a mezi geny 2. třídy patří třeba *Las17*, *Vps5*. Geny pro aktinové proteiny 1. třídy jsou zodpovědné za přenos Sup35p agregátů a vznik [PSI<sup>+</sup>] de novo v dceřiných buňkách z mateřských buněk s již vzniklými prstenci (Obr. 1, B). Geny pro aktinové proteiny 2. třídy jsou důležité pro samotný vznik prstenců, jejich delece dochází k chybám v tvorbě a formování prstenců (Obr. 1, A). Rozdíl mezi těmito procesy je takový, že delece v 2. třídě pouze redukuje nebo zastavuje vznik prionu a prstence. Zato delece v 1. třídě zvyšuje toxicitu a u savčích prionů je tato delece spojovaná s Huntingtonovou chorobou (Manogaran et al., 2011).



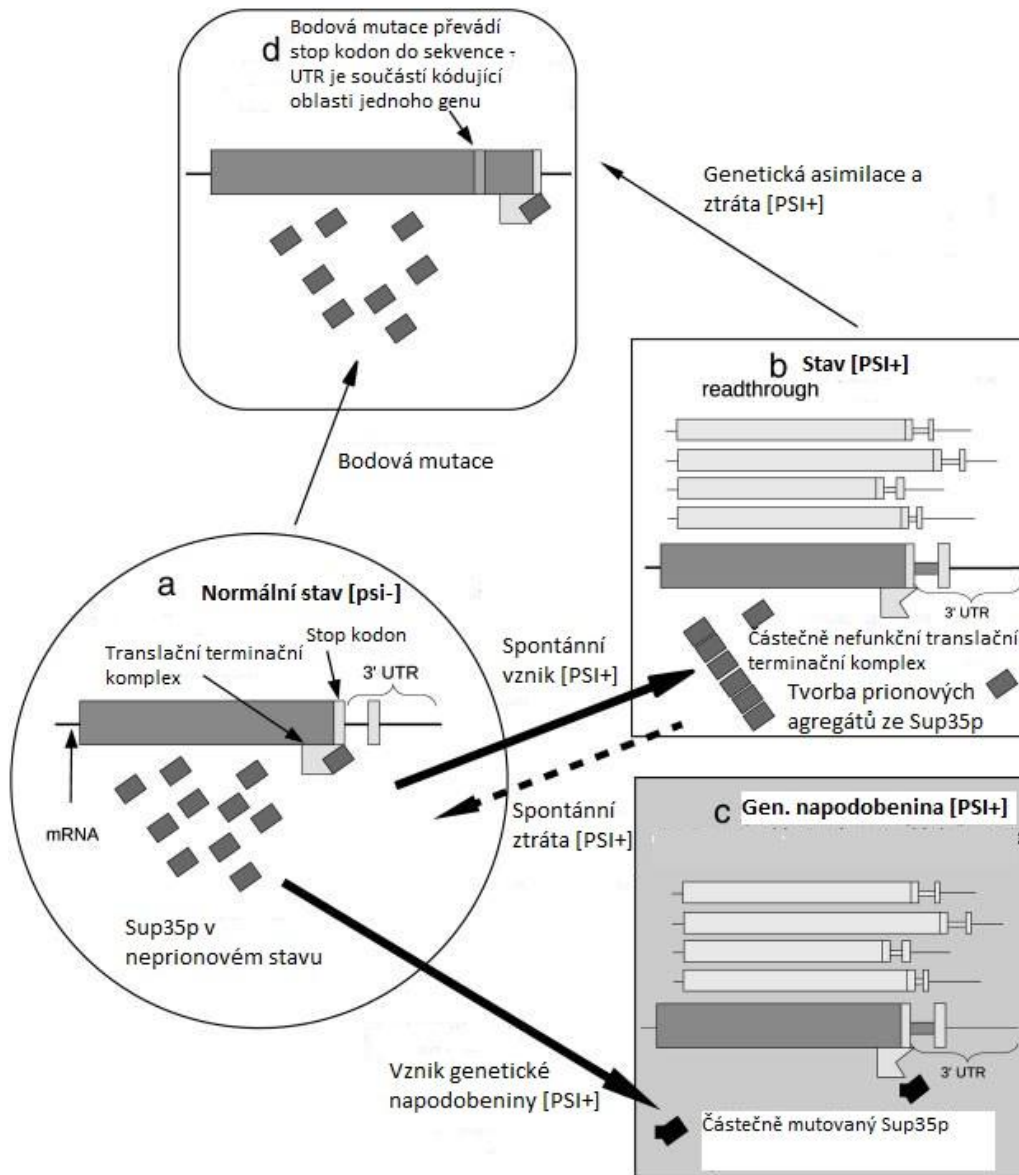
Obr. 1 – Vznik [PSI<sup>+</sup>] de novo při dělení buňky. Převzato z (Manogaran et al., 2011)

## 2. Kapitola: Typy kvasinkových prionů

V této kapitole se budu zabývat jednotlivými typy kvasinkových prionů. Zaměřím se detailněji na [PSI<sup>+</sup>], [URE3] a také na [PIN<sup>+</sup>] a v krátkosti i na další méně známé priony, jako je zvláštní [GAR<sup>+</sup>], [MOT3<sup>+</sup>], [SWI<sup>+</sup>] a [ISP<sup>+</sup>] a rovněž i prion hub [Het-s], který se vyskytuje u *Podospora anserina*.

### 2.1. Neznámější kvasinkový prion [PSI<sup>+</sup>]

[PSI<sup>+</sup>] patří mezi neznámější a nejprozkoumanější priony kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a je odvozen od translačního terminačního faktoru Sup35p. Prionový stav [PSI<sup>+</sup>] je vlastně epigenetickým modifikátorem přesnosti translačního terminačního faktoru. [PSI<sup>+</sup>] dokáže vytvářet různé fenotypové varianty, kterými reaguje na změny v prostředí, kde se kvasinkový kmen vyskytuje (True and Lindquist, 2000). [PSI<sup>+</sup>] je tedy výhodný faktor pro *Saccharomyces cerevisiae*, ale ne z dlouhodobého hlediska, vzhledem ke změnám prostředí, kdy se prion [PSI<sup>+</sup>] může stát i nevýhodným. Může tak vzniknout opačný vliv prionu, kdy může dojít i k buněčné smrti. Ovšem reakce na kratší a i agresivní změny prostředí dokáže buňka dobře ustát. Buňky díky [PSI<sup>+</sup>] dokážou krátkodobě dobře růst například za přítomnosti antibiotik nebo kovů, které jsou bez prionu [PSI<sup>+</sup>] pro buňky toxické. Buňky mohou přepínat Sup35p na prionový stav zcela náhodně. Různé varianty [PSI<sup>+</sup>] jsou vyvolány mutacemi a dělí se na tři typy (Obr. 2). Může jít o klasický typ [PSI<sup>+</sup>] s alternativním čtením stop kodonu (b, „read through“), o genetickou napodobeninu [PSI<sup>+</sup>] (c) a bodovou mutaci ve stop kodonu (d). Na obrázku „a“ je normální neprionový stav, ze kterého mohou všechny ostatní varianty vznikat (Lancaster et al., 2010). Mutace samozřejmě ovlivňují Sup35p, který při takových změnách nemusí správně fungovat (Eaglestone et al., 1999). Nevýhodou může být, že se priony mohou ztrácet během buněčného dělení (Cox et al., 1980).



Obr. 2 - Varianty [PSI<sup>+</sup>]. Převzato z (Lancaster et al., 2010)

Díky změnám v prostředí je stav [PSI<sup>+</sup>] spíš krátkodobý a dlouhodobě s ním buňky růst nebudou. V běžném normálním prostředí je výhodný neprionový stav nebo také [psi<sup>-</sup>]. Souvisí to se změnami v životních procesech buňky, které priony ovlivňují, jako například využití jiných zdrojů živin atd. Proto při měnícím se prostředí na normální, kdy mají buňky navozen stav [PSI<sup>+</sup>], přežijí pouze ty, které stav spontánně změny na [psi<sup>-</sup>] (Eaglestone et al., 1999; Lancaster et al., 2010).

## **2.2. Prion [URE3]**

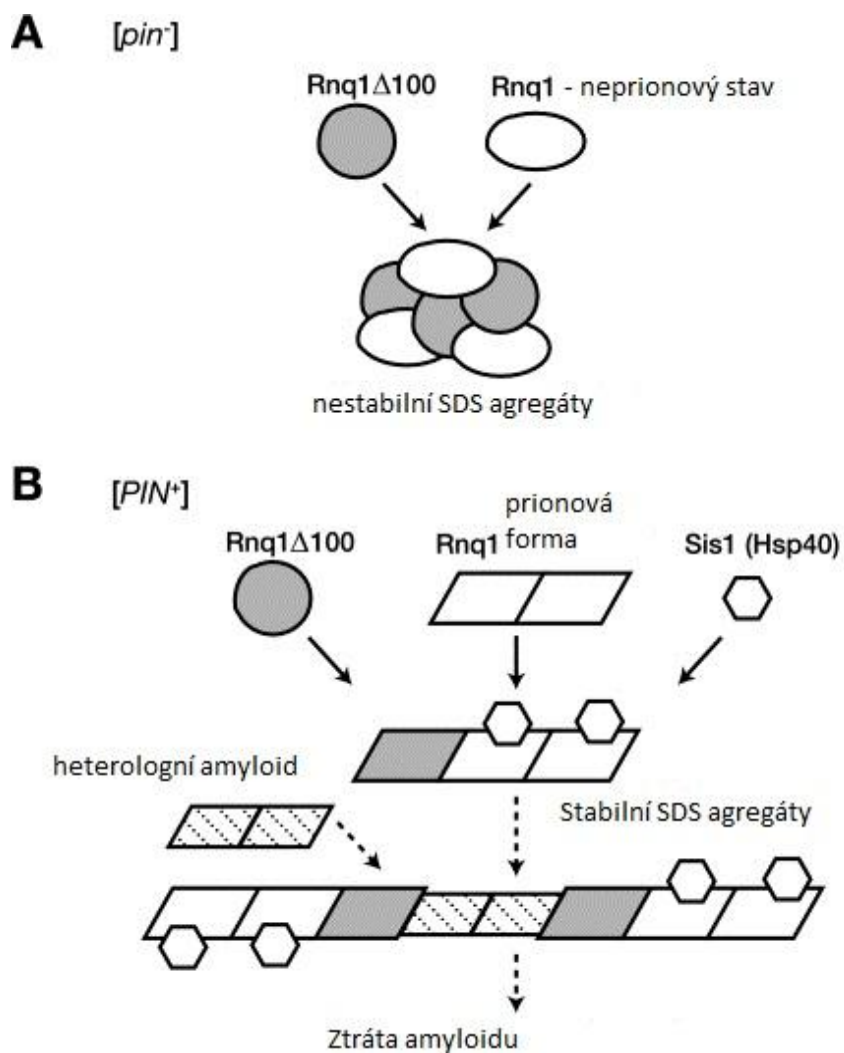
[PSI<sup>+</sup>] není jediný dobře popsáný a známý kvasinkový prion. [URE3] byl poprvé popsán v roce 1971 jako buněčný fenotyp, který je děděný nemendelistickým způsobem. Ovšem zpočátku nebyl popsán v souvislosti s prionovým stavem a už vůbec nebyl spojován s nějakým proteinem (Lacroute, 1971). Po 20 letech bylo na základě nových poznatků rozhodnuto, že se jedná o prionový stav proteinu Ure2p a že jde o inaktivovaný stav tohoto proteinu. Pro [URE3] tak vznikla určitá kritéria, zhodnocující, že jde o prion. Prvním kritériem je, že prionový stav [URE3] je možné odstranit odláčením pomocí růstu buněk na milimolárních koncentracích guanidinu. Po odláčení se však může spontánně fenotyp [URE3] vrátit a to se stejnou frekvencí, která se vyskytuje u neléčených buněk. Dále pokud dochází k zvýšené expresi Ure2p, je možné, že se [URE3] opět spontánně objeví ve vysokých frekvencích. Poslední je podobnost prionového stavu [URE3] s mutantním Ure2p (deletant ure2 $\Delta$ ), respektive jsou si tyto dva stavy buněk velmi fenotypově podobné (Wickner, 1994). Tyto údaje poskytly některé poznatky o základních znacích prionů, bohužel jak už jsem předesílal v předchozí kapitole, všechny základní znaky nelze přesně určit, protože jednotlivé typy prionů se liší. Přesto priony [URE3] a [PSI<sup>+</sup>] si jsou v řadě znaků podobné.

Ure2p je regulátor v metabolismu dusíku. Prionový stav [URE3] je opět pro buňky výhodný v určitých podmínkách. Respektive tam, kde je prostředí chudé na dusík. S prionem [URE3] jsou buňky schopny vychytávat tento vzácný dusík a využívat ho ve svém metabolismu. U kvasinek se zdá, že tento fenotyp a stav je výhodný například při kvašení vína. Buňky s [URE3] dokáží lépe růst než buňky bez prionu (Shorter and Lindquist, 2005). Podobností mezi priony [URE3] a [PSI<sup>+</sup>] je více. Například oba mají částečnou rezistenci k proteináze K (Masison and Wickner, 1995; Patino et al., 1996). Zajímavé také je, že oba priony jsou závislé na N-terminální prionové doméně, která je pro normální stav Ure2p a Sup35p nepotřebná (Masison and Wickner, 1995; Ter-Avanesyan et al., 1994). Prionová doména obsahuje větší množství polárních nenabitých aminokyselin. Zde se nejedná pouze o asparagin a glutamin, které jsou u kvasinkových prionů v PrDs nejdůležitější vzhledem k jejich funkci v propagaci prionů, jak jsem popisoval v první kapitole (DePace et al., 1998). Jedná se o prvních 65 aminokyselin v sekvenci domény, které jsou důležité pro správnou funkci prionu [URE3] (Masison and Wickner, 1995). Prionová doména u [URE3], takzvaná UDP, je schopná

kromě vlastní agregace také sbalovat další připojené sekvence. UDP dokáže sama vytvářet amyloidní infekční vlákna (Schlumpberger et al., 2000).

### **2.3. [PIN<sup>+</sup>] jako prion, který je důležitý pro ostatní priony**

[PIN<sup>+</sup>] neboli [RNQ<sup>+</sup>] je velmi zajímavý prion, o kterém jsem se již zmínil v první kapitole o vzniku prionů. [PIN<sup>+</sup>] velmi ovlivňuje výskyt a vznik ostatních prionů jako je například [PSI<sup>+</sup>], ale i [URE3] (Shorter and Lindquist, 2005). Protein Rnq1p, ze kterého [PIN<sup>+</sup>] vzniká, nemá známé žádné speciální funkce kromě toho, že tvoří amyloidní prion [PIN<sup>+</sup>]/[RNQ<sup>+</sup>], který podporuje u ostatních prionů jejich amyloidní stav, ten může vzniknout z rozpustného neinfekčního stavu (Derkatch et al., 2000). Zvláštní je, že N-terminální doména proteinu Rnq1p nemá bohaté oblasti na asparagin a glutamin jako většina ostatních kvasinkových prionů. Tím pádem se jedná o neprionovou doménu, která není schopna udržet prionový stav. K tomu je pravděpodobně uzpůsobena C-terminální doména, která je na asparagin a glutamin dostatečně bohatá a dokáže udržet stav [PIN<sup>+</sup>] (Vitrenko et al., 2007a; Vitrenko et al., 2007b). Otázkou tedy zůstává, k čemu slouží N-terminální doména proteinu Rnq1p. Zdálo by se, že je pro prion zcela nepotřebná, ale opak je pravdou. Bylo zjištěno, že se N-terminální doména podílí na tom, aby prion [PIN<sup>+</sup>] správně fungoval. Tato doména se jmenuje Rnq1Δ100 a potlačuje udržování jiných prionů. Dokonce ovlivňuje i polyQ agregáty z proteinu huntingtin, který způsobuje Huntingtinovu chorobu u savců. Oproti tomu C-terminální doména, která obsahuje části bohaté na asparagin a glutamin, má některé oblasti potřebné k eliminaci [PSI<sup>+</sup>], ale i některé nutné k jeho udržení. Eliminační schopnost tedy převzala spíše N-terminální neprionová doména a ta spolu s C-terminální doménou ovlivňuje stavy ostatních prionů. Protein Rnq1p má tedy vliv na široké spektrum jiných prionů (Kurahashi et al., 2008). Ovlivnění pomocí těchto domén Rnq1p závisí na prionovém či neprionovém stavu [PIN<sup>+</sup>] a [pin<sup>-</sup>] v buňce (Obr. 3). Pokud se jedná o buňku, která obsahuje [pin<sup>-</sup>], tak se obě domény vážou na prion, tím ho destabilizují, zastaví jeho růst a může dojít až ke ztrátě prionu. Vznikají tak nestabilní SDS agregáty (Obr. 3, A). Jinak je to u buněk s [PIN<sup>+</sup>], kde je prionová doména Rnq1p. Zde doména Rnq1Δ100 kooperuje s amyloidem Rnq1p a Sis1p (chaperon), naopak od prvního příkladu vznikají stabilní SDS agregáty a dochází ke ztrátě amyloidu (Obr. 3, B) (Kurahashi et al., 2008).



Obr. 3 - Efekt Rnq1 $\Delta$ 100 na  $[PIN^+]$  a  $[pin^-]$  buňky. Převzato od (Kurahashi et al., 2008)

$[PIN^+]$  tedy indukuje de novo vznik některých prionů, jako je například  $[PSI^+]$ , ale již existující prion destabilizuje a eliminuje. Při indukci  $[PSI^+]$  pomocí  $[PIN^+]$  je destabilizační doména Rnq1 $\Delta$ 100 eliminována, jinak by nemohlo docházet ani k indukci. Zajímavostí tedy je, jestli a jak se vlastně Rnq1 $\Delta$ 100 předává do nově indukovaných prionů  $[PSI^+]$  (Kurahashi et al., 2009). Bylo také zjištěno, že téměř každý kvasinkový kmen obsahuje prion  $[PSI^+]$  a to v různých formách (Manogaran et al., 2010).

## **2.4. Ostatní kvasinkové priony**

Kromě výše uvedených existují i další známé, ale i méně popsané kvasinkové priony. Mezi ně patří například [MOT3<sup>+</sup>], [SWI<sup>+</sup>], [ISP<sup>+</sup>], [OCT<sup>+</sup>] a pro úplnost se zaměřím i na [GAR<sup>+</sup>] a [Het-s], což je prion hub.

[MOT3<sup>+</sup>] je prionovým stavem proteinu Mot3p. Tento protein je pro kvasinky docela významný, protože se jedná o transkripční faktor, který je důležitý pro stavbu buněčné stěny a určité signalizace (Abramova et al., 2001). Prionový stav [MOT3<sup>+</sup>] může být pro buňku velmi výhodný právě z hlediska její buněčné stěny, neboť dokáže navodit rezistenci proti stresům, které na buněčnou stěnu mohou působit. Tato vlastnost je výhodná v prostředích, kde by buňka mohla být něčím narušena, či zničena. Důležité také je, že frekvence výskytu [MOT3<sup>+</sup>] je v buňkách hodně vysoká (Alberti et al., 2009).

Dalšími známými priony kvasinek jsou [SWI<sup>+</sup>] a [OCT<sup>+</sup>]. [SWI<sup>+</sup>] je prionem proteinu Swi1p, který je stejně jako protein Cyc8p transkripčním regulátorem. Cyc8p může tvořit prionový stav [OCT<sup>+</sup>] (Du et al., 2008; Patel et al., 2009). [SWI<sup>+</sup>] ztratil určité vlastnosti, které má transkripční regulátor Swi1p. Je také schopný tvořit amyloid a díky tomu se projevuje jako infekční. Tento stav mění využití zdroje uhlíku (Du et al., 2008). [OCT<sup>+</sup>] má podobné účinky, neboť jakékoliv mutace v Cyc8p ovlivňují růst, flokulaci, sporulaci či dělení buňky (Patel et al., 2009). Priony [OCT<sup>+</sup>] a [SWI<sup>+</sup>] spolu mohou interagovat a vyvolávat řadu různých změn, hrají roli v remodelaci chromatinu, kdy ovlivňují stabilitu a změny v chromatinu. Mají také roli v regulacích dalších genů (Fleming and Pennings, 2001; Gavin and Simpson, 1997).

Prion [ISP<sup>+</sup>] je úzce spjat s již dobře popsaným prionem [PSI<sup>+</sup>]. [ISP<sup>+</sup>] snižuje supresorové účinky v mutovaném genu pro protein Sup35p, který je důležitý pro vznik [PSI<sup>+</sup>]. Jedná se o samostatný nový prion, ale podle některých poznatků by prion [ISP<sup>+</sup>] mohl být jinou formou [PSI<sup>+</sup>]. Tuto možnost však vylučuje fakt, že [ISP<sup>+</sup>] není závislý na N-terminální doméně Sup35p, a tak pravděpodobně nemá s [PSI<sup>+</sup>] nic společného. Na druhou stranu některé poznatky zpochybňují to, jestli je [ISP<sup>+</sup>] vůbec prionem. Některé priony jsou například závislé při své propagaci na chaperonu Hsp104p, ale prion [ISP<sup>+</sup>] není na tomto chaperonu vůbec závislý. Prion [ISP<sup>+</sup>] zřejmě ovlivňuje kontrolu přesnosti translace (Volkov et al., 2002).

Dalším kvasinkovým prionem je [GAR<sup>+</sup>]. Jedná se o velmi zajímavý a poněkud neobvyklý prion. [GAR<sup>+</sup>] má v podstatě základní znaky prionů. Jedná se o prion, který se dědí



nemendelisticky, je dominantní podobně jako ostatní priony, může být přenášen přes cytoplazmatickou membránu a jeho přítomnost v buňce je závislá na chaperonech. V podstatě tyto vlastnosti potvrzují prionový stav [GAR<sup>+</sup>]. Na rozdíl od jiných prionů je však [GAR<sup>+</sup>] zřejmě složen z membránové protonové pumpy Pma1p a glukózového signálního faktoru Std1p. Je tedy složen ze dvou součástí, které ovlivňují svojí přechodnou zvýšenou expresí vznik prionu [GAR<sup>+</sup>]. Přitom musí být přítomny obě součásti, jinak [GAR<sup>+</sup>] nevznikne. [GAR<sup>+</sup>] se podílí na signalizaci glukózy, díky [GAR<sup>+</sup>] je buňka také schopná vylučovat uhlík z jiných zdrojů (Brown and Lindquist, 2009).

Zajímavým prionem je i prion [Het-s], který se vyskytuje u hub. Najdeme ho u plísni rodu *Podospora anserina*, které patří mezi vřeckovýtrusné houby. Geny *Het* jsou důležité, protože při výměně cytoplazmy a splývání hyf *Podospora* by za určitých okolností mezi různými kmeny mohlo docházet i k výměně virů či infekcí. Výměny tedy probíhají jen u kolonií se stejnými *Het* geny. Proto se prion [Het-s] podílí u *Podospora* na vegetativní inkompatibilitě, kdy dochází k buněčné smrti při fúzi geneticky rozdílných kmenů *Podospora* a tím pádem tento jev zabraňuje šíření infekce mezi koloniemi. Existují tedy různé varianty [Het-s] (Coustou et al., 1997; Saupe, 2011). Zajímavé je, že při pokusech, kdy se prionové varianty [Het-s] předaly do kvasinek, docházelo k tvorbě amyloidů, i když funkce byla trochu jiná než přímo u rodu *Podospora* (Taneja et al., 2007).

### **3. Kapitola: Chaperony ovlivňující kvasinkové priony**

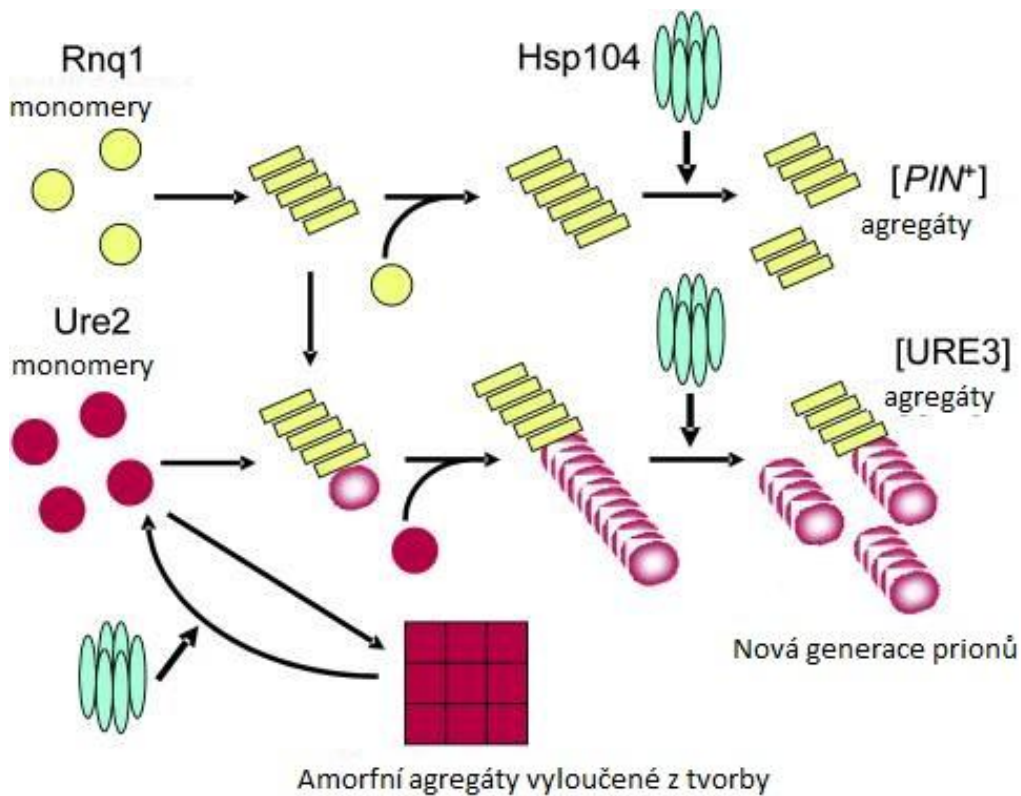
Již v předchozích kapitolách jsem se zmínil, že různé chaperony ovlivňují priony, aby mohly fungovat a udržet se ve svém prionovém stavu. V této kapitole se zaměřím speciálně na chaperon Hsp104p, který je pro priony jedním z hlavních ovlivňujících činitelů. Nakonec ještě zmíním i působení některých jiných chaperonů.

#### **3.1. Chaperon Hsp104p a jeho vliv na kvasinkové priony**

Hsp104p patří k hlavním faktorům, které ovlivňují priony, jak lze dokumentovat na příkladu nejprozkoumanějšího kvasinkového prionu [PSI<sup>+</sup>]. [PSI<sup>+</sup>] je při svém vzniku často ovlivňován dalším prionem [PIN<sup>+</sup>] (viz 1. Kapitola). Ovšem k jeho propagaci to nestačí. Dalším důležitým faktorem propagace [PSI<sup>+</sup>] je právě chaperon Hsp104p. Bez tohoto chaperonu se prion [PSI<sup>+</sup>] není schopen udržet. Například nadprodukce či ztráta Hsp104p je pro prion fatální a neudrží svůj stav, obě možnosti jsou vysvětlené níže. Tak bylo zjištěno, že Hsp104p patří mezi důležité faktory, ovlivňující priony (Chernoff et al., 1995). Způsob, kterým Hsp104p ovlivňuje propagaci [PSI<sup>+</sup>] a dalších prionů, je hlavně v takzvané fragmentaci (Obr. 4). Jedná se o mechanismus, kdy Hsp104p fragmentuje prionová vlákna na menší kousky, které jsou nezbytné pro zahájení další propagace prionu (Paushkin et al., 1996). Pokud je aktivita Hsp104p nižší a nedochází tak ke správné fragmentaci, vznikají velké prionové agregáty. To může být způsobeno nedostatkem Hsp104p nebo jeho ztrátou. Hsp104p pomáhá regulovat propagaci prionu tak, aby velké prionové agregáty nevznikaly. Při špatné funkci či nepřítomnosti Hsp104p nejsou schopny vznikající velké agregáty udržet prionový stav. Vysvětlení, proč nejsou velké agregáty schopné tvořit funkční priony, je následující. Za prvé v buňce dochází k hromadění velkých prionových agregátů a tím se zaplňuje celá buňka. Zaplňováním buňky velkými prionovými agregáty je znemožněna komunikace mezi buňkou a priony, a to i s těmi, které jsou jinak plně funkční. Vnitřní části velkých prionových agregátů mohou být poškozeny či změněny a to tím způsobem, že nejsou přístupné pro ostatní neprionové molekuly, které by s agregáty mohly za normálních podmínek spolupracovat a pomáhat prionům v jejich správné funkci. Proto se v buňce hromadí kromě velkých prionových agregátů také neprionové molekuly. Díky těmto procesům dochází k chybám

v přenosu prionů do dceřiných buněk (Wegrzyn et al., 2001). Buňky s velkými nekontrolovatelně rostoucími prionovými agregáty nejsou schopné tvořit další životaschopné buňky, dokonce může docházet k buněčné smrti či destrukci buněk (Zhou et al., 2001).

Vliv nadprodukce Hsp104p nebyl pozorován u všech prionů, dobře popsáný je u prionu [PSI<sup>+</sup>], který může být tímto mechanismem ovlivněn. Při nadprodukcí chaperonu Hsp104p dochází rovněž ke ztrátě [PSI<sup>+</sup>]. Jedná se opět pravděpodobně o vliv na stavbu prionových agregátů. Přebytečný Hsp104p priony drobí na monomery (Chernoff et al., 1995; Paushkin et al., 1996). Nadprodukce Hsp104p dokonce zabraňuje hromadění Sup35p monomerů a tím nemohou vznikat větší polymery, neboť svou nadprodukcí odstraňují možnost vzniku prionového stavu [PSI<sup>+</sup>]. Jde o takzvané odléčování prionu [PSI<sup>+</sup>] nadprodukcí chaperonu Hsp104p. Není však řečeno, že nadprodukce funguje pouze jedním směrem. Může se také stát, že nadprodukce Hsp104p přispívá ke zvětšování agregátů Sup35p, tím se však dostáváme do podobné situace jako při vzniku velkých prionových agregátů při špatné funkci Hsp104p. Vzniknou tak opět nefunkční velké priony (Derkatch et al., 1996). Dalším prionem, na který má Hsp104 vliv je [URE3]. Zde však nadprodukce funguje úplně jinak. Nadprodukce Hsp104p u [URE3] pouze mírně destabilizuje prion, dokonce má na některé varianty [URE3] opačný vliv. Zde se může stát, že určitým variantám [URE3] nadprodukce Hsp104p napomáhá k de novo vzniku nebo k jejich udržení. Celkově však k tomu, aby prion správně vzniknul a v buňce se udržel, je potřeba výše uvedená fragmentace prionových vláken, což je regulováno určitým správným množstvím Hsp104p (Kryndushkin et al., 2011).



Obr. 4 - Model vlivu Hsp104p na priony. Hsp104p fragmentací drobí jednotlivé amyloidy Ure2p a Rnq1p a tvoří agregáty k vzniku nových prionů. Mimoto odstraňuje amorfni Ure2p monomery. Převzato z (Kryndushkin et al., 2011)

### **3.2. Jiné chaperony ovlivňující kvasinkové priony**

Mezi další známé chaperony, které ovlivňují propagaci prionů, patří Hsp70p a Hsp40p (Rikhvanov et al., 2007). Hsp70p se dělí na menší podrodiny Ssap a Ssbp. Při nadprodukcí Ssap dochází k zvýšení fenotypové manifestace prionu [PSI<sup>+</sup>]. Pokud je Hsp104p v přebytku, tak nadprodukce Ssap potlačuje Hsp104p funkci odléčování prionů. Přebytké chaperony Ssap také umí indukovat k de novo vzniku [PSI<sup>+</sup>] prionů v buňkách, které jsou v neprionovém stavu [psi<sup>-</sup>]. Je k tomu potřeba pouze nadprodukce Sup35p (Allen et al., 2005). Při mutaci v genu pro Ssap je propagace [PSI<sup>+</sup>] omezená. Pokud je mutace v obou genech, tak k propagaci [PSI<sup>+</sup>] nemůže dojít vůbec (Jung et al., 2000). Ssbp je další podrodina chaperonů Hsp70p. Jejich efekt na propagaci prionů je částečně opačný než u Ssap. Když Ssap tvoří protiváhu Hsp104p, tak naopak přbytek Ssbp pomáhá k odléčování [PSI<sup>+</sup>] při nadprodukcí Hsp104p. Pokud dojde k delecí genů Ssbp, tak se odléčovací efekt Hsp104p na priony snižuje.

Může také docházet ke spontánnímu vzniku [PSI<sup>+</sup>]. Při nefunkčnosti Ssbp spontánní vznik [PSI<sup>+</sup>] nezávisí na nadprodukci Sup35p (Chernoff et al., 1999).

Další skupinou chaperonů, které také ovlivňují propagaci prionů, jsou chaperony Hsp40p. Tato skupina není stále ještě příliš u kvasinek prozkoumaná, proto neexistuje příliš informací o ovlivňování kvasinkových prionů pomocí Hsp40p. Mezi skupinu Hsp40p patří chaperon Ydj1p. Tento chaperon se podílí na propagaci prionu [URE3] a částečně i [PSI<sup>+</sup>] v případě svého přebytku a také kooperuje s Hsp104p či Hsp70p (Bradley et al., 2002; Moriyama et al., 2000). Druhý z této skupiny je chaperon Sis1p, který hraje roli v propagaci prionu [PIN<sup>+</sup>]. Je velmi důležitý pro udržení prionového stavu a pro dědivost [PIN<sup>+</sup>]. Během těchto procesů je Sis1p fyzicky propojen s Rnq1p, pokud se nachází právě v prionovém stavu. Sis1p má takzvanou G/F doménu, která je nezbytná k interakci s prionem a pro udržení [PIN<sup>+</sup>]. Tato doména má také svoji nevýhodu, neboť nepodporuje rychlý růst buněk. Na odléčování prionu [PIN<sup>+</sup>] se Sis1p ani Hsp104p nepodílí. Jediný způsob jak [PIN<sup>+</sup>] odléčit je delece genu pro Hsp104p, což je podobné u [URE3] (Sondheimer et al., 2001) a naprosto opačné oproti [PSI<sup>+</sup>], kde je k odléčení potřeba přebytek Hsp104p (Chernoff et al., 1995). Z výše uvedených informací vyplývá, že největší, i když různorodý, vliv na priony má vždy Hsp104p. Tento chaperon ovlivňuje i funkci ostatních rodin chaperonů. Otázkou však je, zda neexistují další důležité „vlivy“ ostatních rodin chaperonů na priony kvasinek, které zatím ještě neznáme.

## 4. Kapitola: Biologický vliv kvasinkových prionů

Z předešlých kapitol by se mohlo zdát, že kvasinkové priony jsou pro buňky spíše přínosem. Každý prion má nějaký vliv, který je benefitem v určitých změnách prostředí či stresových situacích. Již v úvodu jsem zmínil, že zde popíši kvasinkové priony jako právě ty dobré nebo lépe řečeno „opačné“ oproti savčím prionům, které máme spojené právě s mnoha závažnými chorobami. Nicméně v této kapitole se budu zabývat i možnostmi toxicity některých kvasinkových prionů a porovnáám ji s jejich výhodami. Rovněž se budu zabývat výskytem prionů v přírodě, který souvisí s otázkou, zda nejsou priony pouze laboratorním artefaktem.

### 4.1. Priony v přírodě a jejich význam

Jestli jsou priony přirozenou součástí kvasinek i v přírodě, to je ještě stále předmětem zkoumání. Existují odborné práce, které se výskytem prionů u divokých kmenů zabývají a to hlavně nejprozkoumanějšími priony [PSI<sup>+</sup>] a [URE3], které se jeví pro buňky jako prospěšné. Napomáhají buňkám přežít stresové situace v měnícím se prostředí, kde by buňka bez prionu nemohla fungovat. Tak by se daly tyto priony stručně charakterizovat na základě znalostí popsanych v předchozích kapitolách (Lancaster et al., 2010; Shorter and Lindquist, 2005; True and Lindquist, 2000; Wickner, 1994). Na přirozenost prionů [PSI<sup>+</sup>] a [URE3] v přírodních kvasinkových kmenech však existují zcela rozdílné názory. Jeden vychází z výzkumu, který podtrhuje prospěšné vlastnosti [PSI<sup>+</sup>] pro buňky a podle výsledků dokazuje určitou frekvenci výskytu v kvasinkových kmenech v přírodě (Halfmann et al., 2012). Úplně opačný pohled na [PSI<sup>+</sup>] a [URE3] vychází z jiného výzkumu, který přirozenost a dokonce prospěšnost těchto prionů pro buňky zavrhuje. Výsledky výzkumu vedly k úvaze, že [PSI<sup>+</sup>] a [URE3] by mohly být pro kvasinky jakýmsi „onemocněním“, které se běžně v přírodě nevyskytuje. Podle této úvahy by mohly priony [PSI<sup>+</sup>] a [URE3] být pro buňky nebezpečné, protože jinak by jejich množství v buňkách přírodních kmenů mělo být obrovské vzhledem k výhodám, které popisují jiné výzkumy (Nakayashiki et al., 2005). Tyto „kontroverzní“ úvahy vznikly jednoduše proto, že při pokusech buňky reagovaly na vzniklé priony [PSI<sup>+</sup>] a [URE3] jako na nebezpečí, které musí buňka odstranit. Buňky běžně reagují na stres a nebezpečné změny zvýšenou expresí chaperonů např. Hsp104p, Hsp70p a jejich reakce na priony [PSI<sup>+</sup>] a [URE3] vypadaly velmi podobně (Jung et al., 2000; Schwimmer and Masison, 2002).

U prionů [PSI<sup>+</sup>] a [URE3] není tedy stále zcela jasné, zdali jsou pouhým laboratorním artefaktem nebo se vyskytují i v přírodě. Naproti tomu [PIN<sup>+</sup>], který je důležitý pro propagaci [PSI<sup>+</sup>] a částečně i [URE3] (Derkatch et al., 2000; Shorter and Lindquist, 2005), se vyskytuje s dostatečně velkou frekvencí i v divokých kmenech. U prionu [PIN<sup>+</sup>] neexistují zatím žádné protikladné názory jako u [PSI<sup>+</sup>] a [URE3], které by [PIN<sup>+</sup>] v „normálním“ prionovém stavu označovaly jako nebezpečný stres pro buňky. U proteinu Rnq1p, ze kterého [PIN<sup>+</sup>] vzniká, není známa jiná role ovlivňující buňku než jeho tvorba prionového amyloidu (Derkatch et al., 2000). [PIN<sup>+</sup>] je tedy docela běžnou součástí divokých kmenů kvasinek v přírodě (Chernoff et al., 2000; Nakayashiki et al., 2005). Dalším prionem, který potvrzuje přirozenou přítomnost prionů v přírodních kmenech je [MOT3<sup>+</sup>]. V přírodních kmenech se vyskytuje poměrně často a je výhodou díky své funkci v přeměně buněčné stěny, která je pak odolná vůči určitým stresům z prostředí (viz. 2. kapitola) (Alberti et al., 2009; Halfmann et al., 2012).

Priony nejsou pouhým laboratorním artefaktem a vyskytují se i volně v přírodě u divokých kmenů kvasinek. Pomáhají kvasinkám pomocí změn fenotypových variant se vyskytovat i v prostředí, kde by dávno buňka nemohla přežít. Při většině pokusů jsou využívány kvasinky *S. cerevisiae*, protože se jedná o hlavní experimentální kvasinkový organismus, který se využívá běžně v laboratořích. O tom, zda se priony vyskytují i u dalších kvasinek volně v přírodě, se diskutuje a patří to stále k předmětu zkoumání.

#### **4.2. Priony kvasinek jako model pro studium savčích prionů**

I přes přirozenost prionu [PIN<sup>+</sup>] v divokých kmenech může být pro svou buňku i [PIN<sup>+</sup>] částečně stresem. Prion proteinu Rnq1p se podílí na speciálním modelu infekce pomocí shlukování polyQ agregátů u kvasinek, tedy podobně jak by to mohlo být u savčích prionů. U kvasinek byl tento model popsán teprve nedávno a dlouho se shlukování polyQ přisuzovalo jen savčím prionům (Meriin et al., 2002). PolyQ neboli polyglutamin je doménou v proteinu huntingtin, který je spojen se savčím neurodegenerativním onemocněním s názvem Huntingtinova choroba (Truant et al., 2008). Během experimentů na kvasinkách bylo zjištěno, že shlukování a rozšíření polyQ agregátů v kvasinkách závisí na přítomnosti prionu [PIN<sup>+</sup>] v buňce. Existují dva druhy polyQ, prvním z nich jsou krátké polyglutaminy, které nevedou k toxicitě. Dále to mohou být polyglutaminy dlouhé, ty jsou schopné tvořit agregáty, které již vedou k toxicitě. S pomocí přítomnosti prionu [PIN<sup>+</sup>] se mohou dlouhé

polyglutaminy shlukovat a to vede u kvasinek k cytotoxicitě, u savců se cytotoxicita projeví degenerací napadených neuronů a tedy degenerací mozkové tkáně. Na kvasinky působí dlouhé polyQ agregáty cytotoxicky o poznání méně než na savce, byly pozorovány jen malé ztráty kvasinkových buněk ve zkoumané kolonii. Shlukování dlouhých polyQ, které vede k toxicitě, závisí na dalších faktorech, jako je přítomnost Hsp104p a dalších chaperonů (Krobitsch and Lindquist, 2000). Podobná toxicita a shlukování polyQ byla popsána také při přítomnosti prionu [PSI<sup>+</sup>] (Gokhale et al., 2005). Tyto poznatky získané na kvasinkách by se daly využít i pro studování onemocnění, která jsou spojena se savčími priony. Přestože jsou u kvasinek důležité k shlukování polyQ i další faktory, hlavním faktorem stále zůstává přítomnost prionového stavu Rnq1p. U lidských chorob spojených s priony mohou hrát možná roli v agregaci polyQ i jiné prionové proteiny než známý PrP. Onemocnění kvasinkových buněk pomocí prionu a polyQ se dá tedy brát jako důležitý model pro další výzkum (Meriin et al., 2002).



## Závěr

Studium prionů u kvasinek může přispět i novému poznání u jiných organismů. Kvasinky se dají dobře využít jako modelový organismus pro studium eukaryotních buněk a to hlavně kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Ve své práci jsem chtěl čtenáře seznámit s problematikou prionů, aby si každý mohl představit, co vlastně prion je a jaké má účinky na kvasinky. Již v samém úvodu jsem nastínil protiklad se savčími priony, které jsou známé a studované především díky svému působení, které vede k těžkým neurodegenerativním chorobám. Naopak kvasinkové priony jsou spíše benefitem pro buňku, ale jak jsem ukázal v druhé části práce, mohou mít i „odvrácenou“ stranu, tj. mohou být pro buňku nebezpečné či se mohou chovat za určitých podmínek i jako choroba pro svoji buňku. Z tohoto pohledu lze kvasinkové priony použít jako model výzkumu jejich patogenicity možná analogické k savčím chorobám. Nicméně zůstává nejasné, zda pochopení funkce kvasinkových prionů opravdu může pomoci rozluštit opravdovou funkci či ještě nepříliš známé procesy při těžkých onemocněních savčími infekčními priony. To je otázka, na kterou asi ještě dnes neznáme odpověď. Přitom pokud bychom zjistili co nejvíc o podstatě různých prionových procesů i díky studiu kvasinkových prionů, tato zjištění by mohla pomoci v boji proti onemocněním, jako je u člověka Creutzfeldt-Jakobova choroba, Kuru či u zvířat BSE, Scrapie (klusavka) a další. Za těmito onemocněními, která jsou většinou pro pacienta smrtelná, pravděpodobně stojí savčí priony. Důležitým aspektem je i špatná diagnostika těchto onemocnění, kdy se přijde na neurodegenerativní onemocnění příliš pozdě (Prusiner, 1997).

Na základě porovnání kvasinkových prionů lze uvažovat i další možnost podobnosti funkcí savčích a kvasinkových prionů. Kvasinkové priony umožňují často své buňce žít v prostředí, kde by to pro buňku bez prionového stavu nebylo možné. Je to tedy jakási forma přizpůsobení. Proč by nemohly mít takové pozitivní funkce i savčí priony? Samozřejmě studium kvasinkových prionů nám zatím ještě tento pohled na savčí priony nemohlo objasnit, takže stále především vidíme jasný rozdíl, kdy kvasinkové priony jsou pro své buňky z větší části benefitem a savčí priony jsou pro organismus přítěží.

Na závěr je nutno říct, že z mého pohledu a výše uvedených poznatků, jsou kvasinkové priony klíčem do budoucna pro možné efektivnější potravinářství, jako je vinařství, pivovarský průmysl, pekařství. Všude kde se dnes kvasinky používají a vzhledem

k výhodám některých prionů, by se daly určitě ještě nějak kmeny s priony použít. Další a mnohem důležitější využití je pokračující výzkum kvasinek jako modelových organismů. Ještě dnes postrádáme mnoho znalostí o různých kvasinkových prionech. Stále není jasné, kolik existuje dalších prionů u kvasinek a u těch, které jsou objevené, neznáme mnoho jejich vlastností. Výzkum kvasinkových prionů může navázat více na savčí priony a nalézt podobnosti, které by nám v medicíně ukázaly jak léčit choroby spojené s priony.

## Přehled použité literatury

- Abramova, N., Sertil, O., Mehta, S., and Lowry, C.V. (2001). *Reciprocal regulation of anaerobic and aerobic cell wall mannoprotein gene expression in Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* 183, 2881-2887.
- Aguzzi, A., Baumann, F., and Bremer, J. (2008). *The Prion's Elusive Reason for Being*. *Annual Review of Neuroscience* 31, 439-477.
- Aigle, M., and Lacroute, F. (1975). *Genetical aspects of [URE3], a non-mitochondrial, cytoplasmically inherited mutation in yeast*. *Molecular & general genetics : MGG* 136, 327-335.
- Alberti, S., Halfmann, R., King, O., Kapila, A., and Lindquist, S. (2009). *A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins*. *Cell* 137, 146-158.
- Allen, K.D., Chernova, T.A., Tennant, E.P., Wilkinson, K.D., and Chernoff, Y.O. (2007). *Effects of ubiquitin system alterations on the formation and loss of a yeast prion*. *The Journal of biological chemistry* 282, 3004-3013.
- Allen, K.D., Wegrzyn, R.D., Chernova, T.A., Muller, S., Newnam, G.P., Winslett, P.A., Wittich, K.B., Wilkinson, K.D., and Chernoff, Y.O. (2005). *Hsp70 chaperones as modulators of prion life cycle: novel effects of Ssa and Ssb on the Saccharomyces cerevisiae prion [PSI+]*. *Genetics* 169, 1227-1242.
- Bradley, M.E., Edskes, H.K., Hong, J.Y., Wickner, R.B., and Liebman, S.W. (2002). *Interactions among prions and prion "strains" in yeast*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 Suppl 4, 16392-16399.
- Brown, J.C., and Lindquist, S. (2009). *A heritable switch in carbon source utilization driven by an unusual yeast prion*. *Genes & development* 23, 2320-2332.
- Coustou, V., Deleu, C., Saupe, S., and Begueret, J. (1997). *The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus Podospora anserina behaves as a prion analog*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 9773-9778.
- Cox, B.S., Tuite, M.F., and Mundy, C.J. (1980). *Reversion from suppression to nonsuppression in SUQ5 [psi+] strains of yeast: the classification of mutations*. *Genetics* 95, 589-609.
- DePace, A.H., Santoso, A., Hillner, P., and Weissman, J.S. (1998). *A critical role for amino-terminal glutamine/asparagine repeats in the formation and propagation of a yeast prion*. *Cell* 93, 1241-1252.
- Derkatch, I.L., Bradley, M.E., Hong, J.Y., and Liebman, S.W. (2001). *Prions affect the appearance of other prions: the story of [PIN(+)]*. *Cell* 106, 171-182.
- Derkatch, I.L., Bradley, M.E., Masse, S.V., Zadorsky, S.P., Polozkov, G.V., Inge-Vechtomov, S.G., and Liebman, S.W. (2000). *Dependence and independence of [PSI(+)] and [PIN(+)] : a two-prion system in yeast? The EMBO journal* 19, 1942-1952.
- Derkatch, I.L., Bradley, M.E., Zhou, P., Chernoff, Y.O., and Liebman, S.W. (1997). *Genetic and environmental factors affecting the de novo appearance of the [PSI+] prion in Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 147, 507-519.
- Derkatch, I.L., Bradley, M.E., Zhou, P., and Liebman, S.W. (1999). *The PNM2 mutation in the prion protein domain of SUP35 has distinct effects on different variants of the [PSI+] prion in yeast*. *Current genetics* 35, 59-67.

- Derkatch, I.L., Chernoff, Y.O., Kushnirov, V.V., Inge-Vechtomov, S.G., and Liebman, S.W. (1996). *Genesis and variability of [PSI] prion factors in Saccharomyces cerevisiae. Genetics* 144, 1375-1386.
- Du, Z., Park, K.W., Yu, H., Fan, Q., and Li, L. (2008). *Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in Saccharomyces cerevisiae. Nature genetics* 40, 460-465.
- Eaglestone, S.S., Cox, B.S., and Tuite, M.F. (1999). *Translation termination efficiency can be regulated in Saccharomyces cerevisiae by environmental stress through a prion-mediated mechanism. The EMBO journal* 18, 1974-1981.
- Fleming, A.B., and Pennings, S. (2001). *Antagonistic remodelling by Swi-Snf and Tup1-Ssn6 of an extensive chromatin region forms the background for FLO1 gene regulation. The EMBO journal* 20, 5219-5231.
- Garrity, S.J., Sivanathan, V., Dong, J., Lindquist, S., and Hochschild, A. (2010). *Conversion of a yeast prion protein to an infectious form in bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 10596-10601.
- Gavin, I.M., and Simpson, R.T. (1997). *Interplay of yeast global transcriptional regulators Ssn6p-Tup1p and Swi-Snf and their effect on chromatin structure. The EMBO journal* 16, 6263-6271.
- Gokhale, K.C., Newnam, G.P., Sherman, M.Y., and Chernoff, Y.O. (2005). *Modulation of prion-dependent polyglutamine aggregation and toxicity by chaperone proteins in the yeast model. The Journal of biological chemistry* 280, 22809-22818.
- Halfmann, R., Jarosz, D.F., Jones, S.K., Chang, A., Lancaster, A.K., and Lindquist, S. (2012). *Prions are a common mechanism for phenotypic inheritance in wild yeasts. Nature* 482, 363-368.
- Chernoff, Y.O., Derkach, I.L., and Inge-Vechtomov, S.G. (1993). *Multicopy SUP35 gene induces de-novo appearance of psi-like factors in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Current genetics* 24, 268-270.
- Chernoff, Y.O., Galkin, A.P., Lewitin, E., Chernova, T.A., Newnam, G.P., and Belenkiy, S.M. (2000). *Evolutionary conservation of prion-forming abilities of the yeast Sup35 protein. Molecular microbiology* 35, 865-876.
- Chernoff, Y.O., Lindquist, S.L., Ono, B., Inge-Vechtomov, S.G., and Liebman, S.W. (1995). *Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi+]. Science (New York, NY)* 268, 880-884.
- Chernoff, Y.O., Newnam, G.P., Kumar, J., Allen, K., and Zink, A.D. (1999). *Evidence for a protein mutator in yeast: role of the Hsp70-related chaperone ssb in formation, stability, and toxicity of the [PSI] prion. Molecular and cellular biology* 19, 8103-8112.
- Jung, G., Jones, G., Wegrzyn, R.D., and Masison, D.C. (2000). *A role for cytosolic hsp70 in yeast [PSI(+)] prion propagation and [PSI(+)] as a cellular stress. Genetics* 156, 559-570.
- Kirschner, D.A., Teplow, D.B., and Damas, A.M. (2000). *Twist and sheet: variations on the theme of amyloid. Journal of structural biology* 130, 87.
- Krobitsch, S., and Lindquist, S. (2000). *Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1589-1594.

- Kryndushkin, D.S., Engel, A., Edskes, H., and Wickner, R.B. (2011). *Molecular chaperone Hsp104 can promote yeast prion generation. Genetics* 188, 339-348.
- Kurahashi, H., Ishiwata, M., Shibata, S., and Nakamura, Y. (2008). *A regulatory role of the Rnq1 nonprion domain for prion propagation and polyglutamine aggregates. Molecular and cellular biology* 28, 3313-3323.
- Kurahashi, H., Shibata, S., Ishiwata, M., and Nakamura, Y. (2009). *Selfish prion of Rnq1 mutant in yeast. Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 14, 659-668.
- Lacroute, F. (1971). *Non-Mendelian mutation allowing ureidosuccinic acid uptake in yeast. Journal of bacteriology* 106, 519-522.
- Lancaster, A.K., Bardill, J.P., True, H.L., and Masel, J. (2010). *The spontaneous appearance rate of the yeast prion [PSI+] and its implications for the evolution of the evolvability properties of the [PSI+] system. Genetics* 184, 393-400.
- Liebman, S.W., and Chernoff, Y.O. (2012). *Prions in yeast. Genetics* 191, 1041-1072.
- Manogaran, A.L., Fajardo, V.M., Reid, R.J., Rothstein, R., and Liebman, S.W. (2010). *Most, but not all, yeast strains in the deletion library contain the [PIN(+)] prion. Yeast (Chichester, England)* 27, 159-166.
- Manogaran, A.L., Hong, J.Y., Hufana, J., Tyedmers, J., Lindquist, S., and Liebman, S.W. (2011). *Prion formation and polyglutamine aggregation are controlled by two classes of genes. PLoS genetics* 7, e1001386.
- Masison, D.C., and Wickner, R.B. (1995). *Prion-inducing domain of yeast Ure2p and protease resistance of Ure2p in prion-containing cells. Science (New York, NY)* 270, 93-95.
- Meriin, A.B., Zhang, X., He, X., Newnam, G.P., Chernoff, Y.O., and Sherman, M.Y. (2002). *Huntington toxicity in yeast model depends on polyglutamine aggregation mediated by a prion-like protein Rnq1. The Journal of cell biology* 157, 997-1004.
- Moriyama, H., Edskes, H.K., and Wickner, R.B. (2000). *[URE3] prion propagation in Saccharomyces cerevisiae: requirement for chaperone Hsp104 and curing by overexpressed chaperone Ydj1p. Molecular and cellular biology* 20, 8916-8922.
- Nakayashiki, T., Kurtzman, C.P., Edskes, H.K., and Wickner, R.B. (2005). *Yeast prions [URE3] and [PSI+] are diseases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10575-10580.
- Park, K.W., Hahn, J.S., Fan, Q., Thiele, D.J., and Li, L. (2006). *De novo appearance and "strain" formation of yeast prion [PSI+] are regulated by the heat-shock transcription factor. Genetics* 173, 35-47.
- Patel, B.K., Gavin-Smyth, J., and Liebman, S.W. (2009). *The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion. Nature cell biology* 11, 344-349.
- Patino, M.M., Liu, J.J., Glover, J.R., and Lindquist, S. (1996). *Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. Science (New York, NY)* 273, 622-626.
- Paushkin, S.V., Kushnirov, V.V., Smirnov, V.N., and Ter-Avanesyan, M.D. (1996). *Propagation of the yeast prion-like [psi+] determinant is mediated by oligomerization of the SUP35-encoded polypeptide chain release factor. The EMBO journal* 15, 3127-3134.
- Prusiner, S.B. (1997). *Prion diseases and the BSE crisis. Science (New York, NY)* 278, 245-251.
- Rikhvanov, E.G., Romanova, N.V., and Chernoff, Y.O. (2007). *Chaperone effects on prion and nonprion aggregates. Prion* 1, 217-222.
- Ross, E.D., Minton, A., and Wickner, R.B. (2005). *Prion domains: sequences, structures and interactions. Nature cell biology* 7, 1039-1044.

- Saupe, S.J. (2011). *The [Het-s] prion of Podospora anserina and its role in heterokaryon incompatibility. Seminars in cell & developmental biology 22*, 460-468.
- Sherman, M.Y. (2004). *Yeast prions: protein aggregation is not enough. PLoS biology 2*, E125.
- Shorter, J., and Lindquist, S. (2005). *Prions as adaptive conduits of memory and inheritance. Nature reviews Genetics 6*, 435-450.
- Schlumpberger, M., Wille, H., Baldwin, M.A., Butler, D.A., Herskowitz, I., and Prusiner, S.B. (2000). *The prion domain of yeast Ure2p induces autocatalytic formation of amyloid fibers by a recombinant fusion protein. Protein science : a publication of the Protein Society 9*, 440-451.
- Schwimmer, C., and Masison, D.C. (2002). *Antagonistic interactions between yeast [PSI(+)] and [URE3] prions and curing of [URE3] by Hsp70 protein chaperone Ssa1p but not by Ssa2p. Molecular and cellular biology 22*, 3590-3598.
- Sondheimer, N., Lopez, N., Craig, E.A., and Lindquist, S. (2001). *The role of Sis1 in the maintenance of the [RNQ+] prion. The EMBO journal 20*, 2435-2442.
- Taneja, V., Maddelein, M.L., Talarek, N., Saupe, S.J., and Liebman, S.W. (2007). *A non-Q/N-rich prion domain of a foreign prion, [Het-s], can propagate as a prion in yeast. Molecular cell 27*, 67-77.
- Ter-Avanesyan, M.D., Dagkesamanskaya, A.R., Kushnirov, V.V., and Smirnov, V.N. (1994). *The SUP35 omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [psi+] in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Genetics 137*, 671-676.
- Treusch, S., and Lindquist, S. (2012). *An intrinsically disordered yeast prion arrests the cell cycle by sequestering a spindle pole body component. The Journal of cell biology 197*, 369-379.
- Truant, R., Atwal, R.S., Desmond, C., Munsie, L., and Tran, T. (2008). *Huntington's disease: revisiting the aggregation hypothesis in polyglutamine neurodegenerative diseases. The FEBS journal 275*, 4252-4262.
- True, H.L., and Lindquist, S.L. (2000). *A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. Nature 407*, 477-483.
- Uptain, S.M., Sawicki, G.J., Caughey, B., and Lindquist, S. (2001). *Strains of [PSI(+)] are distinguished by their efficiencies of prion-mediated conformational conversion. The EMBO journal 20*, 6236-6245.
- Vitrenko, Y.A., Gracheva, E.O., Richmond, J.E., and Liebman, S.W. (2007a). *Visualization of aggregation of the Rnq1 prion domain and cross-seeding interactions with Sup35NM. The Journal of biological chemistry 282*, 1779-1787.
- Vitrenko, Y.A., Pavon, M.E., Stone, S.I., and Liebman, S.W. (2007b). *Propagation of the [PIN+] prion by fragments of Rnq1 fused to GFP. Current genetics 51*, 309-319.
- Volkov, K.V., Aksenova, A.Y., Soom, M.J., Osipov, K.V., Svitin, A.V., Kurischko, C., Shkundina, I.S., Ter-Avanesyan, M.D., Inge-Vechtomov, S.G., and Mironova, L.N. (2002). *Novel non-Mendelian determinant involved in the control of translation accuracy in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 160*, 25-36.
- Wegrzyn, R.D., Bapat, K., Newnam, G.P., Zink, A.D., and Chernoff, Y.O. (2001). *Mechanism of prion loss after Hsp104 inactivation in yeast. Molecular and cellular biology 21*, 4656-4669.
- Westermarck, P., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Cohen, A.S., Frangione, B., Ikeda, S., Masters, C.L., Merlini, G., Saraiva, M.J., and Sipe, J.D. (2002). *Amyloid fibril protein*

*nomenclature -- 2002. Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis 9, 197-200.*

Wickner, R.B. (1994). *[URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in Saccharomyces cerevisiae. Science (New York, NY) 264, 566-569.*

Zhou, P., Derkatch, I.L., and Liebman, S.W. (2001). *The relationship between visible intracellular aggregates that appear after overexpression of Sup35 and the yeast prion-like elements [PSI(+)] and [PIN(+)]. Molecular microbiology 39, 37-46.*