



UPPSALA
UNIVERSITET

Är prionproteiner Lamarckistiska element?

Kristina Gawelin

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2012
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

Prionproteiner är proteiner med minst två alternativa konformationer. En stor del av de idag kända jästprionerna, de i *Saccharomyces cerevisiae*, är positionerade i cellen så att de påverkar translationen av andra proteiner. [PSI+] är proteinet Sup35:s prionkonformation. Sup35 är en translationsterminator, och då proteinet antar sin [PSI+]-konformation försämras proteinets funktion varpå stoppkodon inte uppmärksammas och diverse proteinsynteser påverkas. Evolutionsbiologiskt bidrar prionproteinet med en fenotypisk kapacitet. Då cellen utsätts för stress ökar chanserna för uppkomsten av prionkonformationen, vilket som följd ger uttryck åt annars dold genetisk information. Prionproteinet återfinns i cytosol och i sin prionkonformation är det självpropagerande. Detta gör proteinet genom att påverka icke-prionkonformerade Sup35; [psi-], till att konvertera till [PSI+]. Genom cytosolen förs proteinet vidare från en bärande modercell till dottercell, vilket ger [PSI+] en egenskap av att stabilt gå i arv.

Inledning

Jean-Baptiste Lamarck presenterade under tidig 1800-tal sin teori rörande evolution. Lamarckismens grunder bygger på idén att biologiska egenskaper, utvecklade under en individs livstid, går i arv till avkomman. Detta är enligt lamarckismen vad som driver evolutionen framåt. Ungefär 50 år senare presenterade Darwin sin idé rörande arternas ursprung, med det naturliga urvalet i centrum som den drivande processen i evolution, och Lamarcks teori förflyttades åt sidan. Darwins teori är grundläggande inom biologin, men ingen regel utan undantag, så även för de allra mest accepterade koncepten. De i vanlig bakjäst (*Saccharomyces cerevisiae*) relativt nyupptäckta prionproteinerna är, enligt Susan Lindquist, det lamarckistiska undantaget (Halfmann & Lindquist 2010). De är självpropagerande, stabila alternativa konformationer av proteiner som genom cytosolet förs vidare från en generation till nästa. Skillnaden mellan dessa och andra epigenetiska element, så som alternativ metylering och histoner, är att prionerna har en stabil nedärvning. De är alternativa konformationer av ett i cellen naturligt protein, men som för med sig kraftigt förändrade egenskaper i sin alternativa form vilket leder till stora skillnader för individen i det slutgiltiga fenotypiska uttrycket.

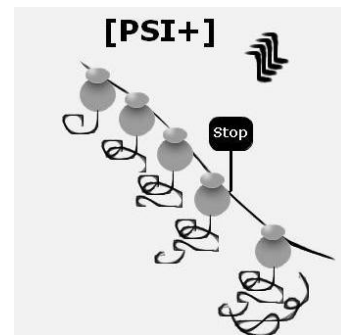
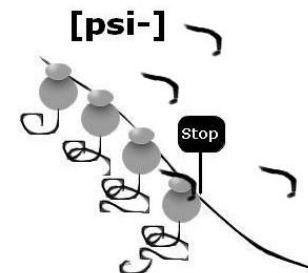
Prionproteinerna är ett stort och mycket intressant undantag från det biologiska centrala dogmat. Normalt följer proteinsyntesen det centrala dogmat; DNA ger RNA som i sin tur ger proteiner. Proteinerna genomgår därefter en mycket specifik veckning som är direkt avgörande för den funktion som proteinet ansvarar för. Till exempel kan en felaktig aminosyra föras in vid proteinsyntesen som följd av en mutation, vilket i nästa steg ger proteinet en felaktig veckning. Utan denna mycket exakta veckning går proteinets funktion förlorad, med allt ifrån små till mycket stora följder för individen. Prioner är proteiner vilka har mer än en alternativ och stabil veckning, olika konformationer. När ett sådant protein går

från sin vanliga och naturliga konformation till en prionkonformation påverkas proteinets funktion på samma sätt som andra, icke prionproteiners funktion av till exempel mutationer (Prusiner 1998). Här kan nämnas bovin spongiform encefalopati (BSE), även kallad galna ko-sjukan, och Creutzfeldt-Jacobs sjukdom hos människor, som exempel där prionkonformationen av proteiner leder till en förlorad proteinfunktion och till sjukdom för individen. Men, som nämnt innan, har en funktion i jäst hittats som i kontrast till detta har en relativt nyligen funnen positiv funktion. Kort beskrivet förhindras proteinet att fullfölja sin funktion i det biologiska systemet då det antar sin prionkonformation, men i och med det öppnas samtidigt nya möjligheter som förut var blockerade av just proteinets funktion. Detta gör prionproteiner till en ny typ av epigenetiska modulatorer.

Ett exempel på detta är prionproteinet [PSI+]. I jästceller finns proteinet SUP35. Proteinets funktion inom translationsprocessen är att proteinet känner igen stoppkodon och avslutar translationen. Det ser alltså till att stoppkodon uppmärksammas och förser translationsprocessen med en form

av kvalitet (Zhouravleva *et al.* 1995). Proteinets konformationer; den i cellen normala konformationen [psi-], och den alternativa prionkonformationen [PSI+]. När proteinets konformation är [psi-] fungerar proteinet som vanligt i cellen, och ser till att translationen avslutas vid stoppkodon. Däremot, när proteinet har en [PSI+]-konformation, förlorar proteinet sin funktion och translationen fortsätter trots stoppkodon (True *et al.* 2004). Detta leder till att det aktuella proteinet blir felaktigt, och förlorar då sin funktion den har i cellen. Detta kan också leda till att regioner som annars ligger dolda bakom stoppkodon, och därför normalt inte blir translaterade, nu med [PSI+] blir det. I det här perspektivet får [PSI+] en stor roll som epigenetisk modulator (Halfmann & Lindquist 2010).

Syftet med detta arbete är att undersöka prionproteinets [PSI+] i jäst, dess molekylära process och effekterna utav den. Arbetet strävar även efter att undersöka hur prionproteinerna står utanför det biologiska centrala dogmat och hur de fungerar som lamarckistiska undantag.



Figur 1. Bilden beskriver hur Sup35-proteinets agerande förändras då proteinet är i sin [PSI+] kontra [psi-]-konformation. Under [PSI+] samlas proteinet i polymerer och kan alltså inte utföra sin uppgift som transkriptionsterminator. Bilden är inspirerad av Halfmann och Lindquist, 2010, fig 2.

Prionproteinet hittades två gånger

Brian Cox utförde på 60-talet försök med jästceller. Han hade en linje jästceller som bar på en mutation. Målet med försöket var att screena för nonsenssuppressorer mot denna mutation. Nonsenssuppressorer är tRNA-molekyler med ett muterat antikodon. I och med det muterade antikodonet matchas och inplaceras en aminosyra till stoppkodonet, och som en direkt följd fortsätter translationen trots stoppkodonet (Cox 1965). Det visade sig att cellodlingarna antog en av två möjliga färger, röd eller vit. När Cox sedan undersökte kolonierna närmre, med korsningar av de två fenotyperna, betedde de sig inte som beräknat utifrån det antagandet att fenotypen är beroende av genotypen. Dessutom kunde röda celler sporadiskt ge upphov till vita, och tvärt om. Det hela ledde fram till slutsatsen om att de olika fenotypernas färger snarare var knutet till en faktor bunden till cytoplasman än att det var något genetiskt kodat. Cox kallade denna faktor för [PSI]. Han ansåg att det var en faktor som aktiverade en annan process, och därav följde följande benämningar: [PSI+] som den aktiva varianten, och [psi-] som den inaktiva varianten (Cox 1965).

Under mitten av 80-talet bekräftades de första fallen av den nervdegenerativa sjukdomen BSE hos nötkreatur. Det visade sig att sjukdomens symptom är en följd av proteiner som normalt finns i nervvävnad, men som har genomgått en annorlunda veckning. Denna alternativa veckning gör dem onedbrytbara och leder till att proteinerna ansamlas i aggregat, så kallade amyloider. Nervvävnaden dör successivt i takt med ansamlandet. Liknande sjukdomar hos andra arter var redan kända men det var då fortfarande okänt hur sjukdomen spreds. En oro utbredde sig snabbt huruvida sjukdomen även var överförbar till människa via konsumtion av smittat kött. En motsvarande sjukdom hos människor är Creutzfeldt-Jacobs (CJD). En variant av sjukdomen anses vara överförd via konsumtion av kontaminerat kött från ko till människa, och denna har benämnts variant Creutzfeldt-Jakobs (Will 2002).

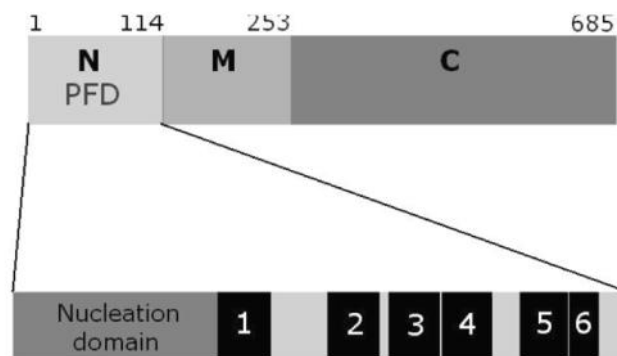
Prion-modellen var från början utvecklad för att förklara den bakomliggande faktorn av de nervdegenerativa sjukdomarna. Namnet prion är en förkortning av *proteinacious infectious particle*, och den beskriver hur ett protein i sig själv kan vara den drivande faktorn bakom sjukdom (Prusiner 1982). Dessa två upptäckter, av Cox på 60-talet och Prusiner på 80-talet, kopplades sedan ihop av Wickner (1994). Själv höll Wickner då på med forskning om ett annat protein med egenskaper som liknande [PSI], nämligen [URE3]. Han kom med förslaget att [PSI] och [URE3] i själva verket var jästens prionproteiner (Wickner 1994).

Sup35 i närbild

Proteinet i fråga, ansvarigt för [psi-] och [PSI+], är som tidigare nämnts Sup35. Sekvensering av genen *SUP35* visar att proteinet består av 685 aminosyror. Genom att jämföra sekvensen med andra kända proteiner kunde tre skilda proteinerregioner urskiljas: en aminoterminal (N), en mittendel (M) samt en karboxylterminal (C). Aminosyrorna 1 till 123 tillhör N, 124 till 253 till M, och 254 till 685 till region C (Kushnirov *et al.* 1988). C-regionen är lik en redan känd

translations-elongeringsfaktor; EF-1 α , och innehåller fyra stycken GTP-bindande sekvenser (Wilson & Culbertson 1987), medan M och N inte var lik någon annan då känd sekvens. Det visades att båda regionerna M och N kunde tas bort från Sup35, och proteinets funktion i jästcellerna som translationsterminator var oförändrad (Ter-Avanesyan *et al.* 1993). C-regionen ansvarar för proteinets naturliga funktion i cellen och dess närvaro är direkt avgörande för detta. Sup35 är i sig en subenhet i det mycket större komplexet som på engelska heter translation-release factor, som ser till att ribosomen släpper proteinet vid ett stoppkodon. Det är just denna funktion, att släppa proteinet, som är direkt kopplat till C-regionen (Stansfield *et al.* 1995).

Regionerna M och N ger proteinet förmågan att byta konformation mellan [psi-] och [PSI+] (Paushkin *et al.* 1996). Genom att överuttrycka N-regionen i celler induceras utvecklingen av nya element av [PSI+] (Ter-Avanesyan 1993). Det visades att N-regionen bär på det så kallade prion-forming domain (PFD) vilket är vad som driver proteinet till att bilda amyloidstrukturer. PFD bär på en region rik på glutamin och asparagin, vilken är kallad nucleation domain, och en region med fem hela repetitioner och en ofullständig repetition av en oligopeptid. Denna repeterande region tros vara direkt kopplat till förmågan hos [PSI+] att konvertera [psi-] till sin egen konformation (DePace 1998). PFD ger proteinet sin flexibla struktur (Halfmann & Lindquist 2010). M-regionen är kraftigt laddad och flexibel i sin konformation. Totalt 42 % av M-regionens uppbyggnad är laddad. Den positiva laddningen, som består av bara lysin, är samlade i den änden av M-regionen som är närmast N-regionen. Den negativa laddningen, som till stor del består av glutamat, är koncentrerat mot den ände som är närmast C-regionen (Liu *et al.* 2002).

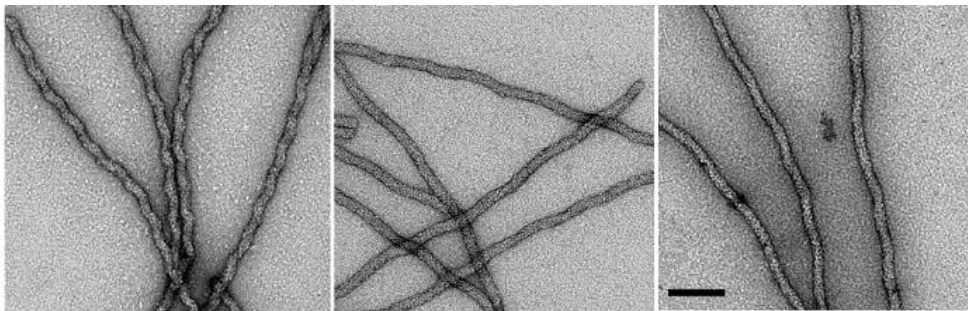


Figur 2. Bilden beskriver ett schematiskt utseende av Sup35. Den visar regionerna C, M och N samt en förstoring av N-regionens 'prion forming domain', med dess 'nucleation domain' samt de fem hela och en halv upprepning av en oligopeptid. Bilden är ritad av författaren.

Från [psi-] till [PSI+]

Då en jästcells yttre miljö förändras, utsätts cellen för stress. Denna stress stör mekanismer inne i cellen. Sup35-proteinets prionformande domän, PFD, är som tidigare nämnt flexibelt, och kan då ändra sin konformation till prionformen. När detta har skett, och en [psi-] därefter har bytt till [PSI+], självreplikeras prionkonformationen genom att placera sig själv i rollen som mall efter vilka nya Sup35-proteiner veckas efter. De nya [psi-]-proteinerna fångas snabbt upp och konverteras av de fibrösa strukturer som [PSI+] skapar (Patino *et al.* 1996).

Dessa ordnade fibrösa strukturer är rika på β -flak. Flera sådana fibrer tillsammans bildar ett större fixerat nätverk (Dobson 2001), så kallade amyloider. De är liknande sådana amyloider, motsvarande de som bildas av [PSI+], som associeras med sjukdomar i boskap och människor, men samma process sker även i jästceller med Sup35. Amyloidbildning kan induceras av olika sorters stress, såsom till exempel förändringar i pH eller av metalljoner i omgivningen, eller osmosförändringar (Dong *et al.* 2007).



Figur 3. Bilden visar amyloider av Sup35. Hämtat ur Chang *et al.* (2008). Copyright 2008 National Academy of Sciences, U.S.A.

Stress och Heat-shock proteiner

Prionproteinet agerar långt ifrån ensamt, då processen är reglerad av andra proteiner. Ett sådant viktigt protein hör till familjen av heat-shock proteiner. När en jästcell utsätts för stress, som förändringar i sin omgivning, ställs cellens inre mekanik på prov. Jästceller har skyddande proteiner, på engelska så kallade 'heat-shock proteins' (HSP), eller på svenska, värmechocksprotein. Namnet kommer från experimentella försök, där man utsatte bananflugslarver (*Drosophila melanogaster*) för förhöjda temperaturer. Den förhöjda temperaturen var strax under gränsen för vad larverna kunde överleva. När larvernas kromosomer sedan studerades, sågs ett specifikt och återkommande puff-mönster (Ashburner 1970). Det visade sig sedan att uppkomsten av dessa "puffar" egentligen var en kraftig ökning

av RNA-transkription, och ökningen av RNA:t i fråga korresponderade mot en ökning av protein i cellen. RNA-sekvenserna påvisades translatera för specifika proteiner (McKenzie *et al.* 1974), och dessa proteiner är HSP. Dessa proteiner skyddar alltså cellerna under stress. Det finns ett relativt stort antal olika HSP-proteiner, men i detta fall, med prioner som utgångspunkt, fokuseras intresset på en av dessa, nämligen Hsp104.

Sup35 och Hsp104

De flesta heat-shock proteinerna kallas med ett annat engelskt namn för chaperone proteins; på svenska: förklädesproteiner, (den svenska benämningen är dock chaperoner). Med förkläde åses den bildliga beskrivningen av något som följer med och skyddar, och det är precis vad chaperonerna gör. Inuti cellerna är det en enda stor röra av molekyler, och chaperonerna skyddar nybildade proteiner och ser till att de veckas korrekt trots detta kaos. Men, Hsp104 är något av ett undantag i HSP-familjen. Proteinet är en protein-remodeling factor, en konformations änderande faktor, och en av dess funktioner i cellen är att bryta upp de amyloider som bildas av [PSI+] (Shorter & Lindquist 2004). Detta är grunden för att [PSI+]-elementen ska föras vidare till nästa generation. Eftersom [PSI+] inte är direkt kodat för i DNA:t, så kommer det inte att föras vidare genetisk till dottercellerna när modercellen sporulerar. Dessutom, stora amyloider förs inte effektivt vidare via cytosolet. Därför är Hsp104 nödvändigt för att dela upp amyloidfibrerna i mindre delar, som sedan kan föras över till nästa generation (Shorter & Lindquist 2004). Om Hsp104 inte klyver amyloiderna blir dessa för stora för att föras över till ett relevant och optimerat antal dotterceller. Dessutom skulle de redan stora amyloiderna ha för få ytor för fortsatt effektiv polymerisering av nyrekryterade [PSI+]-proteiner i den nybildade dottercellen. Genom att klyva skapas nya ändar där fortsatt polymerisering kan ske (Shorter & Lindquist 2004).

Hittills beskrivet, är Hsp104:s funktion i cellen som en viktig del av mekaniken bakom [PSI+]s fördelning till följande generationer. Då för lite Hsp104 i cellen minskar effektiviteten hos prionproteinets distribution, kan för mycket Hsp104 helt och hållet tillintetgöra amyloider. I en tillräckligt kraftig koncentration kan proteinet helt befria cellen från [PSI+] (Shorter & Lindquist 2004). Intressant är att Hsp104 också har en drivande funktion av [PSI+]s självpropagering. Innan [PSI+]-polymeriseringen sker till amyloider, befinner sig de fibrösa elementen i ett mellanstadium. De lösliga proteinerna går samman och bildar oligomerer innan de fortsätter polymeriseras till fibrer (Shorter & Lindquist 2004). Hsp104-proteinets roll, i låga koncentrationer, är alltså även att föra de lösta prionproteinerna genom den oligointermediära fasen, till att bilda amyloider. Detta ger Hsp104 en funktion av en katalysator av [PSI+]-konformationens självpropagering (Shorter & Lindquist 2004).

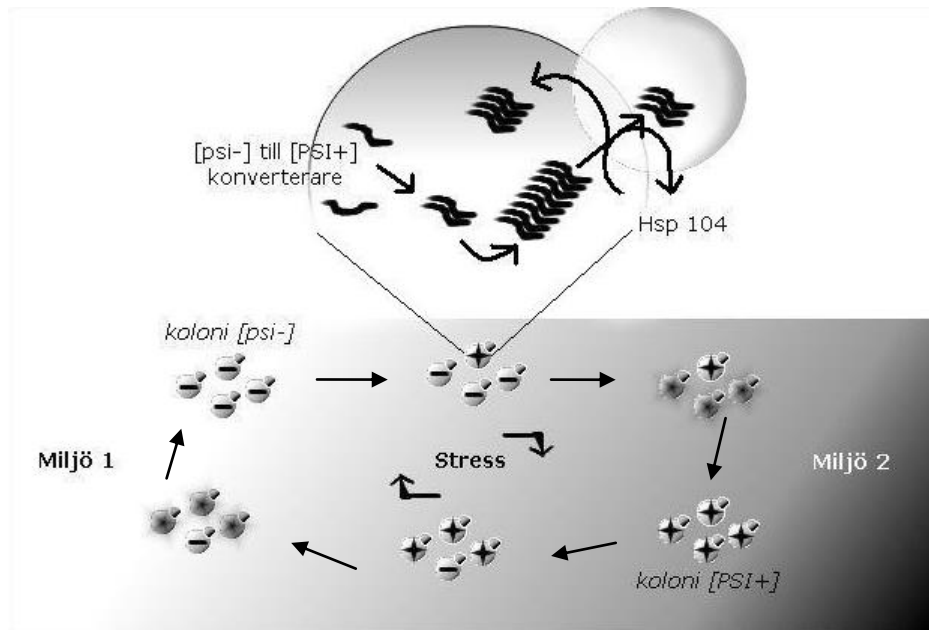
Hsp104 är alltså delaktig i både uppdelning och distribution, samt i [PSI+]s utökning och expansion inne i cellen. Sammanfattningsvis har den två roller inom formationen av nya prionproteiner; det katalyserar lösta prionproteiner att polymeriseras, och det delar upp amyloidfilamenten inför celldelning; och en roll inom området att befria cellen från [PSI+];

höga koncentrationer av Hsp104 inhiberar utvecklingen från oligomerintermediären och demonterar fibrer. Den senare rollen kan vara intressant inom den medicinska forskningen rörande nervdegenererande sjukdomar.

[PSI+] och jästcellers överlevnad – när sista chansen är att chansa

När jästcellernas levnadsmiljö förändras och cellen stressas, och då Sup35 antar sin prionveckning leder detta till att dess funktion som translationsterminator minskar. Stoppkodon uppmärksammas i en allt mindre grad och alla dessa drabbade proteiner ger i sin tur en drastisk förändring i hela cellens genetiska uttryck. Prionproteinet agerar som en växlare mellan olika genetiska uttryck, dolda regioner i jästcellens genom som potentiellt kan vara bärare av information som skulle ge cellen nya egenskaper. Sådana egenskaper kan till exempel vara förändringar av vilket material jästcellerna klarar av att växa på, cell-adhesion, så att cellerna inte sköljs bort lika lätt. Det skulle också kunna vara egenskaper som rör cellernas näringsanvändning och resistans mot olika gifter och antibiotika (True *et al.* 2004). Ifrån cellens sida är detta en chansning. Fenotypen som den hade innan förändringen fungerade kanske bra, men efter fungerar den sämre. Kanske är kolonin nu så dåligt anpassad till den nya miljön att den med all säkerhet kommer att raderas om ingenting förändras. Det är då prionproteinet slås på, och för fram en stor mängd dold genetisk information. Kanske kommer det fram en ny generation jästceller som är aningen bättre anpassad till den nya miljön. Jästkolonins fortlevnad kan vara säkrad. Intressant är resultatet av försök där hela 25 % av de nybildade fenotyperna var fördelaktiga under de nya simulerade miljöerna (True & Lindquist 2000). Dessutom, de nyutvecklade fenotyperna skiljer sig mellan olika linjer av jäst. Troligtvis beror detta på en genetisk skillnad i sekvensen som befinner sig nedströms om det ouppmärksamade stoppkodonet (Halfmann & Lindquist 2010).

Till saken hör att fluktuerande miljöer troligen på sikt kommer växla tillbaka. Istället för att då behöva dra igång detta stora maskineri igen av att förbikoppla genomet, eller att behöva lägga ner energi på att åter evolvera till den tidigare fenotypen, bidrar prionproteinet med en enklare lösning även här. När modercellen sporulerar till fyra dotterceller, och cytoplasman i processen delas upp och överförs, så fördelas innehållet av cytoplasman olika. Det finns en rimligt stor chans att en av dottercellerna blir utan [PRI+]-proteiner från modern, och att denna cell nu är den som är bäst anpassad (Halfmann & Lindquist 2010). Aktiviteten av andra prionreglerande proteiner, som Hsp104, kan även de ge upphov till dotterceller utan [PSI+].



Figur 4. Bilden beskriver hur jästens fenotyp förändras som svar av konvertering mellan [psi-] och [PSI+] i en fluktuerande miljö. Den övre delen av bilden visar hur [PSI+] polymeriserar till amyloider, samt hur de delas av Hsp 104 och förs över till dottercellen. Bilden är inspirerad av Halfmann & Lindquist. 2010, fig.1.

Exempel på direkta effekter av prionproteinet [URE3]

Primärval av kvävekälla genom [URE3]

Proteinet Ure2 reglerar katabolismen av kväve. Ett exempel på en kvävekälla är allantoin, men ämnet är en relativt fattig källa. Då tillgång finns till en rikare kvävekälla fokuserar cellen i större grad på denna. Detta för att minska den för cellen energimässiga kostnaden av att upprätthålla ett system som inte ger optimal utdelning. Sådana kraftigare kvävekällor är till exempel ammoniak och glutamin. Denna reglering styrs alltså av Ure2. Proteinet är ett prionprotein med prionkonformationen [URE3] (Rabenau *et al.* 2004). Då Ure2 känner av en rikare kvävekälla stoppar den funktionen av Gln3; ett transkriptionsregulatoriskt protein inom induceringen av en rad proteiner viktiga för kväveupptaget av fattigare kvävekällor (Mitchell & Magasanik 1984). Ure2 i sin prionkonformation, [URE3], förlorar denna funktion och Gln3 kan återfå sin. De mindre rika källorna utforskas nu på nytt och tas vara på (Rabenau *et al.* 2004).

Andra prionproteiner

År 2010 var nio olika prionproteiner kända (Halfmann *et al.* 2010, Rogoza *et al.* 2010), och ytterligare 18 proteiner har experimentellt visats bära på prionformande domäner (Alberti *et al.* 2009). Ett urval av dessa är Swil och Cyc8. Dessa två agerar alla som transkriptionsregulatorer och hanterar en stor del av jästcellernas genom (Rogoza *et al.* 2010; Du *et al.* 2008; Patel *et al.* 2009). Tre ytterligare prioner att nämna är Puf2, Ptr69 och Pub1. Dessa agerar posttranskriptionellt på hundratals olika mRNA. De påverkar dessa mRNA-molekylers stabilitet (Hogan *et al.* 2008). Båda grupperna, de transkriptionsregulatoriska och de posttranskriptionella, fungerar inom cellens informationshantering. Med informationshantering menas vad som ska uttryckas av cellens genom och när. Här var endast sex prionproteiner exemplifierade, men faktum är att flertalet av de kända prionproteinerna innehar just sådana positioner. De är alltså väl positionerade för att förändra ett fenotypiskt uttryck.

Het-s i *Podospora anserina*

Ett annat intressant prionprotein är HET-s, som återfinns i *Podospora anserina*, interagerar med ett motsvarande, alleliskt, protein som självt inte kan övergå i en prionkonformation. Där emot, med HET-s hjälp gör proteinet detta. Denna funktion av HET-s bildar grunden för ett mycket större system i svampen, nämligen att kunna skilja på eget och icke-eget inom den bildade kolonin. Detta hjälper svampen att skydda sig själv från cytoplasmatiska parasitiska element (Saupe 2007). *Podospora* är en filamentbildande askomycet. Svampen bildar större kolonier genom att växa samman och dela cytoplasma och näringsämnen. Men detta samarbete öppnar för cytoplasmatiska parasiter, så som andra svampar som inte är direkt besläktade med kolonin. Så för att skydda den samarbetande kolonin krävs ett system för att skilja eget- och icke-eget åt. Detta gör den genom *het*-gener, vilka upprätthåller skilda kompatibla varianter. Genom att skilda linjer av svampen innehar olika alleler av *het*, till exempel *Het-S* och *Het-s* är endast de med samma alleler kompatibla och kan gå samman. Ett protein av *het* är Het-S. När två svampar är kompatibla och går samman, var av den ena bär på prionkonformationen av Het-S, sprider sig prionproteinets i cytosolet och konverterar den andra svampens Het-S till prionkonformation. Detta sker genom hela den sammankopplade kolonin. Om så en icke-kompatibel svamp, bärare av Het-s, ansluter sig till kolonin kan man utifrån kolonins perspektiv se detta som en invasion. Kolonin försvarar sig då genom att prionkonformationen av Het-S på samma sätt sprider sig genom cytoplasman och når den invaderande cellen. För den invaderande cellen är prionproteinets skadligt varpå den dör. I och med att de är inkompatibla sker det en reaktion mellan Het-S och den invaderande cellens alleliska proteiner som i slutändan är giftiga (Saupe 2007).

Swil och Cyc8

Prionproteinerna Swil och Cyc8 fungerar som kromatidombildande faktorer. Båda proteinerna svarar i sin icke-prionkonformation på signaler från olika epigenetiska processers. De är då inblandade i cellernas tillväxt, huruvida de växer som encelliga individer eller som en i hopsatt multicellulär organisation (Fleming & Pennings 2001). Dessa proteins funktion ligger nära till andra epigenetiska element. Enligt Halfmann & Lindquist 2010, är det därför intressant att dessa två har en prionbildande egenskap. De anser att detta kan tyda på kopplingar mellan kromatid- och prionbaserade strategier för reglering av ombildande av celler.

Prionproteiner ur ett evolutionsbiologiskt perspektiv

[PSI+] och neutralismen, ett svar på Waddingtons tidiga efterlysning

För att förstå vikten av prionproteinernas upptäckt ur ett evolutionsbiologiskt perspektiv bör neutralism förklaras. Enligt teorin om neutralism är de allra flesta förändringar på molekylär nivå, de vill säga mutationer, neutrala. Med det menas mutationer där ingen skillnad i fitness medföljer och därför inte heller något kopplat selektionstryck. De är neutrala mutationer som varken ger en fördel eller en nackdel för den bärande individens fitness.

C. H Waddington skrev under tidigt 40-tal artikeln Canalization of Development and the Inheritance of Acquired Characters (Waddington 1942). I denna artikel beskrev Waddington två evolutionsbiologiska problem som han inte kunde förklara genom neutralismen. För det första, han uppmärksammade hur det i naturen till synes var mindre fenotypisk variation än vad som statistiskt kunde förväntas. För det andra lade han även vikt vid hur endast slumpmässiga mutationer och selektionen på dessa kunde svara för organismers anpassning till förändrande miljöer och hur han inte fick ihop detta. Båda dessa punkter kommenterades utifrån bakgrunden att dessa iakttagelser inte längre kunde förklaras utifrån ett Lamarckistiskt perspektiv. Waddington skrev följande citat: "If we are deprived of the hypothesis of inheritance of the effects of use and disuse, we seem thrown back on an exclusive reliance on the natural selection of merely chance mutations." (Waddington 1942). Det är intressant att prionproteinerna i jäst nu ger ett svar på Waddingtons efterlysning.

Prioner och snabb utveckling av nya komplexa egenskaper

Växlingen till [SPI+] möjliggör för att nya genuttryck frigörs som kanske, till exempel, förser en cell med en ny egenskap av att kunna hantera en ny typ av näringsanvändning. En sådan avgörande egenskap är komplex och kodas därför av många gener. Under andra

omständigheter är dessa gener inte optimala och kommer att selekteras emot, och var allel för sig skulle mycket väl kunna vara direkt negativ för individen. Hur har dessa alleler inte bara uppkommit, utan också bevarats till dess att tiden är rätt? Hur kan de bevaras i väntan på att omständigheterna skall vara gynnande, eller att andra nya alleler ska träda fram som de för individen negativa allelerna kan samarbeta med och först då, tillsammans, ge en positiv effekt? Den var en fråga som även Waddington övervägde.

Waddington använde sig av ett begrepp som han på engelska kallade canalization; på svenska kanalisering. Med kanalisering menas en förmåga att trots slumpmässig genotypisk variation ändå kanalisera slutresultatet av individens fenotyp så att individen uttrycker det som är optimalt. Kanalisering beskriver de observationer som Waddington beskrev; att det är mindre observerad fenotypisk diversitet än vad som kunde förväntas statistiskt av mängden tillgänglig genotypisk variation. Kopplat till detta är ett annat begrepp, genetisk robusthet, vilket beskriver ett genoms förmåga att klara av och hantera mutationer och fluktuationer i individens omgivande miljö. Evolution är direkt beroende av hur stark denna robusthet är, och det finns olika mekanismer för detta (Masel & Siegal 2009). När något är fenotypiskt robust kan mutationer ackumulera utan att de bärande individerna påverkas. När systemet ansvarigt för robustheten av någon anledning störs, kommer all denna dolda och ansamlade variation fram, varpå selektion då kan agera (Masel & Siegal 2009). Detta förlopp benämns som ett systems kapacitet. Hand i hand med kanalisering och robusthet följer kapacitet och kapacitörer, engelskans capacitors. Definitionen av en kapacitor är en av- och påväxel, som genom att växla kan föra fram tidigare dolda ärftliga element i genomet. Precis denna funktion har prionproteinet i jästcellen.

Diskussion

Jästcellens levnadsmiljöer är ostabila. De är fluktuerande miljöer som på relativt få generationer kan förändras så till den grad att cellerna måste anpassa sig eller försvinna. För att möjliggöra en snabb anpassning, som ska kunna ske på ett fåtal generationer, krävs stor variation. Men stor variation i sig är inte optimalt under de perioder då en fluktuerande miljö ändå är relativt stabil. Under de stabila perioderna finns det ett fåtal fenotyper som är maximerat anpassade till just denna omgivnings omständigheter. Genom att variera mutationshastigheten kan kolonier även variera sin anpassningsförmåga, men i regel är det onödigt kostsamt att stundvis ha en för hög mutationshastighet. Det är här prionproteinerna kommer in som en intressant lösning på detta avvägningsproblem, och det gör det genom att skapa en genväg där cellerna inte enbart förlitar sig på evolution via slumpmässig mutation. Prionproteinet förhöjer cellens fenotypiska kapacitans.

Sup35-proteinets grundfunktion som translationsterminator kan ge en fingervisning om hur gammalt prionfenomenet möjligen är. Proteinbaserade livsformer fanns med stor säkerhet redan innan kvalitetsförhöjande mekanismer av proteinsyntesen utvecklades, så som Sup35. Detta förlopp kan vara lika gammalt som proteinsyntesen i sig, och minst lika gammal som de

processer som upprätthåller kvaliteten inom proteinsyntesens translationssystem. Om systemet och företeelsen är så gammal är det troligt att fenomenet är mycket mer vidspjutt än vad vi idag kan se.

Prionproteiner är intressanta att studera av andra anledningar än de rent evolutionsgenetiska. Inte minst inom medicin. Eftersom prionproteiner i jästcellen bildar amyloider på samma sätt som de som ses inom en del av de nervdegenerativa sjukdomsförloppen, kanske nyckeln till att lösa deras gåta lättare kan finnas genom att studera jästprioner. Denna nyckel kanske rör Hsp104. Forskning tyder på att det inte är amyloiderna i sig som nödvändigtvis är det mest skadliga inom nervsjukdomarna, utan det intermediära stadiet mellan lösta prionproteiner och de fibrösa polymerade, alltså oligomererna, har visats vara det mest giftiga under hela den sjukdomsinitierande prionprocessen (Huff *et al.* 2003). Hsp104 har möjligen koevolverat tillsammans med prionproteinet för att skynda på polymeriseringen och göra det oligomerintermediära stadiet så kort som möjligt, allt för att skydda jästcellerna mot dess giftiga verkan.

Forskning inom hjärnan och minnet rör sig också närmare prionproteiner, och då inom området om långtidsminnet och dess fixering. Man tror att övergången till ett långtidsminne kräver någon slags fixering och markering av synapsen i fråga. Synapsen måste på något molekylärt sätt förändras så att den på ett långsiktigt sätt underhålls. Utan att gå in i detalj har man i *Aplysia* hittat ett protein som tros vara en viktig komponent i bildningen av långtidsminnet. Efter en närmare undersökning av proteinets struktur fann man komponenter som liknade prionproteinets N- och M-regioner (Si *et al.* 2003a). Efter försök bevisades även att proteinets N- och M-regioner också kunde agera som ett prionprotein, och både konvertera proteiner till en alternativ konformation samt aggregera (Si *et al.* 2003b). Om prionproteiner i människor även har en epigenetisk funktion återstår att se.

Prionproteiner svarar på omständigheter i miljön, och förändrar hur det genetiska materialet uttrycks. Dessutom, i och med att prionproteinerna stabilt förs vidare genom generationer av jäst, så faller prionproteiner innanför ramarna för vad som möjligen kan kallas lamarckistiska element.

Tack

Ett stort till mina handledare Katariina Kiviniemi Birgersson och Lage Cerenius, samt till medstudenter, för hjälpsamma kommentarer och givande diskussioner.

Referenser

- Alberti S, Halfmann R, King O, Kapila A, Lindquist L. 2009. A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins. *Cell* **137**: 146-158.
- Ashburner M. 1970. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. *Chromosoma* **31** 356-376.
- Cox B. 1965. [PSI]: a cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast. *Heredity* **20**: 505-521.
- Chang H, Lin J, Lee H, Wang H, King C. 2008. Strain-specific sequences required for yeast [PSI+] prion propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 13345-13350.
- DePace A, Santoso A, Hillner P, Weissman J. 1998. A critical role for amino-terminal glutamine/asparagines repeats in the formation and propagation of a yeast prion. *Cell* **93**: 1241-1252.
- Dobson C. 2001. The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **356**: 133-145.
- Dong J, Canfield J, Mehta A, Shokes J, Tian B, Childers J, Simmons J, Mao Z, Scott R, Warncke K, Lynn D. 2007. Engineering metal ion coordination to regulate amyloid fibril assembly and toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 13313-13318.
- Du Z, Park K, Yu H, Fan Q, Li L. 2008. Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swil in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Genetics* **40**: 460-465.
- Flemming A, Pennings S. 2001. Antagonistic remodeling by Swi-Snf and Tup1-Ssn6 of an extensive chromatin region forms the background for *FLO1* gene regulation. *The European Molecular Biology Organization* **20**: 5219-5231.
- Halfmann R, Lindquist S. 2010. Epigenetics in the extreme: prions and the inheritance of environmentally acquired traits. *Science* **330**: 629-632.
- Halfmann R, Alberti S, Lindquist S. 2010. Prions, protein homeostasis, and phenotypic diversity. *Trends in Cell Biology* **20**: 125-133.
- Hogan D, Riordan D, Gerber A, Herschlag D, Brown P. 2008. Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *Public Library of Science* **6**: 2297-2313.
- Huff M, Balch W, Kelly J. 2003. Pathological and functional amyloid formation orchestrated by the secretory pathway. *Current Opinion in Structural Biology* **13**: 674-682.
- Kushnirov V, Ter-Avanesyan M, Telckov M, Surguchov A, Smirnov V, Inge-Vechtomov S. 1988. Nucleotide sequence of the SUP2 (SUP35) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **66**: 45-54.
- Liu J, Sondheimer N, Lindquist S. 2002. Changes in the middle region of Sup35 profoundly alter the nature of epigenetic inheritance for the yeast prion [PSI+]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 16446-16453.
- Masel J, Siegal M. 2009. Robustness: mechanisms and consequence. *Trends in Genetics* **25**: 395-403.
- McKenzie S, Henikoff S, Meselson M. 1974. Localization of RNA from heat-induced polysomes at puff sites in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America **72**: 1117-1121.
- Mitchell A, Magasanik B. 1984. Regulation of Glutamine-repressible gene products by the *GLN3* function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **4**: 2758-766.
- Patel B, Gavin-Smyth J, Liebman S. 2009. The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion. *Nature Cell Biology* **11**: 344-349.
- Patino M, Liu J, Glover J, Lindquist S. 1996. Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. *Science* **273**: 622-626.
- Paushkin S, Kushnirov V, Smirnov V, Ter-Avanesyan M. 1996. Propagation of the yeast prion-like [psi+] determinant is mediated by oligomerization of the *SUP35*-encoded polypeptide chain release factor. *The European Molecular Biology Organization Journal* **15**: 3127-3134.
- Prusiner S. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**: 136-144.
- Prusiner S. 1998. Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 13363-13383.
- Rabenau H, Cinatl J, Doerr H. 2004. Prions a challenge for science, medicine and the public health system. 2:a uppl. Karger Publishers. Basel.
- Rogoza T, Goginashvili A, Rodionova S, Ivanov M, Viktorovskaya O, Rubel A, Volkov K, Mironova L. 2010. Non-Mendelian determinant [ISP+] in yeast is a nuclear-residing prion form of the global transcriptional regulator Sfp1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 10573-10577.
- Saupe S. 2007. A short story of small s a prion of the fungus *Podospora anserina*. *Prion* **1**: 110-115.
- Serio TR, Lindquist S. 1999. [PSI+]: an epigenetic modulator of translation termination efficiency. *Annual Reviews of Cell and Developmental Biology* **15**: 661-703.
- Shorter J, Lindquist S. 2004. Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-Replicating Sup35 prion conformers. *Science* **304**: 1793-1797.
- Si K, Giustetto M, Etkin A, Hsu R, Janisiewicz A, Conchetta Miniaci M, Kim J, Zhu H, Kandel E. 2003a. A neuronal isoform of CPEB regulates local protein synthesis and stabilizes synapse-specific long-term facilitation in *Aplysia*. *Cell* **115**: 893-904.
- Si K., Lindquist S, Kandel E. 2003b. A neuronal isoform of the *Aplysia* CPEB has prion-like properties. *Cell* **115**: 879-891.
- Stansfield I, Jones K, Kushnirov V, Dagkesamanskaya A, Poznyakovski A, Paushkin S, Nierras C, Cox B, Ter-Avanesyan M, Tuite M. 1995. The products of the *SUP45* (eRF1) and *SUP35* genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *The European Molecular Biology Organization Journal* **14**: 4365-4377.
- Ter-Avanesyan M, Kushnirov V, Dagkesamanskaya A, Didichenko S, Chernoff Y, Inge-Vechtomov S, Smirnov V. 1993. Deletion analysis of the *SUP35* gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two non-overlapping functional regions in the encoded protein. *Molecular Microbiology* **7**: 683-692.
- True H, Berlin I, Lindquist S. 2004. Epigenetic regulation of translation reveals hidden genetic variation to produce complex traits. *Nature* **431**: 184-187.
- True H, Lindquist S. 2000. A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and

- phenotypic diversity. *Nature* **407**: 477-483.
- Waddington CH. 1942. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* **150**: 563-565.
- Waldron C, Cox B, Wills N, Gesteland R, Piper P, Colby D, Guthrie C. 1981. Yeast ochre suppressor SUQ5-ol is altered **tRNA^{Ser}_{UCA}**. *Nucleic Acids Research* **9**: 3077-3088.
- Wickner R. 1994. [URE#] as an Altered *URE2* protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **264**: 566-569.
- Will R. 2002. Variant Creutzfeldt-Jakobs disease. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* **62**: 167-173.
- Wilson P, Culbertson M. 1987. SUF12 suppressor protein of yeast: a fusion protein related to the EF-1 family of elongation factors. *Journal of Molecular Biology* **199**: 559-573.
- Zhouravleva G, Frolova L, Le Goff X, Le Guellec R, Inge-Vechtsov S, Kisselev L, Philippe M. Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *The European Molecular Biology Organization* **14**: 4065-4072.