ยีสต์แชพเพอโรน Hsp104 และบทบาทในการเพิ่มขยายและขจัด [*PSI*$^{+}$] พริออน

Yeast chaperone Hsp104 and the role in [*PSI*$^{+}$] prion propagation and elimination

จินตนา ว่องวิกย์การ[1]

Jintana Wongwigkarn[1]

Received: 9 May 2019 ; Revised: 15 July 2019 ; Accepted: 1 August 2019

บทคัดย่อ

โมเลกูลาร์แชพเพอโรน Hsp104 หรือโปรตีนฮีทช็อคในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มีหน้าที่สำคัญในการตอบสนองต่อสภาวะอุณหภูมิสูงเพื่อให้เซลล์มีชีวิตรอด โดยส่งเสริมให้โปรตีนที่เสียสภาพ มีการม้วนพับที่ผิดปกติและรวมกลุ่มกัน ให้เกิดการม้วนพับใหม่จนกระทั่งกลับมาเป็นโปรตีนรูปแบบปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน Hsp104 มีส่วนช่วยในการคงอยู่และเพิ่มขยายของพริออนภายในเซลล์ยีสต์ พริออนในยีสต์เป็นรูปแบบโปรตีนที่มีความผิดปกติหรือมีการม้วนพับที่เปลี่ยนไป แล้วนำไปสู่การรวมกลุ่มกันเป็นโปรตีนพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ คล้ายกับพริออนที่พบในมนุษย์ซึ่งสามารถถ่ายทอดจากเซลล์สู่เซลล์ได้ แต่ไม่ทำให้เกิดโรคในยีสต์ มีรายงานการศึกษาในยีสต์ที่มี [*PSI*$^{+}$] พริออน พบว่า Hsp104 มีหน้าที่ในการทำให้พริออนพอลีเมอร์กลายเป็นโมเลกุลที่เล็กลง ใช้สำหรับเริ่มต้นการเพิ่มขยายพริออนใหม่และการคงอยู่ของพริออนภายในเซลล์ ด้วยกลไกเดียวกับที่ Hsp104 ช่วยให้เกิดการม้วนพับใหม่ของโปรตีนอื่น ส่วนที่น่าสนใจคือในสภาวะที่มีระดับ Hsp104 สูงกว่าปกติ สามารถส่งผลให้เกิดการขจัด [*PSI*$^{+}$] พริออนจากเซลล์ยีสต์ได้ แต่เกิดจากกลไกการทำงานที่ยังไม่ทราบชัดเจน จึงมีความจำเป็นต้องทำความเข้าใจเพิ่มเติมถึงกลไกการทำงานของ Hsp104 ในการเหนี่ยวนำให้สูญเสีย [*PSI*$^{+}$] จากเซลล์ ซึ่งข้อมูลนี้อาจนำไปสู่การรักษาโรคทางระบบประสาทและสมองในมนุษย์ ที่เกิดจากการรวมกลุ่มของโปรตีนที่มีโครงสร้างไม่ปกติในสมองได้ในอนาคต

คำสำคัญ: Hsp104 [*PSI*$^{+}$] พริออน ยีสต์

Abstract

Molecular chaperone Hsp104, also known as heat shock protein in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, plays an essential role in thermotorelance response enabling yeast cell survival at high temperature. Hsp104 mediates the misfolding and the aggregation of denatured proteins to refold to their native forms. In addition, it has also reported that Hsp104 protein is required to maintain and propagate the prion state within yeast cells. A prion is an unusual form of protein or misfolded protein and prone to aggregate as large protein polymers. Yeast prion can be transmitted from cell to cell like prions found in humans but does not cause disease. Several studies have revealed that Hsp104 is involved in yeast [*PSI*$^{+}$] prion propagation by dissolving prion polymer into the smaller molecules needed to generate a new round of propagation via the same mechanism of Hsp104 in promoting proteins refolding. Interestingly, over-expression of Hsp104, results in elimination of the [*PSI*$^{+}$] prion from yeast cells but the mechanism remains unclear. Therefore, it is necessary to gain insight into the mechanism of how elevated Hsp104 induces [*PSI*$^{+}$] loss. Furthermore, this information might lead to further treatment of human neurodegenerative diseases caused by misfolding and accumulation of abnormal proteins in the brain.

Keywords: Hsp104, [*PSI*$^{+}$] prion, yeast

---

[1] *อาจารย์, ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตรการแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000*

[1] *Lecturer, Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan university, Tambon Tha Pho, Amphoe Mueang, Phitsanulok 65000 *Corresponding author, e-mail: jintanaw@nu.ac.th*

บทนำ

ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มีกลุ่มของโปรตีน ซึ่งมีหน้าที่ในเซลล์เป็นโมเลกูลาร์แชพเพอโรน (molecular chaperone) เช่น โปรตีนฮีทช็อค (heat shock proteins; Hsps) ซึ่งทำหน้าที่ช่วยให้โปรตีนชนิดต่างๆ อยู่ในรูปแบบที่เหมาะกับการทำงานตามหน้าที่ในเซลล์ รวมทั้งกรณีที่เซลล์อยู่ในสภาพแวดล้อมที่กดดัน หรือไม่เหมาะสม เช่น สัมผัสกับความร้อน (heat shock) หรือสารเคมี โดยเซลล์อาจสร้างโปรตีนกลุ่มแชพเพอโรนเพิ่มขึ้น สำหรับทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับทั้งขั้นตอนการสร้าง และการกำจัดโปรตีนในเซลล์ ซึ่งเป็นการตอบสนองของเซลล์ ต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆ เหล่านั้น ช่วยให้เซลล์ยีสต์อยู่รอด และดำรงชีวิตต่อไปได้ อย่างไรก็ตามไม่ใช่โปรตีนกลุ่ม Hsps ทุกชนิดสามารถทำหน้าที่เป็นแชพเพอโรนได้ แชพเพอโรนในยีสต์แบ่งเป็นแฟมิลี่ตามน้ำหนักโมเลกุล และหน้าที่การทำงาน (Table 1) เช่น Hsp70 และ Hsp104 เป็นกลุ่มแชพเพอโรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ในขณะที่ Hsp40 เป็นกลุ่มแชพเพอโรนสนับสนุนอื่นๆ (co-chaperones)

Table 1 The major families of yeast molecular chaperones, co-chaperones and their cellular functions[1].

Chaperone family	Name	Function
Hsp70	Ssa1-4	Precursor protein translocation and protein folding
	Ssb1-2	Ribosome-bound to nascent chains
	Ssc1	Translocation of precursor proteins
	Ssd1	Translocation of precursor proteins
	Sse 1-2	Cooperate with Ssa and Ssb proteins
Small Hsp	Hsp12	Stress inducible, membrane associated
	Hsp26	Bind and stabilise unfolded protein for refolding
	Hsp42	Bind and stabilise unfolded protein for refolding
Hsp100/Clp	Hsp104	Disruption of aggregated proteins Cooperate with Hsp70 and Hsp40
Hsp40	Ydj1	Cooperate with Hsp70 to stimulate ATPase activity
	Sis1	Cooperate with Hsp70 to stimulate ATPase activity
Hsp90	Hsp82	Assist protein folding, stabilise misfolded protein and mediate the ubiquitin–proteasome system
	Hsc82	Assist protein folding, stabilise misfolded protein and mediate the ubiquitin–proteasome system

แชพเพอโรนแฟมิลี่ Hsp104/ClpB

ยีสต์แชพเพอโรน Hsp104 มียีนที่คล้ายคลึงกับโปรตีน ClpB ที่พบในแบคทีเรีย จัดอยู่ในแฟมิลี่ ClpB/Hsp100 AAA^+ ATPases (ATPase associated with a variety of cellular activities) โปรตีนในกลุ่มนี้เกิดจากโปรตีน 6 หน่วยย่อยมารวมตัวกันเป็นรูปวงแหวนหกหน้า (hexameric ring) โดยแต่ละหน่วยย่อยจะมีบริเวณโดเมน ATPase หรือ AAA^+ อยู่ 2 บริเวณ โปรตีนกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 200-250 ตัว มีโมทีฟคือ walker A และ B เป็นบริเวณอนุรักษ์สำหรับจับกับ ATP (ATP-binding) ซึ่งพบในโปรตีนที่จับกับ นิวคลีโอไทด์ได้ (nucleotide binding domain; NBD) การจับนี้ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง แล้วจึงเกิดการไฮโดรไลซ์ ATP[2,3] ซึ่งส่วน walker A ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน GXXXXGKT (G, K, T และ X คือ ไกลซีน ไลซีน ทรีโอนีน และกรดอะมิโนอื่นๆ) โดยไลซีนทำหน้าที่จับกับนิวคลีโอไทด์ และ walker B ประกอบด้วยกรดอะมิโน hhhhDE (D, E และ h คือ กรดแอสพาร์ติก กรดกลูตามิก และกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิกอื่นๆ) โดยกรดกลูตามิกนี้จำเป็นในการไฮโดรไลซ์ ATP[3] แชพเพอโรนในแฟมิลี่ ClpB/ Hsp100 แบ่งออกเป็น 2 คลาส ได้แก่ class I ซึ่งประกอบด้วยโดเมน AAA^+ 2 โดเมน และ class II ที่ประกอบด้วยโดเมน AAA^+ 1 โดเมน โดย Hsp104 จัดอยู่ใน class I[4,5] ในเซลล์ยีสต์ระดับการแสดงออกของยีน *HSP104* จะเพิ่มขึ้น

เมื่อยีสต์อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมหรือมีอุณหภูมิสูง[6] โปรตีน Hsp104 ไม่ได้ทำงานป้องกันการเกาะกลุ่มกันของโปรตีนที่เสียสภาพเหมือนที่พบในแชพเพอโรนอื่น แต่ทำหน้าที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแยกออกจากกันของกลุ่มโปรตีนที่เสียสภาพหรือกลุ่มโปรตีนที่ม้วนพับผิดปกติ (misfolded protein) ในไซโทพลาสซึม เพื่อส่งเสริมให้เกิดการม้วนพับใหม่ (refolding) ของโปรตีนนั้นๆ Hsp104 มีการทำงานร่วมกับแชพเพอโรนสนับสนุน คือ Hsp70 (Ssa) และ Hsp40 (Ydj1) ซึ่งทำหน้าที่ช่วยนำโปรตีนที่เกาะกลุ่มกันส่งต่อให้กับ Hsp104[7]

รูปร่างและโครงสร้างของ Hsp104

ยีน *HSP104* แสดงออกเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 908 ตัว มีโดเมนสำหรับจับกับ ATP อยู่ 2 บริเวณ (Figure 1) ซึ่งมีตำแหน่งอนุรักษ์ของอะมิโนที่จับกับนิวคลีโอไทด์ คือตำแหน่งที่ 215 218 617 และ 620 จำเป็นในการตอบสนองเมื่อเซลล์สัมผัสกับอุณหภูมิสูง[8] นอกจากนี้ลำดับของกรดอะมิโนยังบ่งชี้ว่า Hsp104 จัดอยู่ในแฟมิลี่เดียวกันกับฮีทช็อคโปรตีน Hsp100[9] การวิเคราะห์โครงสร้างเบื้องต้นของโปรตีน Hsp104 ศึกษาครั้งแรกโดย Parsell et al (1993)[10] พบว่าเป็นโปรตีนที่มีขนาด 102 กิโลดาลตัน ในสภาวะที่มี ATP โปรตีน 6 หน่วยย่อยประกอบกันเป็นวงแหวนหกหน้า มีช่องตรงกลาง โดยโปรตีนแต่ละหน่วยมี 2 NBDs (Figure 1) นอกจาก NBDs ของ Hsp104 ทั้ง 2 บริเวณจะประกอบด้วย walker A และ B แล้วยังมีโมทีฟอื่น คือ sensor-1 และ sensor-2 ซึ่งช่วยในการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และไฮโดรไลซ์ ATP (Table 2) ส่วน diaphragm loop และ arginine finger ซึ่งจำเป็นในการแยกโปรตีนที่เกาะกลุ่มกัน และไฮโดรไลซ์ ATP[11] การแทนที่กรดอะมิโนไลซีนด้วยทรีโอนีนที่ตำแหน่ง 218 และ 620 บริเวณ walker A ของ NBD1 และ NBD2 ทำให้ Hsp104 สูญเสียกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ATPase และความสามารถในการรวมเป็นโครงสร้างวงแหวนหกหน้า[12] แล้วยังพบอีกว่าการกลายพันธุ์ที่ Walker B บริเวณ NBD1 และ NBD2 ทำให้ Hsp104 ยังคงมีคุณสมบัติในการเข้าจับกับสารหรือโปรตีนได้แต่ เป็นการจับแบบไม่ปล่อย เนื่องจากไม่เกิดไฮโดรไลซ์ ATP[13,14] จึงแสดงให้เห็นว่าทั้งบริเวณ NBD1 และ NBD2 มีส่วนสำคัญในขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การเข้าจับกับสารหรือโปรตีนเป้าหมาย และการปลดปล่อยหลังเสร็จสิ้นกระบวนการทำงานของ Hsp104

กลไกการทำงานของ Hsp104

การทำงานเพื่อแยกพอลิเพปไทด์ออกจากโปรตีนที่รวมกลุ่มกันของ Hsp104 เริ่มจากการไฮโดรไลซ์ ATP[6,7] โดยพบว่าโปรตีนจะเข้าจับกับส่วนปลาย C ของ Hsp104 ก่อนแล้วเหนี่ยวนำให้ ATPase เกิดกิจกรรมผ่านบริเวณ NBD2 และ M ไปยัง NBD1[15] ซึ่งบริเวณ NBDs ทั้ง 2 ของ Hsp104 ร่วมมือกันในการไฮโดรไลซ์ ATP ซึ่งการจับกับโปรตีนที่บริเวณ NBD2 ทำให้เกิดไฮโดรไลซ์ ATP ที่ NBD1[13] โดยวงจรการไฮโดรไลซ์ ATP-ADP พบว่าที่สถานะ ADP ความสามารถในการจับกับสารของ Hsp104 ต่ำกว่าในสถานะ ATP โดยสรุปคือ สายพอลิเพปไทด์จับกับ Hsp104-ATP เกิดเป็น Hsp104-ATP-substrate complex จากนั้น ATP จึงถูกไฮโดรไลซ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ Hsp104 (Figure 2) ได้มีการนำเสนอกลไกการทำงานของ Hsp104 ในการจัดการกับโปรตีนที่เกาะกุล่มไว้ด้วยกัน 2 รูปแบบ คือ แบบที่ 1 เรียกว่า crowbar model เริ่มต้นด้วยโปรตีนที่เสียสภาพไปจับ Hsp104 ที่ปลาย N และกระตุ้นให้ Hsp104 มีรูปร่างเป็นแบบ coiled-coil structure ซึ่งทำให้เกิดแรงในการดึงแยกโปรตีนออกจากกลุ่มก้อนขนาดใหญ่ ก่อนนำเข้าสู่ขั้นตอนการม้วนพับใหม่ ด้วยอาศัยการทำงานกับโปรตีนในเครือข่ายแชพเพอโรน[16-18] ส่วนรูปแบบที่ 2 ซึ่งเป็นแบบที่มีการยอมรับอย่างแพร่หลายมากกว่า เรียกว่า unfolding and threading mechanism model โดย Hsp104 ดึงแยกสายพอลิเพปไทด์เพียง 1 สายออกจากกลุ่มโปรตีน ส่งผ่านไปยังช่องตรงกลางของโครงสร้างวงแหวน จากนั้นจึงส่งต่อเข้าสู่การม้วนพับใหม่ โดยทำงานร่วมกับ Hsp70/Hsp40 ซึ่งคล้ายคลึงกับแชพเพอโรน Hsp100[19]

```
  1  MNDQTQFTER ALTILTLAQK LASDHQHPQL QPIHILAAFI ETPEDGSVPY
 51  LQNLIEKGRY DYDLFKKVVN RNLVRIPQQQ PAPAEITPSY ALGKVLQDAA
101  KIQKQQKDSF IAQDHILFAL FNDSSIQQIF KEAQVDIEAI KQQALELRGN
151  TRIDSRGADT NTPLEYLSKY AIDMTEQARQ GKLDPVIGRE EEIRSTIRVL
201  ARRIKSNPCL IGEPGIGKTA IIEGVAQRII DDDVPTILQG AKLFSLDLAA
251  LTAGAKYKGD FEERFKGVLK EIEESKTLIV LFIDEIHMLM GNGKDDAANI
301  LKPALSRGQL KVIGATTNNE YRSIVEKDGA FERRFQKIEV AEPSVRQTVA
351  ILRGLQPKYE IHHGVRILDS ALVTAAQLAK RYLPYRRLPD SALDLVDISC
401  AGVAVARDSK PEELDSKERQ LQLIQVEIKA LERDEDADST TKDRLKLARQ
451  KEASLQEELE PLRQRYNEEK HGHEELTQAK KKLDELENKA LDAERRYDTA
501  TAADLRYFAI PDIKKQIEKL EDQVAEEERR AGANSMIQNV VDSDTISETA
551  ARLTGIPVKK LSESENEKLI HMERDLSSEV VGQMDAIKAV SNAVRLSRSG
601  LANPRQPASF LFLGLSGSGK TELAKKVAGF LFNDEDMMIR VDCSELSEKY
651  AVSKLLGTTA GYVGYDEGGF LTNQLQYKPY SVLLFDEVEK AHPDVLTVML
701  QMLDDGRITS GQGKTIDCSN CIVIMTSNLG AEFINSQQGS KIQESTKNLV
751  MGAVRQHFRP EFLNRISSIV IFNKLSRKAI HKIVDIRLKE IEERFEQNDK
801  HYKLNLTQEA KDFLAKYGYS DDMGARPLNR LIQNEILNKL ALRILKNEIK
851  DKETVNVVLK KGKSRDENVP EEAEECLEVL PNHEATIGAD TLGDDDNEDS
901  MEIDDDLD*
```

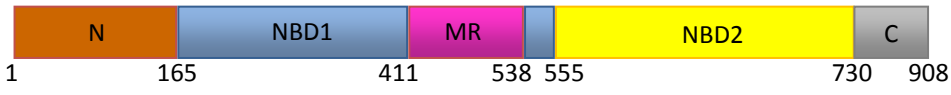

Figure 1 Amino acid sequences and domain organisation of *S. cerevisiae* Hsp104 protein. Hsp104 is composed of two conserved nucleotide binding domains (NBDs); NBD1 (blue), NBD2 (yellow), N-terminal domain (brown), middle region (pink) and C-terminal domain (grey) (YLL026W from http://www.yeastgenome.org)[10,13]

Table 2 Conserved motifs and residues in ClpB proteins and locations in Hsp104[10,16].

Motif	NBD	Conserved residues	Position
Walker A	1	Gly-Glu-Pro-Gly-Ile-Gly-Lys-Thr	212-219
	2	Gly-Leu-Ser-Gly-Ser-Gly-Lys-Thr	614-621
Walker B	1	Val-Leu-Phe-Ile-Asp-Glu-Val	280-285
	2	Val-Leu-Leu-Phe-Asp-Glu-Val	682-687
Sensor 1	1	Thr	317
	2	Asn	728
Sensor 2	2	Gly-Ala-Arg	824-826
Arginine finger	1	Arg-Arg	333-334
	2	Arg-Ile	765-766
Diaphragm loop	1	Lys-Tyr-Lys-Gly	256-259
	2	Gly-Tyr-Val-Gly	661-664

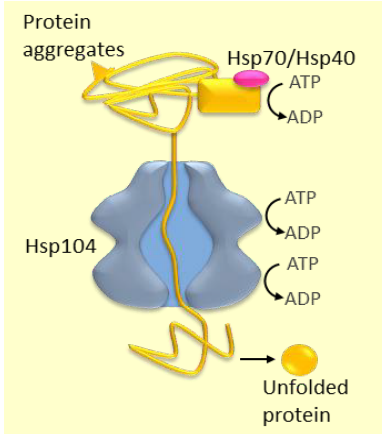

Figure 2 The substrate threading model for protein disaggregation by Hsp104[17].

พริออนคืออะไร

พริออน คือ โปรตีนที่ผิดปกติ หรือมีโครงสร้างเปลี่ยนไปจากเดิม โดยพริออนสามารถส่งต่อหรือถ่ายทอดจากเซลล์สู่เซลล์ได้ ซึ่งคล้ายกับการถ่ายทอดสารพันธุกรรม โปรตีนปกติในเซลล์เมื่อเกิดมีการม้วนพับผิดปกติ หรือมีโครงสร้างเป็นบีต้าชีตเพิ่มขึ้น โปรตีนนี้จึงเกิดการรวมกลุ่มกันได้ขนาดที่ใหญ่ขึ้น จากการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างบริเวณไฮโดรโฟบิกในโปรตีน เกิดเป็นพอลิเมอร์หรือไฟเบอร์ หรือเป็นอมัยลอยด์ไฟบริล (amyloid fibril) ที่มีสมบัติไม่ละลายน้ำซึ่งเป็นรูปแบบที่มีเสถียรภาพสูง ทนทานต่อสารเคมีซักล้าง โปรตีนชนิดอื่นที่มีความผิดปกติลักษณะเดียวกับในพริออน มักพบว่าเกี่ยวข้องกับกลุ่มอาการของโรคสมองเสื่อม (neurodegenerative diseases) ในมนุษย์ ซึ่งเกิดจากการสะสมของโปรตีนที่มีการม้วนพับผิดปกติในสมอง เช่น โรคอัลไซเมอร์ (alzhimer) โรคสมองฝ่อ (transmissible spongiform encephalopathies; TSEs) จากพริออน และโรคฮันติงตัน (huntington)[20] เป็นต้น แต่ในขณะเดียวกันพริออนสามารถพบได้ในจุลินทรีย์ เช่น รา หรือยีสต์ได้เช่นกัน โดยไม่เป็นสาเหตุของโรค ทั้งยังอาจส่งผลในแง่ที่เป็นประโยชน์ต่อเซลล์นั้นอีกด้วย[21-23] เช่น ยีสต์ที่สร้างอะดีนีนไม่ได้เพราะมีรหัสหยุดเพิ่มขึ้นในยีน แต่ถ้ายีสต์นั้นมีพริออนของโปรตีน Sup35 จะส่งผลให้แปลรหัสผ่านรหัสหยุดแล้วสร้างอะดีนีนได้ ซึ่งพริออนนี้เกิดจากโปรตีนในเซลล์เปลี่ยนแปลงจากปกติไปเป็นไอโซฟอร์มที่มีโครงสร้างตติยภูมิที่ต่างกัน จึงทำให้คุณสมบัติการทำงานในเซลล์แตกต่างไปจากเดิม

ยีสต์พริออน

ในยีสต์เองพบว่ามีโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างแล้วถ่ายทอดจากเซลล์สู่เซลล์ โดยไม่ได้เกิดจากการส่งต่อของสารพันธุกรรม ซึ่งถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อกว่า 50 ปีมาแล้วโดยให้ชื่อโปรตีนนี้ว่า [*PSI*$^+$] ซึ่งต่อมาจึงเรียกโปรตีนลักษณะนี้ว่ายีสต์พริออน (yeast prion)[23,24] มีรายงานการค้นพบโปรตีนปกติในยีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีคุณสมบัติเปลี่ยนไปเป็นพริออนต่างๆ แล้วอย่างน้อย 9 โปรตีน ที่สามารถถ่ายทอดและแพร่ขยายในรูปแบบที่เกาะกลุ่มรวมกันเป็นพอลิเมอร์คล้ายกับอมัยลอยด์ (amyloid-like aggregated forms) หรือพริออน ได้แก่ โปรตีน Sup35 Ure2 Rnq1 Swi1 Cyc8 Mot3 Pma1/Std1 และ Sfp1 เป็นต้น[25]

[*PSI*$^+$] ไอโซฟอร์มเป็นชื่อเรียกรูปแบบพริออนของโปรตีน Sup35 ในยีสต์ ซึ่งจัดเป็น translational termination factor; eRF3 ในพวกยูคาริโอต เกี่ยวข้องกับการหยุดการแปลรหัสสร้างโปรตีน ยีสต์สายพันธุ์ [*PSI*$^+$] มี Sup35 เปลี่ยนมาอยู่ในรูปพริออน แล้วส่งผลให้เกิดความบกพร่องไม่จดจำรหัสหยุด (stop codons) การสังเคราะห์โปรตีน[26] เช่น ยีสต์ที่มี [*PSI*$^+$] ในเซลล์กลายพันธุ์แบบ *ade1-14* (UGA) สามารถตรวจพบและแยกออกจากยีสต์ที่เป็น [*psi*$^-$] เพราะมีการกลายพันธุ์แบบ nonsense คือ มีรหัสหยุด (UGA) เพิ่มขึ้นตรงบริเวณยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนเพื่อผลิตอะดีนีนจึง สังเคราะห์อะดีนีนไม่ได้ และมีการสะสมสารสีแดง โดยยีสต์กลายพันธุ์แบบ *ade1-14* ที่เป็น [*psi*$^-$] จะอ่านพบรหัสหยุดก่อนจะได้โปรตีนที่สมบูรณ์ ทำให้ยีสต์นี้เจริญได้เมื่อเติมอะดีนีนให้เท่านั้น และมีโคโลนีสีแดง แต่ถ้ายีสต์นั้นมี [*PSI*$^+$] พริออนอยู่จะไปกดการแสดงออกของ *ade1-14* nonsense allele ได้ (Figure 3) เพราะไม่จดจำรหัสหยุด จึงสามารถอ่านผ่านรหัส UGA ไปจนกระทั่งสังเคราะห์ได้อะดีนีนออกมา ยีสต์จึงเจริญได้โดยไม่ต้องเติมอะดีนีน และโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีขาว[27] จากสีของโคโลนีที่แตกต่างกันนี้ จึงนิยมนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยสำหรับบ่งชี้การมีหรือไม่มี [*PSI*$^+$] ในเซลล์ยีสต์ นอกจากนี้ยังพบว่าสภาวะ [*PSI*$^+$] สามารถถูกขจัดให้หมดไปจากเซลล์ยีสต์ได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมสารกวานีดีนไฮโดรคลอไรด์ (GdnHCl) เนื่องจากสารนี้มีผลยับยั้งกิจกรรมของ Hsp104[12,28] แสดงให้เห็นว่า Hsp104 มีความสำคัญต่อการคงอยู่ของพริออนในยีสต์

โครงสร้างของโปรตีน Sup35

หน้าที่ของ Sup35 แต่เดิมคือหยุดการแปลรหัสสังเคราะห์โปรตีน (eRF3) โดยทำหน้าที่ร่วมกับ Sup45 (eRF1) จดจำรหัสหยุดการสร้างโปรตีน แล้วส่งเสริมให้เกิดการปลดปล่อยสายพอลิเพปไทด์ที่สร้างเสร็จสิ้นแล้ว (Figure 3) และ Sup35 ยังทำงานร่วมกับ poly(A)-binding protein (Pab1) เพื่อช่วยให้เกิดการสลายตัวของ mRNA ถ้าเซลล์มี [*PSI*$^+$] อยู่โปรตีน Sup35 จะถูกเหนี่ยวนำให้ไปรวมกับพริออน เกิดเป็นกลุ่มก้อนใหญ่เรียกว่าไฟบริล จึงไม่เหลือ Sup35 ปกติเพื่อทำหน้าที่เดิมภายในเซลล์ ส่งผลให้การสังเคราะห์โปรตีนบางชนิดเกิดการอ่านข้ามผ่านรหัสหยุดไป จึงอาจไม่ได้สายพอลิเพปไทด์ที่ถูกต้องสมบูรณ์[26]

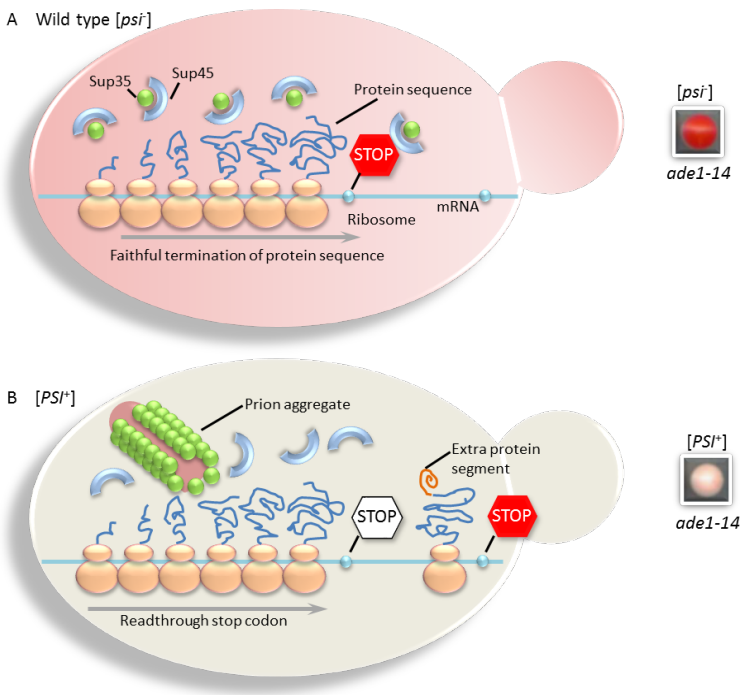

Figure 3 Protein translation and the effects of normal Sup35 and it *[PSI$^+$]* form in yeast[27].

Sup35 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 76.5 กิโลดาลตัน (Figure 4) ประกอบด้วย 3 โดเมน ได้แก่ N-terminal domain (ตั้งแต่ 1-123) M (middle) domain (ตั้งแต่ 124-253) และ C-terminal domain (ตั้งแต่ 254-685)[29] ส่วนของ Prion domain (PrD; aa 1-97) อยู่บริเวณกรดอะมิโนลำดับที่ 123 ของบริเวณปลาย N ซึ่งมีกรดอะมิโน Q/N จำนวนมากเป็นเพปไทด์ที่เรียงซ้ำๆ กันอยู่ 9 เพปไทด์ เช่น PQGGYQQYN ซึ่งคล้ายคลึงกับบริเวณที่ซ้ำกันที่พบในพริออนของมนุษย์ เช่น PH GGGWGQ[30] ส่วน PrD ของ Sup35 ประกอบด้วย 2 บริเวณย่อย คือ QN-rich region (QNR; aa 1-40) เป็นกรดอะมิโนที่มีขั้วและไม่มีประจุ ซึ่งลำดับกรดอะมิโนตำแหน่ง 8-26 นี้จำเป็นสำหรับการเพิ่มขยายพริออน[30] และส่วน oligopeptide region (OPR; aa 41-97) ซึ่งมีโอลิโกเพปไทด์ 5.5 เพปไทด์ที่ซ้ำๆ กัน[30] บริเวณ PrD ซึ่งสำคัญกับการสร้าง และการเพิ่มขยายของ [*PSI*$^+$] พริออน เนื่องจากเมื่อมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นที่บริเวณ QNR หรือ OPR จะส่งผลให้เกิดความบกพร่องในการเพิ่มขยาย [*PSI*$^+$][32] รวมไปถึงบริเวณปลาย N เมื่อนำเฉพาะบริเวณ N ไปแสดงออกในเซลล์ที่มี [*PIN*$^+$] พบว่าสามารถส่งเสริมการก่อตัวใหม่ของ [*PSI*$^+$] พริออนในเซลล์นี้ได้ ดังนั้นบริเวณ N จึงมีความสำคัญกับการก่อตัวใหม่ของพริออนในเซลล์ยีสต์[32,33]

บริเวณ M ของ Sup35 ประกอบด้วยกรดอะมิโนพวกที่มีขั้วสูงและมีประจุบวก เช่น ไลซีน[15] ส่วน M นี้ไม่จำเป็นสำหรับการเพิ่มขยายพันธุ์ [*PSI*$^+$] แต่สำคัญต่อความเสถียรของ Sup35 ในระหว่างการแบ่งเซลล์[34] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่ากรดอะมิโนจำนวน 20 ตัว (aa 129-148) ของบริเวณ M จำเป็นต่อการทำงานของ Hsp104 เพราะเป็นบริเวณที่จะจับกับ Hsp104 แล้วกระตุ้นให้เอนไซม์ ATPase เกิดการทำงาน[35] บริเวณ C ของ Sup35 ไม่จำเป็นสำหรับการเพิ่มขยาย [*PSI*$^+$] แต่มีส่วนช่วยการทำงานภายในเซลล์ของ Sup35 ในการหยุดการสังเคราะห์โปรตีน[36] โดยส่วน C มีบริเวณอนุรักษ์ที่ใช้จับกับ GTP และ Sup45 เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการปลดปล่อยสายพอลิเพปไทด์หลังการสังเคราะห์โปรตีนเสร็จสิ้น[37]

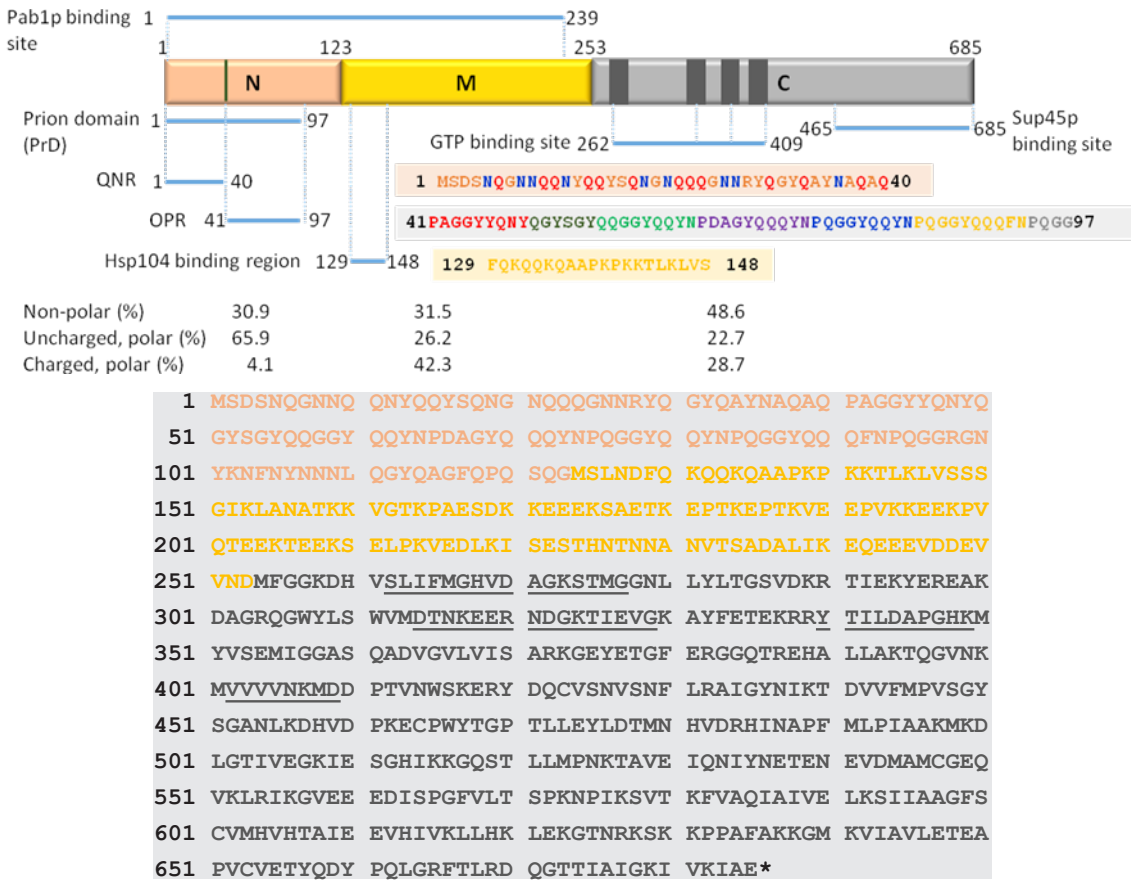

Figure 4 **Structure of *S. cerevisiae* Sup35 and amino acid sequences.** N, M and C refer to the N-terminal (orange), middle (yellow) and C-terminal (grey) regions of Sup35, respectively. Grey underlines represent the four GTP binding sites of the C region (YDR172W from http://www.yeastgenome.org and http://www.uniprot.org)[31,35,43,44].

บทบาทของ Hsp104 ในการเพิ่มขยาย [*PSI*$^+$] พริออน (prion propagation)

โมเลกูลาร์แชพเพอโรน Hsp104 นอกจากจะสำคัญต่อการตอบสนองในสภาวะกดดันของยีสต์ โดยช่วยแยกโปรตีนออกจากกลุ่มที่เสียสภาพแล้วนั้น ยังพบว่าจำเป็นสำหรับการคงอยู่และเพิ่มขยายทั้งใน [*PSI*$^+$] พริออน และยีสต์พริออนชนิดอื่น พริออนในยีสต์มักสูญหายไปจากเซลล์ เมื่อยีสต์นั้นไม่มีแชพเพอโรน Hsp104 ทั้งจากการนำยีนออกไปหรือทำให้กลายพันธุ์ และการถูกยับยั้งการทำงานด้วยสาร GdnHCl ซึ่งทำให้สูญเสียกิจกรรมของ Hsp104 รวมไปถึงกรณีที่มีระดับแสดงออกของยีน *HSP104* สูงกว่าปกติ (over-expression) ทั้งหมดนี้ส่งผลให้ [*PSI*$^+$] พริออน ถูกขจัดไปจากเซลล์เกิดเป็นสภาวะ [*psi*$^-$] แสดงให้เห็นว่าในเซลล์ยีสต์ควรมีปริมาณของ Hsp104 อยู่ในระดับกลางไม่มากหรือน้อยเกินไป จึงมีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะช่วยให้ [*PSI*$^+$] พริออนยังคงอยู่ในเซลล์ต่อไปได้ การนำยีน *HSP104* ออกจากยีสต์ส่งผลให้ลักษณะฟีโนไทป์ที่เป็น [*PSI*$^+$] ของยีสต์หายไปเกิด [*psi*$^-$] เรียกว่า psi-no-more หรือ PNM เพราะยีสต์นั้นจะไม่สามารถกลับมาสู่สภาวะแบบ [*PSI*$^+$] ได้อีกจนกว่าจะนำยีน *HSP104* ใส่กลับเข้าไป แล้วจึงนำ [*PSI*$^+$] พริออนใส่เข้าสู่เซลล์ยีสต์อีกครั้ง[12] แม้ว่า Hsp104 มีความสำคัญในการเพิ่มขยายของพริออนอื่นในยีสต์เช่น [*URE3*] และ [*PIN*$^+$] แต่การมี Hsp104 ปริมาณสูงในเซลล์กลับไม่ส่งผลให้พริออนทั้ง 2 ชนิดสูญหายไปจากเซลล์[33,38] มีเพียง [*MOD*$^+$] พริออน ที่พบว่าถูกขจัดออกจากเซลล์ได้ เมื่อมีการแสดงออกของ Hsp104 ในระดับสูงเช่นเดียวกับใน [*PSI*$^+$][39] มีรายงานว่า Hsp104 สามารถตัดหรือแยกให้โปรตีน Sup35 หรือ Ure2 ที่รวมกลุ่มกันอยู่มีขนาดโมเลกุลเล็กลงได้ และเมื่อนำกลุ่มโปรตีนขนาดเล็กนี้ไปถ่ายทอดเข้าสู่เซลล์ พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้โปรตีนปกติในเซลล์เปลี่ยนเป็นสภาวะพริออน[40,41] นอกจากนี้การมี Hsp104 ระดับสูงอยู่เป็นเวลานาน ส่งผลให้ความสามารถของไฟบริล [*URE3*] ที่จะไปเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะพริออนในเซลล์สูงขึ้น แต่ในทางตรงกันข้ามพบว่าไฟบริล

[*PSI*$^+$] มักอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้และไม่เหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะพริออน[41] ดังนั้นผลที่เกิดของ Hsp104 ต่อการเพิ่มขยายพริออนจึงขึ้นอยู่กับทั้งระดับ Hsp104 ในเซลล์ และชนิดของพริออน

มีการศึกษาพบว่าแชพเพอโรน Hsp104 สามารถจับกับ Sup35 แล้วทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง Hsp104 และการทำงานของ ATPase ซึ่งช่วยยืนยันได้ว่า Hsp104 และ Sup35 น่าจะมีการทำงานร่วมกันในกิจกรรมบางอย่างในเซลล์[42,43] จึงมีความพยายามศึกษาถึงความสัมพันธ์ของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้ ซึ่งนำไปสู่การเสนอรูปแบบ เพื่อใช้อธิบายถึงบทบาทของ Hsp104 ต่อการเพิ่มขยายพริออนในยีสต์ 2 รูปแบบ (Figure 5) ได้แก่ รูปแบบที่ 1 Hsp104 กระตุ้นให้ Sup35 เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปอยู่ในรูปของ oligomeric intermediate แล้วทำให้เกิดการรวมกลุ่ม และมีขนาดใหญ่ขึ้นจนกระทั่งอยู่ในสภาวะ [*PSI*$^+$] พริออน[12,29,44,45] อย่างไรก็ตามพบว่าการแสดงออกของ Sup35 ในระดับที่สูงขึ้นจะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง [*PSI*$^+$] พริออนได้เมื่อไม่มี Hsp104 ในเซลล์ แสดงว่า Hsp104 อาจไม่มีความจำเป็นต่อการก่อตัวใหม่ของ Sup35 ในรูปของ oligomeric intermediate ก่อนจะเข้าสู่สภาวะพริออน[33] สำหรับรูปแบบที่ 2 Hsp104 ไปดึงสายพอลิเพปไทด์ออกจากพริออน ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนก้อนใหญ่ ทำให้ถูกแบ่งแยกเป็นกลุ่มย่อยๆ จนกระทั่งได้โปรตีนที่อนุภาคขนาดเล็กลงและมีคุณสมบัติเป็นเหมือนพริออนตั้งต้นเรียกว่า พรอพากอน (propagon) หรือ seed สำหรับการเพิ่มขยายจำนวนกลายเป็นพริออนในเซลล์ต่อไป[46] พรอพากอนนี้ถูกถ่ายทอดต่อให้กับเซลล์ลูกของยีสต์ในระหว่างการแตกหน่อเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วจึงมีการเพิ่มขยายในเซลล์ลูกโดยการเหนี่ยวนำ Sup35 ปกติให้เข้ามารวมกลุ่มกับพรอพากอน จนกระทั่งขยายขนาดเป็นพริออนไฟบริล ส่งผลให้สภาวะ [*PSI*$^+$] พริออนยังคงอยู่ต่อไป[29,47] มีรายงานการวิจัยพบว่า Hsp104 ทำหน้าที่แยกพอลิเพปไทด์แต่ละสายออกจากกลุ่มโปรตีน แล้วดึงผ่านช่องตรงกลางวงแหวนหกหน้าของ Hsp104 ซึ่งข้อมูลนี้สนับสนุนการทำงานของ Hsp104 ตามรูปแบบที่ 2 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขยายพริออน โดยที่พริออนถูกแบ่งเป็นชิ้นๆ ที่ขนาดเล็กลง ดังนั้นกลไกการทำงานแบบนี้ของ Hsp104 จึงจำเป็นสำหรับการแยกโปรตีนออกจากการรวมกลุ่ม และช่วยในการเพิ่มขยายพริออน[47] นอกจากนี้ยังพบว่าการยับยั้งกิจกรรมของ ATPase ใน Hsp104 ด้วย GdnHCl ทำให้ Hsp104 ไม่สามารถดึงแยกพริออนได้ จึงไม่มีการสร้างพรอพากอนใหม่ออกมา เมื่อไม่มีโมเลกุลตั้งต้นพริออน จึงไม่มีการเพิ่มขยาย[48] (Figure 5) หน้าที่ของ Hsp104 ในการแยกโปรตีนออกจากการรวมกลุ่มต้องทำงานร่วมกับแชพเพอโรนสนับสนุน Hsp70 (Ssa1/2) ซึ่งไปจับกับ Sup35 ที่บริเวณ PrD ของเซลล์ที่เป็น [*PSI*$^+$][49] โดยคาดว่าทั้ง Hsp40 (Sis1) และ Hsp70 น่าจะมีส่วนช่วยในการนำโปรตีน เพื่อส่งผ่านช่องตรงกลางของ Hsp104 (Figure 6)[50] อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า ในกรณีที่ไม่มี Hsp70 (Ssa1) พบว่า Hsp104 เพียงลำพังสามารถดึงแยกสายพอลิเพปไทด์ออกจากกลุ่มโปรตีนที่เสียสภาพ และพริออน Sup35 และ Ure3 ได้โดยผ่านการไฮโดรไลซ์ ATP[51] สรุปได้ว่ากระบวนการดึงแยกโปรตีนออกจากกลุ่มของ Hsp104 เกิดขึ้นได้ทั้งแบบอาศัยและไม่อาศัย Hsp70 (Figure 6)

ผลของระดับ Hsp104 สูงต่อการเพิ่มขยาย [*PSI*$^+$] พริออน

ตามข้อมูลข้างต้น Hsp104 ทำหน้าที่ในการเพิ่มขยายพริออนภายในเซลล์ โดยทำให้พริออนพอลิเมอร์ขนาดใหญ่แยกออกเป็นหลายโมเลกุลย่อย ซึ่งสามารถถ่ายทอดไปยังเซลล์ลูกได้ แต่พบว่าหาก Hsp104 มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มสูงมากจะส่งผลให้ [*PSI*$^+$] ถูกขจัดออกจากเซลล์อย่างรวดเร็ว ในการเจริญในระยะ exponential phase โดยไม่มีผลกระทบต่ออัตราการรอดชีวิตของยีสต์[12] แต่ระดับที่เพิ่มขึ้นของ Hsp104 ภายใต้สภาวะฮีทช็อค (heat shock) ไม่มีผลขจัด [*PSI*$^+$] พริออน อาจเนื่องจากมีฮีทช็อคโปรตีนอื่นในเซลล์ที่เพิ่มขึ้นด้วย เช่น Hsp70 จึงช่วยในการปกป้อง [*PSI*$^+$] จากการถูกขจัดได้[52] แม้ว่าปริมาณที่สูงขึ้นกว่าปกติของ Hsp104 สามารถขจัด [*PSI*$^+$] พริออนได้ แต่ [*PSI*$^+$] สามารถก่อตัวขึ้นใหม่ได้ถ้าในเซลล์ยีสต์มี [*PIN*$^+$] อยู่ และมีระดับของ Sup35 ที่สูงพอ[40,53] มีการเสนอกลไกว่าเพราะเหตุใดเซลล์ที่มี Hsp104 อยู่ในระดับที่สูงจึงสามารถขจัด [*PSI*$^+$] ได้ไว้หลายสมมุติฐานด้วยกัน เช่น สมมุติฐานหนึ่งคาดว่าระดับที่สูงของ Hsp104 ทำให้ Sup35 พอลิเมอร์ถูกแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์จนกระทั่งได้ Sup35 ในรูปปกติเท่านั้น ไม่มีการสร้างพรอพากอนใหม่ เพื่อตั้งต้นการเพิ่มขยายพริออน[46,53] และพบการเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้นของ Sup35 พอลิเมอร์ได้ใน [*PSI*$^+$] เซลล์ที่มียีน *HSP104* ถูกกดการแสดงออก ไม่มีกิจกรรมดึงแบ่งพอลิเมอร์ เพื่อผลิตพรอพากอน ข้อมูลนี้สนับสนุนว่าการขจัด [*PSI*$^+$] ออกจากเซลล์น่าจะเกิดจากกิจกรรมที่สมบูรณ์ของ Hsp104 ในการแยกโปรตีนออกจากกลุ่มขนาดใหญ่[54] อย่างไรก็ตามอีกสมมุติฐานหนึ่งพบว่าการกลายพันธุ์ที่บริเวณปลาย N (aa 1-165) ของ Hsp104 ไม่กระทบต่อการตอบสนองของ Hsp104 ต่ออุณหภูมิสูง แต่มีผลกับการคงอยู่ของ [*PSI*$^+$] แสดงให้เห็นว่าบริเวณปลาย N ไม่จำเป็นสำหรับหน้าที่ตามปกติของ Hsp104 และการแยกโปรตีนออกจากกลุ่มในสภาวะอุณหภูมิสูง แต่มีความสำคัญต่อการขจัด [*PSI*$^+$] เมื่อมีปริมาณ Hsp104 ในระดับสูง[53] จากผลการศึกษาเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าการขจัด [*PSI*$^+$] ในสภาวะ

ที่ระดับ Hsp104 สูงกว่าปกติไม่ได้เกิดขึ้นง่ายๆ ด้วยกิจกรรมตามปกติของ Hsp104 ในการแยกโปรตีนออกจากพริออนพอลิเมอร์ได้สมบูรณ์ ดังนั้นการขจัด [*PSI*$^+$] จากเซลล์ด้วย Hsp104 ปริมาณสูง อาจเกิดจากกลไกการทำงานอื่นที่แตกต่างออกไป ต่อมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการทำงานร่วมกันของ Hsp104 กับกลุ่มแชพเพอโรน Hsp90 ได้แก่ Cpr7 และ Sti1 โดยทำการกลายพันธุ์ด้วยการนำยีนแชพเพอโรนทั้ง 2 ชนิดออกจากเซลล์ แล้วพบว่าไม่เกิดการขจัด [*PSI*$^+$] เมื่อมี Hsp104 ปริมาณมาก[56,57] แสดงว่าโปรตีน Hsp104 ไม่เพียงทำงานร่วมกับ Hsp70 และ Hsp40 เท่านั้น แต่ยังมีการทำงานร่วมกับแชพเพอโรน Sti1 และ Cpr7 อีกด้วย และมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขจัดพริออนออกจากเซลล์ ซึ่งแชพเพอโรนทั้ง 2 ชนิดนี้ สามารถจับกับบริเวณโมทีฟโดเมน tetra-tricopeptide repeat (TPR-binding motif) ที่ปลาย C ของ Hsp104 ได้[58] นอกจาก Hsp104 แล้ว Sti1 และ Cpr7 ยังทำงานร่วมกับ Hsp70 ด้วยเช่นกัน[59,60] แล้วยังพบอีกว่าในยีสต์ [*PSI*$^+$] ที่มีการกลายพันธุ์ที่บริเวณ NBD1 และ NBD2 ของ Hsp104 ซึ่งทำให้ไม่มีกิจกรรมของ ATPase ต้องเกิดการขจัด [*PSI*$^+$] ออกจากเซลล์ แต่การขจัดแบบนี้จะไม่เกิดขึ้นถ้าในเซลล์นั้นไม่มี Cpr7 และ Sti1 อยู่ด้วย[12,56] สรุปได้ว่าแชพเพอโรน Cpr7 และ Sti1 มีส่วนสำคัญในการขจัด [*PSI*$^+$] แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขยาย [*PSI*$^+$] พริออนในเซลล์ นอกจากนี้ Cox et al (2003)[61] ได้เสนอว่าระดับของ Hsp104 ที่เพิ่มขึ้นอาจส่งผลต่อสัดส่วนการถ่ายทอดพรอพากอนจากเซลล์แม่สู่ลูก (π) ซึ่งสอด คล้องกับการค้นพบที่ว่า การเพิ่มขึ้นของระดับ Hsp104 ในเซลล์ทำให้ค่า π ลดลง หรือเซลล์ลูกได้รับถ่ายทอดพรอพากอนน้อยลงนั่นเอง จนกระทั่งไม่มีพรอพากอนเหลือตั้งต้นในเซลล์ลูก[62] ซึ่งอาจเกิดจากการขัดขวาง หรือมีความบกพร่องบางอย่างในการส่งต่อพรอพากอนสู่เซลล์ลูก อย่างไรก็ตามการศึกษายีสต์โปรตีนในกลุ่ม cytoskeleton/polarisome เช่น Sir2 Spa2 Hof1 และโปรตีน formin Bni1 ซึ่งทำหน้าที่ร่วมกับ Hsp104 ในการควบคุมการขนส่งโปรตีนต่างๆ จากเซลล์แม่สู่ลูกให้เกิดขึ้นในสัดส่วนที่เหมาะสม เพื่อช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการส่งผ่านโปรตีนเสียสภาพ และเกาะกลุ่มกันต่อไปยังเซลล์ลูกได้[63-65] มีรายงานการวิจัยพบว่าการนำโปรตีนเหล่านี้ออก มีผลต่อการถ่ายทอดพรอพากอนเพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่กระทบโดยตรงต่อการเพิ่มขยาย และการขจัด [*PSI*$^+$] พริออน เมื่อมีระดับของ Hsp104 เพิ่มขึ้น[66] แสดงว่าการเพิ่มขึ้นของ Hsp104 ก่อให้เกิดการรบกวนขั้นตอนการส่งพรอพากอนสู่เซลล์ลูกด้วยกลไกที่ไม่อาศัยการกิจกรรมของ Sir2 Hof1 Spa2 และ Bnr1 แต่ยังมีโปรตีนในกลุ่มนี้ คือ Btn2 ซึ่งพบว่าสามารถทำงานร่วมกับ Sis1 ในการขจัดพริออนชนิดอื่นจากยีสต์ได้[67,68] ทั้งนี้ยังไม่มีการศึกษาถึงความเกี่ยวข้องกับ [*PSI*$^+$] โดยตรง

ต่อมาในปี ค.ศ. 2018 Greene et al[69] ได้เสนอแนวคิดของการขจัด [*PSI*$^+$] เมื่อ Hsp104 มีปริมาณสูง ว่าไม่ได้เกิดขึ้นจากทั้งการยับยั้งกิจกรรมของ Hsp104 จนกระทั่งไม่มีพรอพากอน และการส่งต่อพรอพากอนแบบไม่สมมาตรจากเซลล์แม่สู่ลูก แต่เกิดจาก [*PSI*$^+$] พริออนถูกทำให้สลายตัวไปหมดจึงไม่มีพรอพากอน ด้วยกิจกรรมการตัดแต่ง (trimming activity) ของ Hsp104 โดยการตัดแยกโปรตีนที่เป็นหน่วยย่อยออกจากพริออนพอลิเมอร์จนหมด ซึ่งแตกต่างจากกลไกการดึงแยกสายพอลิเพปไทด์ เพราะการตัดแต่งแบบนี้ไม่ทำให้เกิดพรอพากอนใหม่

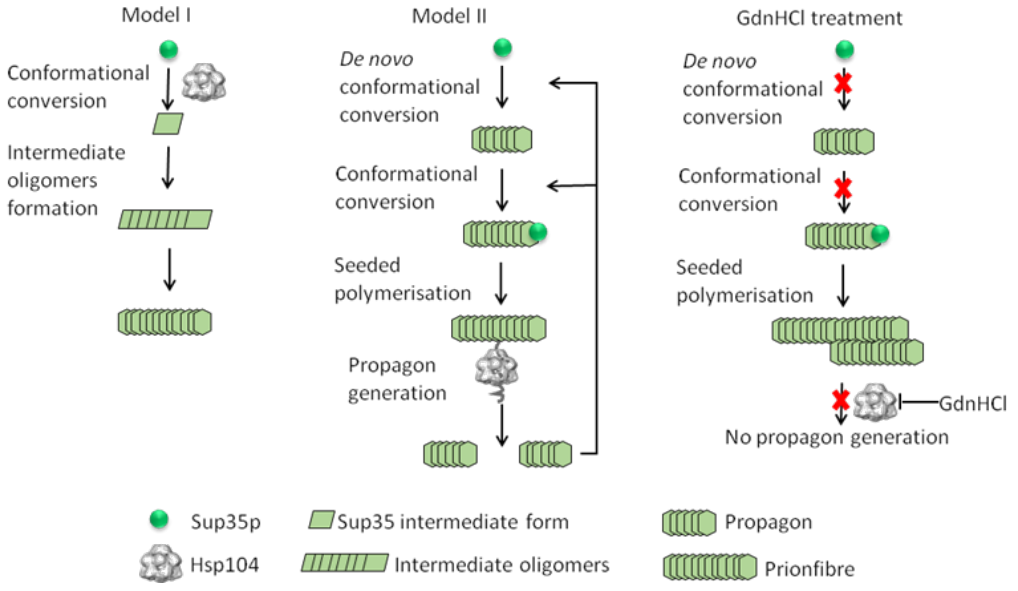

Figure 5 Two proposed models of Sup35 prion propagation and the model of Hsp104 function inhibited by GdnHCl[46,53].

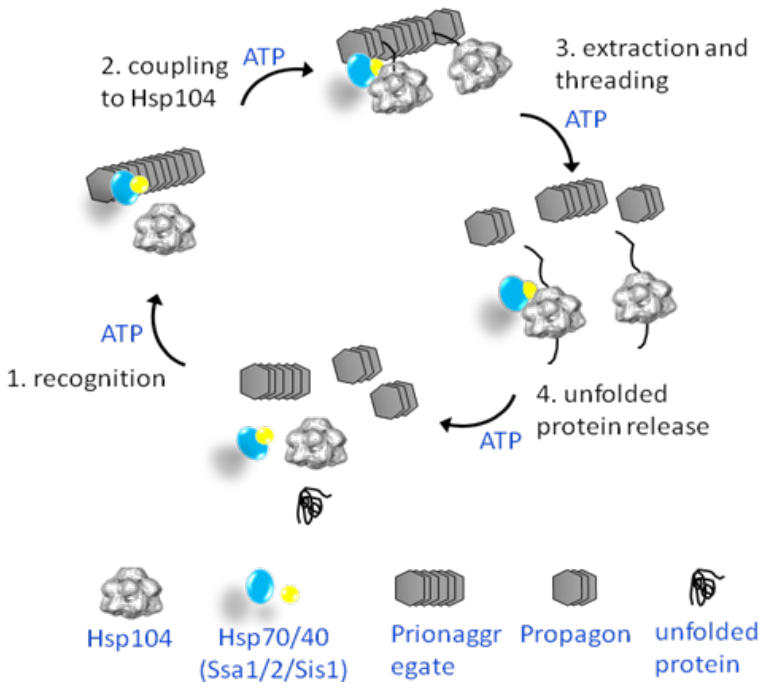

Figure 6 Proposed model of Hsp104 cooperation with the Hsp70/40 system in propagating yeast prions[48,55].

จากข้อมูลทั้งหมดนี้ แสดงว่ากระบวนการขจัด [*PSI*$^+$] ยังคงต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม เพื่อให้ได้มาซึ่งกลไกการทำงานของ Hsp104 ปริมาณสูง ที่ส่งผลให้พริออนถูกขจัดออกไป โดยข้อมูลที่จะได้นี้อาจเป็นประโยชน์ต่อการรักษาโรคทางระบบประสาทและสมองในมนุษย์ ซึ่งเกิดจากการสะสมโปรตีนที่มีโครงสร้างผิดปกติจนเป็นกลุ่มอมัยลอยด์จำนวนมากในสมอง ในปัจจุบันได้มีความพยายามค้นคว้าหานวัตกรรม เพื่อใช้ในการบำบัดและรักษา เช่น การทำให้โปรตีนถูกแยกออกจากกลุ่มก้อนใหญ่ และกลับไปทำหน้าที่ตามปกติ ซึ่งในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ยังไม่พบว่ามีกิจกรรมของโปรตีนใดที่มีคุณสมบัติแบบนี้อย่างชัดเจน ตรงกันข้ามกับในยีสต์ เชื้อรา และแบคทีเรีย ที่มีแชพเพอโรนโปรตีน โดยเฉพาะ Hsp104 ในยีสต์ที่สามารถกำจัด หรือช่วยให้โปรตีนผิดปกติกลับสู่สภาวะปกติได้ และยังมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับทั้งการคงอยู่ การเพิ่มขยาย และการขจัดพริออน จึงอาจเป็นทางเลือกที่ดีในการใช้เป็นต้นแบบสำหรับศึกษา และประยุกต์ใช้ในการต่อสู้กับโรคทางสมองในมนุษย์ต่อไป[70]

สรุป

แชพเพอโรน Hsp104 มีหน้าที่ในการช่วยให้ยีสต์อยู่รอดในสภาวะที่กดดัน เช่น ฮีทช็อค โดยแยกโปรตีนหน่วยย่อยออกจากกลุ่มโปรตีนที่เสียสภาพ อาศัยการทำงานร่วมกับเครือข่ายแชพเพอโรนสนับสนุน เพื่อช่วยให้โปรตีนนั้นเกิดการม้วนพับใหม่ และกลับสู่รูป แบบปกติ Hsp104 ยังมีหน้าที่สำคัญในการส่งเสริมการคงอยู่ และการเพิ่มขยายจำนวนยีสต์พริออนโดยเฉพาะ [*PSI*$^+$] พริออน Hsp104 เข้าจับกับโปรตีนเป้าหมาย กระตุ้นให้ ATPase ทำงานไฮโดรไลซ์ ATP แล้วดึงแยกสายพอลิเพปไทด์ออกจากกลุ่มโปรตีน จึงส่งผลให้เกิดโปรตีนที่มีขนาดเล็กสำหรับถ่ายทอดสู่เซลล์ลูก และใช้ในการตั้งต้นการเพิ่มขยายพริออนครั้งใหม่ นอกจากนี้ในสภาวะที่มีระดับ Hsp104 สูงมากยังส่งผลให้เกิดการขจัด [*PSI*$^+$] ออกจากเซลล์ยีสต์นั้นๆ ได้ ซึ่งเกิดขึ้นจากกิจกรรมของ Hsp104 ที่แตกต่างไปจากปกติ และยังไม่สามารถสรุปกลไกได้อย่างชัดเจน

เอกสารอ้างอิง

1. Craig EA, Gambill BD, Nelson RJ. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. Microbiol Rev 1993 Jun 1;57(2):402-414.
2. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. EMBO J 1982 Aug 1;1(8):945-951.
3. Hanson PI, Whiteheart SW. AAA$^+$ proteins: have engine, will work. Nat Rev Mol Cell Biol 2005 Jul 1;6(7):519-529.
4. Schirmer EC, Glover JR, Singer MA, Lindquist S. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. Trends Biochem Sci 1996 Aug 1;21(8):289-296.
5. Dougan DA, Mogk A, Zeth K, Turgay K, Bukau B. AAA$^+$ proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime. FEBS Lett 2002 Oct 2;529(1):6-10.
6. Lindquist S, Kim G. Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. Proc Natl Acad Sci U S A 1996 May 28; 93(11):5301-5306.
7. Sanchez Y, Taulien J, Borkovich KA, Lindquist S. Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. EMBO J 1992 Jun 1;11(6):2357-2364.
8. Parsell DA, Sanchez Y, Stitzel JD, Lindquist S. Hsp104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide-binding sites. Nature 1991 Sep 19;353(6341):270-273.
9. Doyle SM, Wickner S. Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. Trends Biochem Sci 2009 Jan 1;34(1):40-48.
10. Parsell DA, Taulien J, Lindquist S. The role of heat-shock proteins in thermotolerance. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1993 Mar 29;339(1289):279-85: 285-6.
11. Ogura T, Whiteheart SW, Wilkinson AJ. Conserved arginine residues implicated in ATP hydrolysis, nucleotide-sensing, and inter-subunit interactions in AAA and AAA$^+$ ATPases. J Struct Biol 2004 Apr 1;146(1-2):106-112.
12. Chernoff YO, Lindquist SL, Ono B, Inge-Vechtomov SG, Liebman SW. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [*PSI*$^+$]. Science 1995 May 12;268(5212):880-884
13. Bosl B, Grimminger V, Walter S. Substrate binding to the molecular chaperone Hsp104 and its regulation

by nucleotides. J Biol Chem 2005 Nov 18;280(46):38170-38176.

14. Lum R, Niggemann M, Glover JR. Peptide and protein binding in the axial channel of Hsp104. Insights into the mechanism of protein unfolding. J Biol Chem 2008 Oct 31;283(44):30139-30150.
15. Cashikar AG, Schirmer EC, Hattendorf DA, Glover JR, Ramakrishnan MS, Ware DM, et al. Defining a pathway of communication from the C-terminal peptide binding domain to the N-terminal ATPase domain in a AAA protein. Mol Cell 2002 Apr 9(4):751-760.
16. Bosl B, Grimminger V, Walter S. The molecular chaperone Hsp104--a molecular machine for protein disaggregation. J Struct Biol 2006 Oct 1; 156(1):139-148.
17. Tyedmers J, Mogk A, Bukau B. Cellular strategies for controlling protein aggregation. Nat Rev Mol Cell Biol 2010 Oct 14;11(11):777-788.
18. Hattendorf DA, Lindquist SL. Cooperative kinetics of both Hsp104 ATPase domains and interdomain communication revealed by AAA sensor-1 mutants. EMBO J 2002 Jan 15;21(1-2):12-21.
19. Lee S, Sowa ME, Choi JM, Tsai FT. The ClpB/Hsp104 molecular chaperone-a protein dis-aggregating machine. J Struct Biol 2004 Apr 1; 146(1-2):99-105.
20. Koo EH, Lansbury PT Jr, Kelly JW. Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration. Proc Natl Acad Sci U S A 1999 Aug 31;96(18):9989-9990.
21. Coustou V, Deleu C, Saupe S, Begueret J. The protein product of the *het-s* heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog. Proc Natl Acad Sci U S A 1997 Sep 2;94(18):9773-9778.
22. Eaglestone SS, Cox BS, Tuite MF. Translation termination efficiency can be regulated in *Saccharomyces cerevisiae* by environmental stress through a prion-mediated mechanism. EMBO J 1999 Apr 1;18(7):1974-1981.
23. True HL, Lindquist SL. A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. Nature 2000 Sep 28;407(6803):477-483.
24. Tuite MF, Staniforth GL, Cox BS. [*PSI*$^+$] turns 50. Prion 2015 Dec 21;9(5):318-332.
25. Crow ET, Li L. Newly identified prions in budding yeast, and their possible functions. Semin Cell Dev Biol 2011 Jul 22;(5):452-459.
26. Stansfield I, Jones KM, Kushnirov VV, Dagkesamanskaya AR, Poznyakovski AI, Paushkin SV, et al. The products of the SUP45 (eRF1) and SUP35 genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J 1995 Sep 1;14(17):4365-4373.
27. Partridge L, Barton NH. Evolving evolvability. Nature 2000 Sep 28;407(6803):457-458.
28. Tuite MF, Cox BS. Propagation of yeast prions. Nat Rev Mol Cell Biol 2003 Nov 1;4(11):878-890.
29. Patino MM, Liu JJ, Glover JR, Lindquist S. Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. Science 1996 Aug 2;273(5275):622-626.
30. DePace AH, Santoso A, Hillner P, Weissman JS. A critical role for amino-terminal glutamine/asparagine repeats in the formation and propagation of a yeast prion. Cell 1998 Jun 26; 93(7): 1241-1252.
31. Ter-Avanesyan MD, Dagkesamanskaya AR, Kushnirov VV, Smirnov VN. The SUP35 omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [*PSI*$^+$] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 1994 Jul 1;137(3):671-676.
32. Derkatch IL, Chernoff YO, Kushnirov VV, Inge-Vechtomov SG, Liebman SW. Genesis and variability of [*PSI*$^+$] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 1996 Dec 1;144(4):1375-1386.
33. Derkatch IL, Bradley ME, Zhou P, Chernoff YO, Liebman SW. Genetic and environmental factors affecting the *de novo* appearance of the [*PSI*$^+$] prion in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 1997 Oct 1;147(2):507-519.
34. Liu JJ, Sondheimer N, Lindquist SL. Changes in the

middle region of Sup35 profoundly alter the nature of epigenetic inheritance for the yeast prion [*PSI*$^+$]. Proc Natl Acad Sci U S A 2002 Dec 10;99 Suppl 4:16446-16453.

35. Helsen CW, Glover JR. Insight into molecular basis of curing of [*PSI*$^+$] prion by overexpression of 104-kDa heat shock protein (Hsp104). J Biol Chem 2012 Jan 2;287(1):542-556.
36. Ter-Avanesyan MD, Kushnirov VV, Dagkesamanskaya AR, Didichenko SA, Chernoff YO, Inge-Vechtomov SG, et al. Deletion analysis of the SUP35 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two non-overlapping functional regions in the encoded protein. Mol Microbiol 1993 Mar 1;7(5):683-692.
37. Salas-Marco J, Bedwell DM. GTP hydrolysis by eRF3 facilitates stop codon decoding during eukaryotic translation termination. Mol Cell Biol 2004 Sep 1;24(17):7769-7778.
38. Osherovich LZ, Weissman JS. Multiple Gln/ Asn-rich prion domains confer susceptibility to induction of the yeast [*PSI*$^+$] prion. Cell 2001 Jul 27;106(2):183-194.
39. Suzuki G, Shimazu N, Tanaka M. A yeast prion, Mod5, promotes acquired drug resistance and cell survival under environmental stress. Science 2012 Apr 20;336(6079):355-359.
40. Shorter J, Lindquist S. Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers. Science 2004 Jun 18;304 (5678):1793-1797.
41. Shorter J, Lindquist S. Destruction or potentiation of different prions catalyzed by similar Hsp104 remodeling activities. Mol Cell 2006 Aug 4;23(3):425-438.
42. Kononenko AV, Mitkevich VA, Atkinson GC, Tenson T, Dubovaya VI, Frolova LY, et al. GTP-dependent structural rearrangement of the eRF1:eRF3 complex and eRF3 sequence motifs essential for PABP binding. Nucleic Acids Res 2010 Jan 1;38(2):548-558.
43. Zhouravleva G, Frolova L, Le Goff X, Le Guellec R, Inge-Vechtomov S, Kisselev L, et al. Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. EMBO J 1995 Aug 15;14(16):4065-4072.
44. Kiktev D, Vechtomov SI, Zhouravleva G. Prion-dependent lethality of sup45 mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. Prion 2007 Apr 1;(2):136-143.
45. Serio TR, Cashikar AG, Kowal AS, Sawicki GJ, Moslehi JJ, Serpell L, et al. Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. Science 2000 Aug 25;289(5483):1317-1321.
46. Paushkin SV, Kushnirov VV, Smirnov VN, Ter-Avanesyan MD. Propagation of the yeast prion-like [*PSI*$^+$] determinant is mediated by oligomerization of the SUP35-encoded polypeptide chain release factor. EMBO J 1996 Jun 17;15(12):3127-3134.
47. Tessarz P, Mogk A, Bukau B. Substrate threading through the central pore of the Hsp104 chaperone as a common mechanism for protein disaggregation and prion propagation. Mol Microbiol 2008 Apr 28;68(1):87-97.
48. Ness F, Ferreira P, Cox BS, Tuite MF. Guanidine hydrochloride inhibits the generation of prion “seeds” but not prion protein aggregation in yeast. Mol Cell Biol 2002 Aug 1;22(15):5593-5605.
49. Bagriantsev SN, Gracheva EO, Richmond JE, Liebman SW. Variant-specific [*PSI*$^+$] infection is transmitted by Sup35 polymers within [*PSI*$^+$] aggregates with heterogeneous protein compo-sition. Mol Biol Cell 2008 Jun 1;19(6):2433-2443.
50. Tipton KA, Verges KJ, Weissman JS. *In vivo* monitoring of the prion replication cycle reveals a critical role for Sis1 in delivering substrates to Hsp104. Mol Cell 2008 Nov 21;32(4):584-591.
51. Doyle SM, Shorter J, Zolkiewski M, Hoskins JR, Lindquist S, Wickner S. Asymmetric deceleration of ClpB or Hsp104 ATPase activity unleashes protein-remodeling activity. Nat Struct Mol Biol 2007 Jan 28;14(2):114-122.
52. Newnam GP, Wegrzyn RD, Lindquist SL, Chernoff YO. Antagonistic interactions between yeast chaperones Hsp104 and Hsp70 in prion curing. Mol

Cell Biol 1999 Feb 1;19(2):1325-1333.

53. Hung GC, Masison DC. N-terminal domain of yeast Hsp104 chaperone is dispensable for thermotolerance and prion propagation but necessary for curing prions by Hsp104 overexpression. Genetics 2006 Jun 1;173(2):611-620.
54. Kryndushkin DS, Alexandrov IM, Ter-Avanesyan MD, Kushnirov VV. Yeast [*PSI*$^+$] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. J Biol Chem 2003 Dec 5;278(49):49636-49643.
55. Winkler J, Tyedmers J, Bukau B, Mogk A. Chaperone networks in protein disaggregation and prion propagation. J Struct Biol 2012 Aug 1; 179(2):152-160.
56. Moosavi B, Wongwigkarn J, Tuite MF. Hsp70/Hsp90 co-chaperones are required for efficient Hsp104-mediated elimination of the yeast [*PSI*$^+$] prion but not for prion propagation. Yeast 2009 Dec 10;27(3):167-179.
57. Reidy M, Masison DC. Sti1 regulation of Hsp70 and Hsp90 is critical for curing of *Saccharomyces cerevisiae* [*PSI*$^+$] prions by Hsp104. Mol Cell Biol 2010 May 17;30(14):3542-3552.
58. Abbas-Terki T, Donze O, Briand PA, Picard D. Hsp104 interacts with Hsp90 cochaperones in respiring yeast. Mol Cell Biol 2001 Nov 1;21 (22):7569-7575.
59. Wegele H, Haslbeck M, Reinstein J, Buchner J. Sti1 is a novel activator of the Ssa proteins. J Biol Chem 2003 Jul 11;278(28):25970-25976.
60. Song Y, Masison DC. Independent regulation of Hsp70 and Hsp90 chaperones by Hsp70/Hsp90-organizing protein Sti1 (Hop1). J Biol Chem 2005 Oct 7;280(40):34178-34185.
61. Cox B, Ness F, Tuite M. Analysis of the generation and segregation of propagons: entities that propagate the [*PSI*$^+$] prion in yeast. Genetics 2003 Sep 1;165(1):23-33.
62. Ness F, Cox BS, Wongwigkarn J, Naeimi WR, Tuite MF. Over-expression of the molecular chaperone Hsp104 in *Saccharomyces cerevisiae* results in the malpartition of [*PSI*$^+$] propagons. Mol Microbiol 2017 Jan 10;104(1):125-143.
63. Erjavec N, Larsson L, Grantham J, Nystrom T. Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggre-gation remodeling factor Hsp104p. Genes Dev 2007 Oct 1;21(19):2410-2421.
64. Tessarz P, Schwarz M, Mogk A, Bukau B. The yeast AAA$^+$ chaperone Hsp104 is part of a network that links the actin cytoskeleton with the inheritance of damaged proteins. Mol Cell Biol 2009 Apr 27; 29(13):3738-3745.
65. Liu B, Larsson L, Caballero A, Hao X, Oling D, Grantham J, et al. The polarisome is required for segregation and retrograde transport of protein aggregates. Cell 2010 Jan 22;140(2):257-267.
66. Wongwigkarn J. Exploring the role of the molecular chaperone Hsp104 in yeast [*PSI*$^+$] prion propagation and transmission [doctoral ‘s thesis]. Canterbury, UK: University of Kent; 2013.
67. Alberti S, Halfmann R, King O, Kapila A, Lindquist S. A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins. Cell 2009 Apr 3;137(1):146-158.
68. Alberti S. Molecular mechanisms of spatial protein quality control. Prion 2012 Nov 1;6(5):437-442.
69. Greene LE, Zhao X, Eisenberg E. Curing of [*PSI*$^+$] by Hsp104 Overexpression: Clues to solving the puzzle. Prion 2018 Jan 2;12(1):9-15.
70. Shorter J. Hsp104: a weapon to combat diverse neurodegenrative disorders. Neurosignals 2008 Dec 5;16(1):63-74.