

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Caractérisation de la chaperone Hsp104 chez la levure
Schizosaccharomyces pombe et étude de son rôle dans la
propagation des prions de levure**

par

Patrick Sénéchal

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître en Science (M.Sc)
en Biochimie

Août 2007



© Patrick Sénéchal, 2007

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation de la chaperone Hsp104 chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* et
étude de son rôle dans la propagation des prions de levure

présenté par :
Patrick Sénéchal

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pascal Chartrand, président-rapporteur
Luis A. Rokeach, directeur de recherche
Pierre Belhumeur, membre du jury

Résumé

La maladie de Creutzfeldt-Jakob, la maladie de la vache folle et la tremblante du mouton sont trois pathologies causées par les prions. Les prions sont des protéines qui peuvent adopter une conformation alternative transmissible aux autres molécules identiques et qui se propagent d'une cellule à l'autre. On trouve aussi des prions chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* chez qui ils agissent comme facteurs épigénétiques. Les prions de levure forment des fibres amyloïdes qui sont transmises par division cellulaire. L'étude du prion [*PSI*⁺] chez *S. cerevisiae* a révélé que sa propagation est médiée par la chaperone moléculaire Hsp104, une désagrégase capable de réduire la taille des fibres amyloïdes, ce qui facilite leur transmission. En revanche, une surexpression de Hsp104 permet d'éliminer le prion [*PSI*⁺]. Notre laboratoire a découvert chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* un élément épigénétique nommé [*cif*], qui présente les caractéristiques phénotypiques des prions de levure. Le but de mon projet était d'identifier et de caractériser l'homologue de Hsp104 retrouvé chez *S. pombe*. Nous avons identifié Sp_Hsp104 et démontré qu'elle permet la réactivation de protéines agrégées à la chaleur chez *S. pombe* et chez *S. cerevisiae*. Remarquablement, l'élément [*cif*], se propage indépendamment de Sp_Hsp104 chez *S. pombe*. L'expression hétérologue de Sp_Hsp104 chez *S. cerevisiae* montre aussi que cette protéine est incapable de propager le prion [*PSI*⁺] et que sa surexpression ne permet pas d'éliminer ce prion de levure. Afin d'identifier des résidus clé pour la propagation du prion [*PSI*⁺], nous avons construit des chimères dans lesquelles les domaines C-terminaux (CTD) des protéines Hsp104 de *S. cerevisiae* et de *S. pombe*, très différents l'un de l'autre, ont été échangés. La surexpression de ces chimères montre que le CTD de la désagrégase Hsp104 de *S. cerevisiae* favorise l'élimination du prion [*PSI*⁺]. Notre étude de Sp_Hsp104 a donc permis d'approfondir notre compréhension des déterminants moléculaires nécessaires à la propagation des prions de levure.

Mots-clés : Hsp104, prion, chaperone moléculaire, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*

Abstract

Creutzfeldt-Jakob disease, mad cow disease and sheep scrapie are prion-mediated pathologies. Prions are proteins able to adopt an alternative conformation that is transmissible to other identical molecules, and thereby prions can be propagated from cell to cell. Prions are also found in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, where they act as epigenetic elements. Yeast prions form amyloid fibers that are transmitted by cell division. The study of the $[PSI^+]$ prion in *S. cerevisiae* revealed that its propagation is mediated by the Hsp104 molecular chaperone, a disaggregase able to reduce the size of prion amyloid fibers, thus facilitating their transmission. Conversely, Hsp104 overexpression results in the elimination of the $[PSI^+]$ prion. Our laboratory discovered an epigenetic element named $[cif]$ in the yeast *Schizosaccharomyces pombe* that exhibit the phenotypic characteristics of yeast prions. The aim of my project was to identify and to characterize the Hsp104 homologue of *S. pombe*. We identified, Sp_Hsp104, and demonstrated that it is a functional disaggregase allowing the reactivation of heat-aggregated proteins in *S. pombe* and in *S. cerevisiae*. Remarkably, the $[cif]$ element in *S. pombe* is propagated independently of Sp_Hsp104. Heterologous expression of Sp_Hsp104 in *S. cerevisiae* showed that this protein is not able to propagate $[PSI^+]$ and its overexpression cannot eliminate this yeast prion. To identify Hsp104 residues important for the propagation of $[PSI^+]$, we constructed chimeras in which the C-terminal domains (CTD) of Hsp104 proteins from *S. cerevisiae* and *S. pombe* were swapped. The overexpression of these chimeras showed that the CTD of the Hsp104 disaggregase from *S. cerevisiae* favors the elimination of the $[PSI^+]$ prion. Our study of Sp_Hsp104 has deepened our comprehension of the molecular determinant required for yeast prion propagation.

Keywords : Hsp104, prion, molecular chaperone, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*

Remerciements

La formation d'un scientifique ne se fait pas seulement à l'aide de livres et d'éprouvettes. Aussi, j'aimerais prendre le temps de remercier tout ceux qui m'ont aidé dans mon parcours. D'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Luis Rokeach pour sa patience, pour sa confiance et pour la liberté avec laquelle j'ai pu mener mon projet de recherche.

J'aimerais ensuite remercier tous ceux qui ont travaillé avec moi au laboratoire, notamment Renée, Pascale, Cynthia, Geneviève, Alex, Fadi et Antoine. Merci à tous pour votre aide et pour les nombreuses discussions que nous avons eu. Merci spécialement à Pascale, pour m'avoir supervisé durant mon stage et pour avoir répondu à mes nombreuses questions. Un merci particulier aussi à Geneviève, sans qui trois ans n'auraient pas suffi pour écrire cet article. Merci pour ton bon travail. Merci enfin à tous pour tous les beaux moments que nous avons passés ensemble.

Merci aussi à Joëlle Pelletier pour m'avoir accueilli dans son laboratoire le temps d'un stage et à Andreea Schmitzer, qui a supervisé ce stage. Merci pour votre patience et pour m'avoir donné le goût de travailler en laboratoire. Merci aussi à Nicolas Doucet, Jordan Volpato et Roberto Chica, mes collègues à l'époque, qui ont fait de ce premier stage une véritable partie de plaisir.

J'aimerais aussi remercier Nicolas Paquin, pour ses conseils et les discussions fructueuses que nous avons eues, qui ont été d'une aide précieuse pour la réalisation de ce projet. Merci aussi pour ton amitié et ta générosité.

Merci Karine, pour ton amour et ton soutien dans toutes les facettes de ma vie. Merci aussi pour ton aide dans la correction de ce mémoire et pour tout le temps que tu m'as accordé dans la réalisation de ce projet.

Merci aussi à mes parents pour leur affection et pour avoir encouragé ma curiosité et mon intérêt pour la science. Un merci spécial aussi à mon père pour son aide et ses conseils dans la mise au point d'un système de détection des cellules Cin basé sur la fluorescence. J'apprécie cette chance que j'ai eu de travailler avec toi. Merci aussi à mon frère, qui a toujours cru en moi.

Merci aussi à tous les autres collaborateurs qui m'ont aidé à mener à bien ce projet, notamment le Dr Pascal Chartrand chez qui j'ai effectué certaines expériences. Finalement, merci à tous ceux qui liront ce mémoire. J'espère que vous l'apprécierez et qu'il vous sera utile.

*À mes parents et à mon frère, qui m'ont
toujours soutenu et encouragé*

Table des matières

1.1 Problématique	1
1.2 Le repliement des protéines	2
1.2.1 Composition et structure des protéines	3
1.2.2 Le mauvais repliement des protéines <i>in vivo</i>	4
1.3 Le contrôle de qualité des protéines.....	8
1.3.1 Les chaperones moléculaires.....	8
1.3.1.1 Le système des Hsp70-40.....	10
1.3.1.2 Les Hsp90	12
1.3.1.3 Les sHsp.....	12
1.3.2 Le contrôle de qualité de la voie de sécrétion.....	14
1.3.3 La dégradation des protéines chez les eucaryotes.....	17
1.3.4 Les protéinopathies et le contrôle de qualité.....	18
1.4 ClpB et Hsp104 : les désagrégases moléculaires	20
1.4.1 Analyse structurale de ClpB	21
1.4.2 Mécanisme d'action de ClpB	23
1.4.3 Similarités et différences entre Hsp104 et ClpB.....	25
1.5 Les fibres amyloïdes	27
1.5.1 Structure et caractéristiques des fibres amyloïdes	27
1.5.2 Formation des fibres amyloïdes	28
1.5.3 Les amyloïdies et la toxicité des fibres amyloïdes.....	32
1.5.4 Les fibres amyloïdes fonctionnelles.....	34
1.6 Les maladies à prions : quand l'agrégation se propage.....	35
1.6.1 La protéine PrP, structure et fonction	36
1.6.2 Les preuves de « l'hypothèse prion ».....	37
1.6.3 La propagation de PrP ^{Sc}	38
1.7 Les prions de levure	40
1.7.1 Présentation des prions de levures	42

1.7.1.1 [URE3]	42
1.7.1.2 [PSI ⁺]	44
1.7.1.3 [PIN ⁺].....	45
1.7.1.4 [Het-s], le prion de <i>Podospora anserina</i>	46
1.7.2 [cif], un nouvel élément prionique chez <i>S. pombe</i>	49
1.8 Le bien-fondé du projet de recherche.....	52
1.8.1 Le bien-fondé des études sur les prions de levures	52
1.8.2 Le rôle de Hsp104 dans la propagation des prions de <i>S. cerevisiae</i>	53
1.8.3 Étude de Hsp104 de la levure <i>S. pombe</i> et de son rôle dans la propagation des prions de levure.....	57
2. Article.....	58
Summary	59
Introduction	60
Results	63
Discussion	71
Experimental procedures.....	76
Acknowledgements	85
Figures legends	88
3. Discussion	102
3.1 Retour sur la problématique.....	102
3.2 Regard sur la thermotolérance chez <i>S. pombe</i>	103
3.3 Implications possibles du CTD sur l'activité des Hsp104	104
3.4 Hypothèse sur l'impact d'une phénylalanine dans la première boucle flexible chez Sp_Hsp104.....	107
3.5 Conclusions et perspectives	108
4. Annexes.....	112
4.1 Étude du promoteur de <i>Sp_hsp104⁺</i> et de la réponse au stress chez <i>S. pombe</i>	112
4.2 Élaboration de nouveaux systèmes plus performants pour détecter l'état Cin	114

Liste des tableaux

Tableaux de l'introduction du mémoire

Tableau I. Description de quelques amyloïdies et de leur protéine amyloïde associée.....	34
Tableau II. Description et nomenclature des prions connus.....	41
Tableau III. Comparaison des domaines C-terminaux de quelques protéines de la famille des ClpB/Hsp100.....	106

Tableaux de l'article

Table I. Yeast strains used in this study.....	86
--	----

Liste des figures

Figures de l'introduction du mémoire

Figure 1.1 : Représentation schématique des différents états de repliement possibles d'une protéine.....	6
Figure 1.2 : Compétition entre repliement et agrégation protéique.....	7
Figure 1.3 : Le cycle d'action du système des chaperones Hsp70-40.....	11
Figure 1.4 : Mécanismes d'action proposés pour la calnexine.....	16
Figure 1.5 : Le système de dégradation des protéines.....	19
Figure 1.6 : Structure de la désagrégase ClpB.....	22
Figure 1.7 : Représentations structurales de quelques fibres amyloïdes.....	30
Figure 1.8 : Cinétique de formation des fibres amyloïdes en solution.....	31
Figure 1.9 : Mode d'action des prions [<i>PSI</i> ⁺] et [<i>URE3</i>].....	43
Figure 1.10 : Mode d'action du prion [<i>Het-s</i>].....	48
Figure 1.11 : Modèle d'étude permettant d'expliquer la survie des cellules Cin en absence de la calnexine.....	51
Figure 1.12 : Rôle de Hsp104 dans la propagation de [<i>PSI</i> ⁺].....	56

Figures de l'article

Figure 1 : Comparaison of sequences of Hsp104 homologues.....	88
Figure 2 : Sp_Hsp104 is required for thermotolerance in <i>S. pombe</i>	89
Figure 3 : Heterologous expression of Sp_Hsp104 complements the <i>Sc_HSP104</i> deletion.....	90
Figure 4 : Impact of Sp_Hsp104 on [<i>PSI</i> ⁺] propagation in <i>S. cerevisiae</i>	91
Figure 5 : The C-terminal part of Hsp104 is required for the propagation of [<i>PSI</i> ⁺] in <i>S. cerevisiae</i>	92

1. Introduction

1.1 Problématique

L'accumulation de protéines mal repliées est la cause de nombreuses maladies mortelles comme les maladies d'Alzheimer et de Creutzfeldt-Jakob. Le vieillissement de la population mondiale semble responsable de l'augmentation des cas de nombreuses maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer. De plus, on a récemment observé l'émergence d'une variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob transmise à l'homme par du bétail atteint de la maladie de la vache folle. Cette maladie, propagée par une protéine nommée prion, fit des ravages dans les années 1990 au Royaume-Uni. L'Organisation Mondiale de la Santé Animale (www.oie.int) rapporte qu'environ 185 000 bêtes furent atteintes par les maladies à prions. La crise de la vache folle au Royaume Uni fit aussi 160 victimes humaines (www.cjd.ed.ac.uk), pour la plupart atteints par consommation de viande contaminée. Certains croient que ce nombre est sous-estimé puisque le temps d'incubation des infections à prions peut dépasser les 50 ans (Wadsworth and Collinge 2007) et donc, que d'autres victimes sont à prévoir dans l'avenir. Aussi, si le nombre de cas de vaches folles a chuté au Royaume Uni, on remarque qu'ailleurs dans le monde les cas sont en hausse (Aguzzi et al. 2007). Le Canada a été touché par une dizaine de cas de vache folle depuis 2003, ne faisant heureusement aucune victime humaine, mais perturbant gravement l'économie agricole du pays. On a également découvert une maladie à prions chez les cervidés. Cette maladie, nommée maladie débilitante chronique (« chronic wasting disease » ou CWD), inquiète particulièrement les scientifiques, puisque cette forme de la maladie à prion est très contagieuse et peu contrôlée (Angers et al. 2006; Mathiason et al. 2006; Sigurdson and Aguzzi 2006). Jusqu'ici, on ne rapporte aucun décès humain liés à cette forme de maladie, mais des animaux malades ont été rapportés dans des élevages en Saskatchewan et en Alberta (Agence canadienne d'inspection des aliments), en Corée du Sud et dans treize états américains. Aux États-Unis, la situation est particulièrement préoccupante puisque'elle frappe également les animaux sauvages (Sigurdson and Aguzzi 2006). Ainsi, dix ans après que Stanley Prusiner ait reçu son prix Nobel de médecine pour ses travaux sur les prions, il n'existe toujours aucun traitement contre cette maladie

neurodégénérative mortelle. Il est donc crucial de poursuivre les recherches sur le repliement des protéines et sur la propagation des prions.

Les prions sont également présents chez les microorganismes, notamment chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Wickner 1994). Comme les prions de mammifères, les prions de levures tendent à s'aggréger sous forme de fibres amyloïdes. Ces prions de levures ont ainsi pu servir de modèles pour étudier la réplication et la propagation des protéines prioniques. Ces études ont entre autres mis en lumière l'importance de la protéine Hsp104 dans le maintien et la propagation des prions de levure d'une génération à la suivante. En effet, Hsp104 est en mesure de lier et de solubiliser les fibres amyloïdes formées par les prions de levures, ce qui permet leur transmission d'une cellule à l'autre. Notre laboratoire a récemment fait la découverte d'un nouvel élément aux caractéristiques prioniques, [*cif*], chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Collin et al. 2004). Pour caractériser la propagation de ce nouveau prion, je me suis intéressé à l'homologue de Hsp104 chez cette levure. Le but de mon projet est de caractériser cette protéine et d'évaluer le rôle qu'elle joue dans la propagation du prion [*cif*] chez *S. pombe* et sur le prion [*PSI*⁺] chez *S. cerevisiae*. Dans l'introduction, je présente d'abord les notions de base du repliement des protéines et du contrôle de qualité des protéines de la cellule puis je m'attarde sur la chaperone Hsp104, avant de présenter les protéines prions et les fibres amyloïdes qui leur sont associées. Je termine par un résumé des découvertes de notre laboratoire sur l'élément [*cif*].

1.2 Le repliement des protéines

Les protéines sont les molécules les plus abondantes chez un être humain après l'eau (Dobson 2004). Ce sont de minuscules machines cellulaires, ayant chacune une fonction précise encodée dans le matériel génétique de la cellule. Leurs fonctions sont diverses, allant de l'activité enzymatique jusqu'au maintien de la structure cellulaire, en passant par le contrôle de l'expression génique et la défense de l'organisme. Il est donc

essentiel de s'assurer qu'elles fonctionnent adéquatement. Or, pour être fonctionnelles, les protéines doivent être correctement repliées. Les prochaines sections décrivent les règles régissant le repliement protéique et la nature des stress perturbant la conformation des protéines. Le lecteur intéressé peut se référer aux revues et références suivantes : Voet and Voet 1998, Dobson 2004, Chiti 2006 et Ellis and Minton 2006.

1.2.1 Composition et structure des protéines

Une protéine est une chaîne d'acides aminés liés les uns aux autres de manière covalente. Ces acides aminés sont communs à tous les êtres vivants. Pour accomplir sa tâche, chaque protéine doit être repliée de manière à adopter une structure tridimensionnelle fonctionnelle dite conformation native. L'analyse de la structure des protéines nous a appris que le repliement des protéines dépend de deux facteurs principaux : la séquence des acides aminés et les conditions physico-chimique dans lesquelles s'effectue le repliement (Anfinsen 1973). Ainsi, lorsqu'elles sont mises dans des conditions favorables, les protéines sont en mesure d'adopter leur conformation native spontanément. Les propriétés physico-chimiques des résidus d'acides aminés, qui peuvent être hydrophobes, polaires non-chargés ou polaires chargés (acides ou basiques), dirigent le repliement des protéines et stabilisent leur structure.

La structure d'une protéine est complexe et peut être divisée en quatre niveaux. La séquence primaire de la protéine est formée par la séquence en acides aminés de cette chaîne peptidique. Celle-ci est composée d'une chaîne d'acides aminés liés les uns aux autres par des liens covalents. La structure secondaire est principalement constituée de deux types d'éléments structuraux : les hélices α et les feuillets β . La formation de structures secondaires est influencée par les chaînes latérales des acides aminés et donc par la structure primaire de la protéine. La formation des hélices α et des feuillets β sont possibles grâce aux ponts hydrogènes s'établissant entre les groupements carbonyles et amines formant le cœur de tout acide aminé. La structure tertiaire est déterminée par un

ensemble de forces dictées par les caractéristiques physicochimiques des chaînes latérales des acides aminés. L'une des forces majeures du repliement protéique est l'hydrophobicité. Comme les protéines se retrouvent en milieu aqueux, les résidus hydrophobes tendent à être enfouis au centre de la structure protéique, les résidus polaires se retrouvant alors en surface, exposés au milieu environnant. La protéine a ainsi une meilleure solubilité. La structure tertiaire est ensuite complexifiée par une panoplie d'autres types de liens entre les résidus. On retrouve des liens hydrophobes entre résidus apolaires, des ponts salins entre résidus acides et basiques et des liens hydrogène entre résidus polaires. Deux résidus cystéine peuvent également se lier de manière covalente par la formation de ponts disulfures. Les protéines peuvent finalement s'assembler entre elles, formant ainsi leur structure quaternaire.

L'ensemble de ces liens permet aux protéines d'atteindre leur conformation native. Cette conformation constitue habituellement la structure la plus stable et la moins coûteuse en énergie. De plus, comme le repliement protéique de chaque région de la protéine s'effectue de manière indépendante, les protéines de toutes tailles sont en mesure de se replier correctement en quelques secondes, voire en quelques microsecondes *in vitro* (Yang and Gruebele 2003). Le repliement protéique est ainsi très efficace *in vitro*, pour autant que les protéines soient mises dans des conditions favorables.

1.2.2 Le mauvais repliement des protéines *in vivo*

In vivo, les protéines sont synthétisées dans des conditions difficiles qui ne favorisent pas le repliement protéique. Le repliement protéique commence dès que la protéine est traduite voire même pendant sa traduction (Hardesty and Kramer 2001). Dans ces circonstances, il est inévitable que des résidus hydrophobes soient exposés au milieu environnant. Or, les résidus hydrophobes ont une forte propension à s'associer entre eux, ce qui peut mener à des associations protéiques inadéquates (Fig 1.1). Si l'agrégation protéique est importante, les protéines mal repliées précipitent sous une forme insoluble,

encombrant alors l'intérieur de la cellule. De plus, les protéines sont synthétisées en polysomes, chaque ARNm étant traduit simultanément par plusieurs ribosomes (Kiseleva 1989), ce qui a pour effet de produire plusieurs polypeptides identiques dans un espace très rapproché. La proximité de plusieurs protéines identiques, favorise l'agrégation des protéines qui tendent à s'associer de manière stable. Une fois relâchées dans le cytoplasme, les protéines sont encore sujettes à des conditions d'encombrement importantes puisque que le cytoplasme contient une concentration de macromolécules (protéines et autres) d'environ 300-400 mg/mL. Cet encombrement important favorise les interactions intermoléculaires anarchiques ce qui n'aide pas les protéines à adopter leur conformation native (Fig 1.2).

Aussi, même si les protéines réussissent à adopter leur conformation native, l'équilibre des forces stabilisant cette conformation reste fragile et sensible aux variations des conditions du milieu comme le pH, la température et les autres molécules présentes dans le milieu. Les variations de pH, elles, modifient l'état d'ionisation des résidus polaires et par conséquent, la répartition des charges de la protéine, ce qui perturbe les liens hydrogène et ponts salins de la protéine et déstabilise la structure des protéines. De même, une hausse importante de la température augmente l'entropie du milieu et déstabilise les faibles liaisons assurant la cohésion de la structure native des protéines, ce qui tend à linéariser les protéines. Les molécules hautement réactives comme les espèces réactives oxygénées (ROS), produites par la respiration cellulaire, endommagent également les protéines par leur pouvoir oxydant (Cecarini et al. 2007).

Figure 1.1 : Représentation schématique des différents états de repliement possibles d'une protéine. Adapté de Dobson (2003). La population relative de chaque conformère dépend des conditions auxquelles sont soumises les protéines. Pour plus de simplicité, le schéma suivant présente les espèces protéiques d'une protéine globulaire. Après la synthèse protéique, la protéine est d'abord retrouvée sous sa forme linéaire. Le repliement s'effectue ensuite graduellement pour donner les conformations intermédiaires et la conformation native de la protéine. Les conformations linéaires et intermédiaires peuvent également former des agrégats protéiques désordonnés. Les agrégats peuvent à leur tour se replier sous forme d'oligomères amyloïdes, plus stables, pour finalement former des fibres amyloïdes, une espèce protéique très stable formée de protéines mal repliées étroitement liées les unes aux autres. Voir la section 1.5 pour plus de détails sur les fibres amyloïdes.

Synthèse protéique

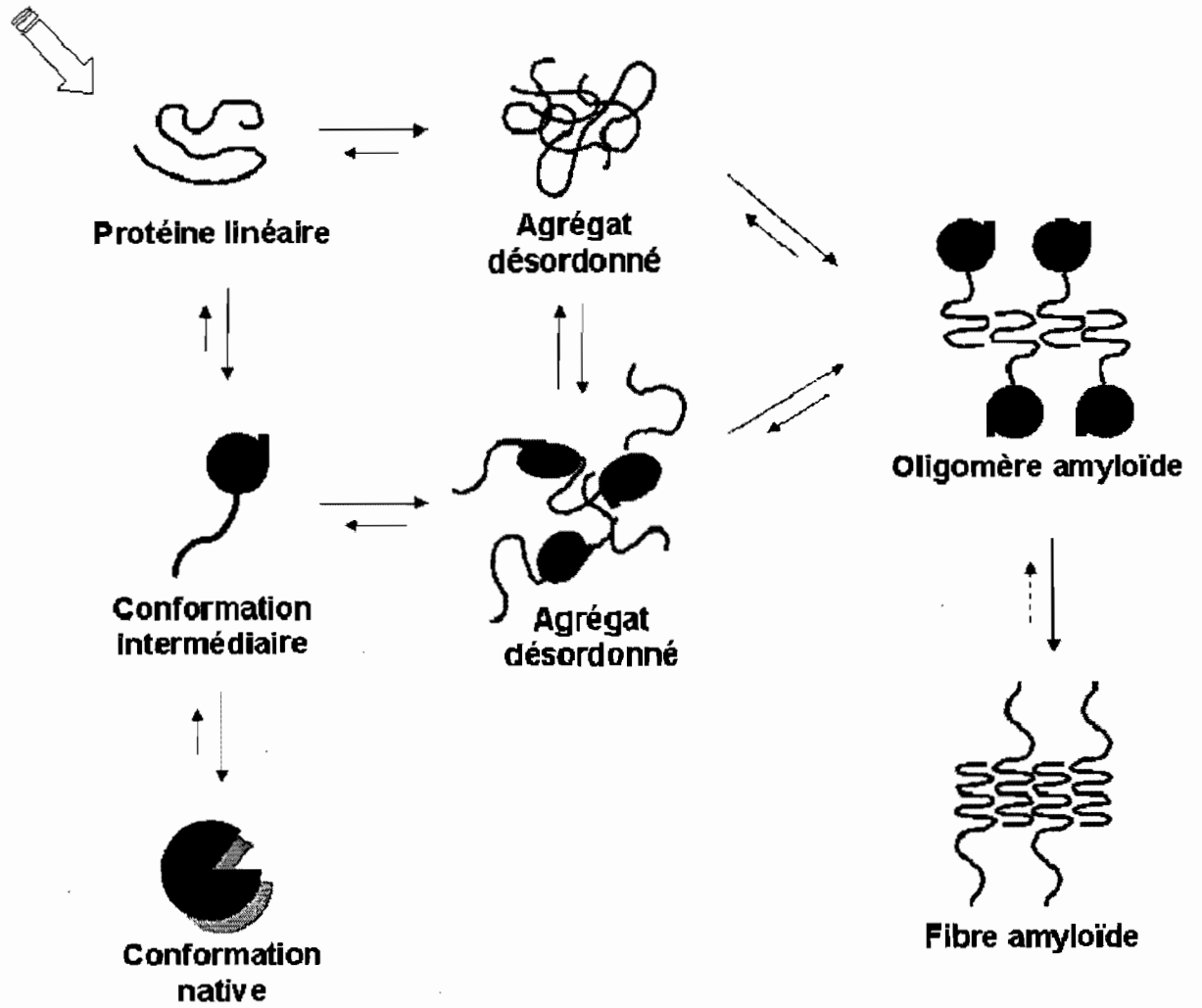
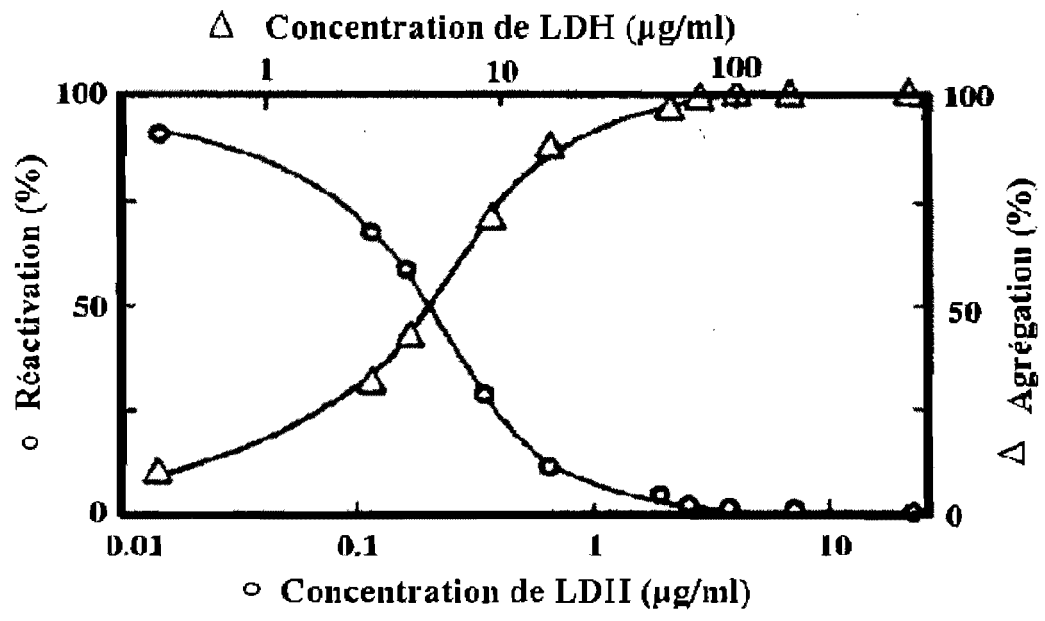


Figure 1.2 : Compétition entre repliement et agrégation protéique. Exemple tiré de Elis and Minton (2006). La protéine modèle, ici la lactate déhydrogénase (LDH), est linéarisée à pH 2,5 puis diluée dans une solution à pH 7,0 à différentes concentrations. Le repliement est mesuré par l'activité enzymatique de la protéine. On constate que la réactivation de la protéine est défavorisée lorsqu'on augmente la concentration protéique. Inversement, l'agrégation protéique est favorisée par l'augmentation de la concentration de protéine dans le milieu.



1.3 Le contrôle de qualité des protéines

Les êtres vivants possèdent une panoplie de protéines dont la fonction est de s'assurer que les protéines adoptent leur conformation native, de limiter au maximum l'agrégation protéique et d'éliminer les protéines mal repliées. Le mécanisme assurant la balance entre le repliement correct des protéines et la dégradation des protéines aberrantes est désignée sous le terme de contrôle de qualité des protéines (Gregersen 2006). Le repliement des protéines est assuré par les chaperones moléculaires, tandis que la dégradation protéique est assurée par des protéases. Ce contrôle de qualité est très conservé à travers les espèces, bien qu'il soit plus complexe et raffiné chez les eucaryotes. La prochaine section présente les principales familles de chaperones. Je m'attarde ensuite sur le cas particulier du contrôle de qualité de la voie de sécrétion chez les eucaryotes ainsi que sur leur système de dégradation des protéines. Je fais finalement un bref survol du rôle qu'occupe la machinerie de contrôle de qualité dans plusieurs pathologies regroupées sous le terme de protéinopathies.

1.3.1 Les chaperones moléculaires

Il existe une grande variété de chaperones moléculaires qui ont des fonctions très diverses et souvent spécialisées. On retrouve les chaperones chez tous les organismes et dans la plupart des compartiments cellulaires. Par souci de simplicité, cette section se consacre uniquement aux chaperones cytosoliques des eucaryotes. Toutes les chaperones fonctionnent selon un mécanisme similaire : reconnaître et lier les protéines mal repliées. Pour ce faire, la plupart des chaperones reconnaissent les résidus hydrophobes exposés à la surface des protéines. Comme ces résidus sont normalement enfouis au cœur de la structure des protéines natives (voir 1.2.1), ce mode de reconnaissance des substrats leur permet de lier spécifiquement les protéines mal repliées. Les chaperones moléculaires empêchent ainsi l'agrégation protéique. En minimisant les interactions avec les autres protéines du milieu, elles favorisent le bon repliement des protéines. La plupart des

chaperones sont également des ATPases qui utilisent l'énergie de l'ATP pour moduler leur capacité à lier leurs substrats.

De nombreuses chaperones sont exprimées de manière ubiquitaire et constitutive. Ces dernières assistent surtout le repliement co-translationnel, assurant le repliement correct et efficace des protéines traduites *in vivo* (voir la section 1.2.2). Si la cellule est soumise à un stress qui favorise la dénaturation et l'agrégation des protéines, un choc thermique par exemple, l'expression de plusieurs chaperones est fortement augmentée, ce qui permet aux cellules de mieux faire face aux stress, d'où leur appellation de « heat-shock protein » ou Hsp (Lindquist and Craig 1988). Une étude récente effectuée chez la levure *S. cerevisiae* a d'ailleurs permis de distinguer les chaperones impliquées dans la réponse au stress des chaperones associées aux protéines nouvellement synthétisées (Albanese et al. 2006).

Les chaperones sont classées en plusieurs familles de protéines sur la base de leur poids moléculaire en kilodaltons. Le groupe le plus important est formé par les Hsp70, des chaperones ATPases, qui agissent de concert avec les Hsp40. Ce système est présenté en section 1.3.1.1. Ces chaperones sont également assistées par les Hsp90, d'autres chaperones ATPase spécialisées dans l'activation des protéines signalétiques comme les kinases (section 1.3.1.2). La section 1.3.1.3 se consacre aux petites Hsp (sHsp), de petites chaperones activées dans les conditions de stress qui limitent l'agrégation avant de transmettre les protéines mal repliées au système des Hsp40-70. Il y a aussi Hsp104, une chaperone ATPase bien particulière qui fera l'objet de toute la section 1.4. Hsp104 fonctionne en étroite collaboration avec le système des Hsp40-70, mais aussi avec les sHsp. La dernière grande famille de chaperones cytosoliques eucaryotes est les Hsp60, également nommées chaperonines. Bien que très étudiées chez les procaryotes, les chaperonines eucaryotes sont peu caractérisées. Elles forment un complexe nommé TRiC (« TCP-1 ring complex ») composé de sept sous-unités différentes formant une structure cylindrique. Les substrats du complexe TRiC comprennent les protéines fibrillaires tel que l'actine et la tubuline (Gomez-Puertas et al. 2004; Spiess et al. 2006). Le complexe TRiC forme

également des fibres avec les protéines ayant des extensions poly-glutamine (voir section 1.5), réduisant ainsi leur toxicité (Tam et al. 2006).

De nombreux autres cofacteurs sont associés aux chaperones. Certains sont décrits dans les sections 1.3.1.1 et 1.3.1.2, mais plusieurs ont été omis par souci de concision et de clarté. Mentionnons également les foldases, des enzymes qui assistent le repliement des protéines en réorganisant leurs liens covalents. Parmi les foldases les plus importantes on retrouve les disulfides isomérase, qui assurent la formation correcte des ponts disulfures (Dobson 2004).

1.3.1.1 Le système des Hsp70-40

Les chaperones moléculaires des familles des Hsp70 et des Hsp40 forment le cœur du contrôle de qualité de la cellule. Il existe une grande variété de Hsp70, de Hsp40 et de facteurs d'échange de nucléotides, ce qui permet à ces chaperones d'assister le repliement de toutes les protéines de la cellule (Hennessy et al. 2005; Mayer and Bukau 2005). Les Hsp40 sont souvent les premières chaperones à interagir avec les protéines mal repliées. Par contre, ces chaperones ne sont pas en mesure d'assurer activement le repliement des protéines. Pour se faire, les Hsp40 s'associent aux Hsp70, des chaperones constituées de deux domaines principaux : un domaine ATPase et un domaine de liaison aux protéines (Fig 1.3). Les Hsp40 s'associent de manière transitoire aux Hsp70 et leur transfèrent les protéines mal repliées. L'association des Hsp70 avec les Hsp40 et leur substrat stimulent grandement l'activité ATPase des Hsp70. Les Hsp70 activées par l'ATP sont en mesure de lier leur substrat. Les Hsp70 adoptent ensuite une conformation dite « fermée » qui stabilise leur liaison aux substrats sous l'hydrolyse de l'ATP (Frydman 2001; Walter and Buchner 2002; Erbse et al. 2004; Mayer and Bukau 2005). Cette liaison entre les Hsp70 et les protéines mal repliées aide ces dernières à adopter leur conformation native. En effet, ces chaperones déstabilisent les liaisons qui maintiennent les protéines dans une conformation erronée, ce qui leur permet de recommencer leur repliement et d'ainsi

Figure 1.3 : Le cycle d'action du système des chaperones Hsp70-40. Une protéine mal repliée est d'abord liée par une Hsp40 (1), puis transférée à une Hsp70. Cette association stimule l'hydrolyse d'ATP et le changement conformationnel de Hsp70, qui peut alors lier le substrat avec une grande affinité. La Hsp40 est libérée et le substrat demeure lié à la Hsp70 (2). Le substrat peut alors continuer son repliement protéique dans des conditions favorisant l'acquisition de sa conformation native (3). Le substrat est relâché lorsque la molécule d'ADP est échangée pour une nouvelle molécule d'ATP. Le substrat peut alors adopter sa conformation native (4).

Protéine mal repliée

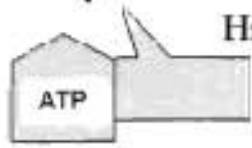


Hsp40



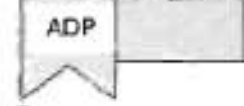
2

1



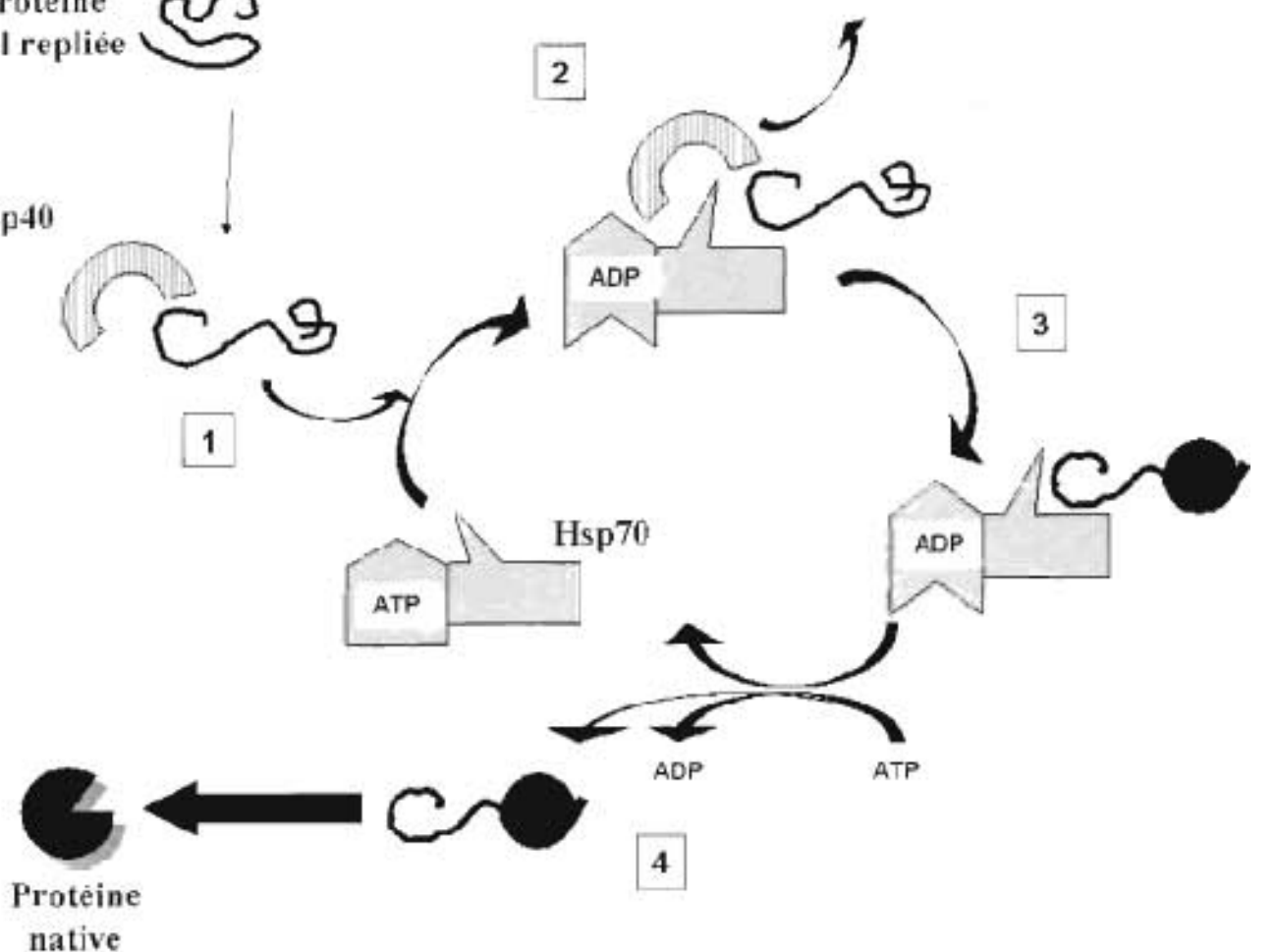
Hsp70

3



Protéine native

4



acquérir leur structure fonctionnelle (Erbse et al. 2004; Mayer and Bukau 2005). Les Hsp70 demeurent dans leur conformation « fermée » jusqu'à ce qu'une nouvelle molécule d'ATP ne remplace la molécule d'ADP liée au domaine ATPase. Cette opération est effectuée par un facteur d'échange de nucléotides. Une fois l'échange effectué, les Hsp70 adoptent leur conformation « ouverte », de faible affinité pour les protéines, ce qui leur permet de relâcher le substrat (Fig 1.3). Le cycle peut ainsi se répéter jusqu'à ce que la protéine mal repliée adopte sa conformation native (Houry 2001). Si elle n'y parvient pas, cette protéine sera redirigée vers la machinerie de dégradation (voir section 1.3.3).

1.3.1.2 Les Hsp90

Les Hsp90 forment une autre famille de chaperones importante. En collaboration avec leur co-chaperone Cdc37, les Hsp90 se lient aux kinases cellulaires, assurant leur maturation et modulant leur activité (Caplan et al. 2007). Comme les kinases forment la base de la majorité des systèmes signalétiques de la cellule, les Hsp90 modulent directement l'activité cellulaire, notamment le cycle cellulaire. Le mécanisme d'action des Hsp90 est encore peu connu, mais les Hsp90 sont elles aussi des ATPases s'associant en dimères fonctionnels. Il semble que les Hsp90 ne lient pas directement leur substrat, qui est d'abord reconnu par les Hsp70-40. De nombreuses protéines accessoires dont la protéine Hop (« Hsp organizing protein », Sti1 chez *S. cerevisiae*) s'associe aux Hsp70 et aux Hsp90 pour permettre le transfert des kinases d'un groupe de chaperones à l'autre. La protéine Hop reconnaît un motif riche en résidus acides nommé répétitions tétratricopeptide (TPR), commun aux Hsp70 et Hsp90, ce qui lui permet de faire le lien entre la machinerie des Hsp70-40 et celle des Hsp90 (Scheufler et al. 2000; Wegele et al. 2006).

1.3.1.3 Les sHsp

Dans des conditions de stress intense, il y a trop de protéines mal repliées pour les machineries des Hsp40-70 et des Hsp90. Aussi, si les protéines mal repliées ne sont pas rapidement prises en charge, elles forment des agrégats importants qui sont beaucoup plus

difficiles à gérer et devront être dégradées plutôt que réactivées, ce qui représente un coût énergétique élevé (Walter and Buchner 2002; Sauer et al. 2004). C'est ce défi que relèvent les sHsp (« small heat-shock protein »).

Les sHsp forment des dimères stables, mais s'assemblent ensuite en structures oligomériques plus complexes composées de plusieurs dimères (Haslbeck et al. 2005; Sun and MacRae 2005). Cette structure oligomérique est dynamique et se caractérise par un centre creux où sont enfouies les queues *N*-terminales hydrophobes tandis que les extrémités *C*-terminales chargées forment la périphérie des oligomères. Bien que la structure de plusieurs complexes de sHsp ait maintenant été déterminée avec précision (Kim et al. 1998; van Montfort et al. 2001; Kennaway et al. 2005; White et al. 2006), les facteurs déterminant l'oligomérisation des sHsp demeurent encore peu connus (Haslbeck et al. 2005; Sun and MacRae 2005).

Contrairement aux autres chaperones, les sHsp ne sont pas des ATPase et elles ne sont pas en mesure d'assister activement le repliement des protéines. Les sHsp se lient aux protéines mal repliées, avant que ces dernières ne forment des agrégats (Haslbeck et al. 2005; Sun and MacRae 2005). La fonction chaperone des sHsp est mal comprise, mais il semble que la portion *N*-terminale hydrophobe soit importante dans la liaison des sHsp avec les protéines mal repliées. Les protéines piégées dans les complexes de sHsp demeurent dans un état où elles sont encore en mesure d'atteindre leur conformation native (Haslbeck et al. 2005; Sun and MacRae 2005). Bien qu'aucun mécanisme de relâche des substrats n'ait été identifié, il semble que les sHsp puissent transmettre leur substrats à la machinerie des Hsp70-40 qui est alors en mesure de réactiver les protéines mal repliées (Haslbeck et al. 2005). Les sHsp servent donc de réservoir de substrats pour les autres chaperones tout en limitant l'agrégation protéique.

1.3.2 Le contrôle de qualité de la voie de sécrétion

Le repliement des protéines dans le RE est soumis à des conditions différentes de celles rencontrées dans le cytosol. En effet, les protéines transitant par le RE et l'appareil de Golgi sont soit destinées aux membranes de compartiments cellulaires, à la membrane cellulaire ou à l'espace extracellulaire, ce qui complexifie davantage encore le repliement protéique. En effet, ces protéines doivent être incorporées à la bicouche lipidique (dans le cas des protéines membranaires) et subir de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que la formation de nombreux ponts disulfures, l'ajout d'ancres glycosylphosphatidylinositol (GPI) et la glycosylation (Bukau et al. 2006). La variété des protéines transitant dans le réticulum est considérable : on estime qu'environ un tiers du protéome traverse la voie de sécrétion (Kleizen and Braakman 2004; van Anken and Braakman 2005). Dans ces conditions, il n'est pas étonnant de constater que le RE contient une grande concentration de chaperones (Bukau et al. 2006).

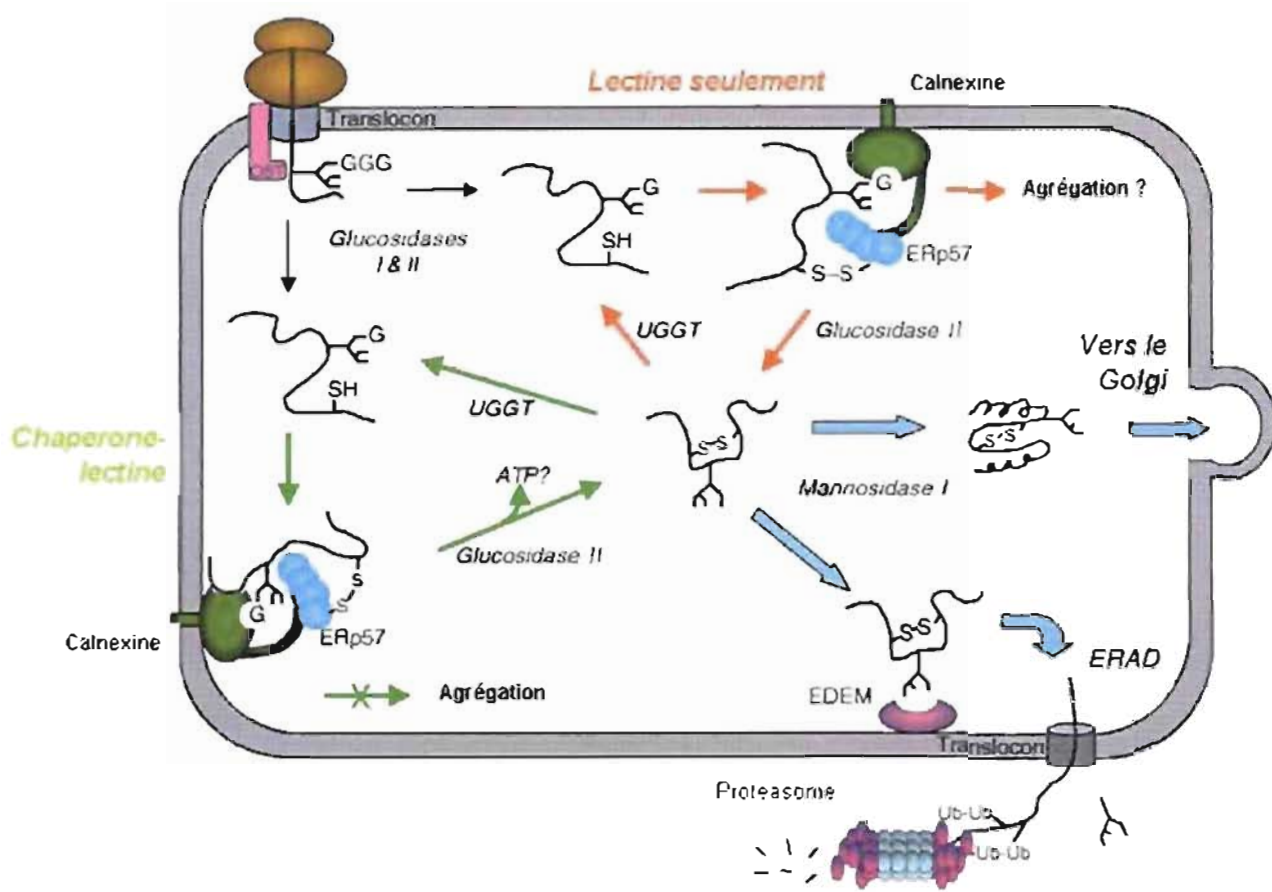
L'une des chaperones les plus importantes, les plus abondantes et les mieux étudiées du réticulum est une Hsp70 nommée BiP (« immunoglobulin-binding protein »). BiP assure le repliement des protéines, mais assiste aussi la rétro-translocation, une étape importante de la dégradation des protéines du RE (Lederkremer and Glickman 2005; Bukau et al. 2006). On dit de BiP qu'elle est une chaperone « classique » puisqu'elle reconnaît les résidus hydrophobes exposés tout comme ses homologues cytoplasmiques.

La calnexine, une autre chaperone importante du RE, utilise un autre mode de reconnaissance des protéines mal repliées, qui dépend en partie de l'état de glycosylation des protéines en repliement. Comme elle peut lier les sucres, on dit de la calnexine qu'elle est une lectine. La glycosylation des protéines joue un rôle de signal indiquant si la protéine luminale est correctement repliée (Fig 1.4). L'oligosaccharide $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ est d'abord transféré sur un résidu asparagine puis il est modifié par les glucosidases I et II, des enzymes clivant deux des trois résidus glucoses (Glc) exposés. La glycoprotéine

possédant la glycosylation $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ peut alors être reconnue par la calnexine. En liant la glycoprotéine mal repliée dans le RE, la calnexine favorise le bon repliement de celle-ci. L'oligosaccharide est clivé une seconde fois par la glucosidase II, ce qui libère la calnexine de son substrat. Si la glycoprotéine est mal repliée, elle sera reconnue et reglucosylé par l'UGGT (UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase) ce qui permettra à la glycoprotéine d'être à nouveau reconnue par la calnexine. C'est ce que l'on nomme le cycle de la calnexine (Fig 1.4) (Ellgaard and Helenius 2001; Kleizen and Braakman 2004; Lederkremer and Glickman 2005). Si la glycoprotéine ne parvient pas à adopter sa conformation native, différentes mannosidases clivent les résidus mannoses (Man) exposés. Lorsque trois résidus mannoses sont clivés, la glycoprotéine sera reconnue par la protéine EDEM et retransloquée vers le cytosol pour être dégradée par le protéasome (voir section 1.3.3.2) (Kostova and Wolf 2003).

Dans ce modèle du cycle de la calnexine, c'est l'UGGT qui détecte si les protéines sont correctement repliées. Par contre, il a aussi été montré que la calnexine peut également agir comme une chaperone classique, capable de reconnaître, de lier et d'influencer le repliement des protéines mal repliées indépendamment de son état de glycosylation (Fig 1.4) (Swanton and Bulleid 2003; Williams 2006). Les travaux de notre laboratoire sur la calnexine chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* supporte ce modèle (Jannatipour et al. 1998; Beaulieu et al. 1999; Marechal et al. 2004). Nous avons également pu montrer que la calnexine interagit avec BiP. De plus, cette interaction joue un rôle important dans le contrôle de qualité du RE de *S. pombe* (Jannatipour and Rokeach 1995; Marechal et al. 2004). L'interaction entre BiP et la calnexine est également nécessaire à la survie de cette levure, ce qui montre bien que les différentes chaperones du contrôle de qualité du RE sont étroitement associées (Marechal et al. 2004; Hajjar et al. 2007).

Figure 1.4 : Mécanismes d'action proposés pour la calnexine. Figure adaptée de Williams (2006). Les étapes du mécanisme du cycle de la calnexine proposé par Helenius sont indiquées en rouge. Selon ce modèle, la calnexine interagit uniquement avec ces substrats en reconnaissant leur état de glucosylation. Le modèle où la calnexine interagit avec ces substrats à la fois comme une lectine et comme une chaperone classique est indiqué en vert.



1.3.3 La dégradation des protéines chez les eucaryotes

La capacité des chaperones à replier les protéines mal repliées a ses limites. Les protéines qui ne réussissent pas à adopter leur conformation native malgré l'aide des chaperones moléculaires constituent un problème important pour la cellule. Elles doivent donc être rapidement prises en charge. La machinerie de contrôle de qualité est ainsi couplée à la machinerie de dégradation (« ERAD », dégradation associée au RE) de manière à éliminer rapidement les protéines problématiques. La dégradation des protéines permet également de renouveler les protéines de la cellule et est impliquée dans la régulation de différentes fonctions cellulaires, notamment la réponse aux stress et le cycle cellulaire (Sauer et al. 2004; Lecker et al. 2006; Nandi et al. 2006).

Chez les eucaryotes, la dégradation des protéines est effectuée principalement par le protéasome 26S, un complexe protéique d'environ 60 sous-unités. Le centre catalytique du protéasome (aussi appelé protéasome 20S) est constitué d'un assemblage de quatre heptamères étagés, le tout composé de 14 types de protéines différentes (α_1 - α_7 et β_1 - β_7) assurant la dégradation des protéines. Aux deux extrémités de ces peptidases sont attachés les complexes régulateurs 19S constitués chacun d'au moins 17 sous-unités. Le complexe régulateur a pour fonction principale de défaire la structure des protéines à dégrader et de les introduire à l'intérieur du protéasome (Lecker et al. 2006; Nandi et al. 2006).

Pour reconnaître les protéines à dégrader, les eucaryotes ont développé une stratégie basée sur la reconnaissance d'une modification post-traductionnelle ajoutée aux protéines devant être dégradées. Le signal de dégradation est formé par l'ajout de protéines d'ubiquitines sur certains résidus lysine. Cette ubiquitination est cumulative de telle sorte que les ubiquitines sont ajoutées les unes aux autres en une chaîne de poly-ubiquitine (Lecker et al. 2006; Nandi et al. 2006). La dégradation est enclenchée lorsque la protéine porte une extension d'au moins quatre résidus d'ubiquitine liés de manière covalente (Lederkremer and Glickman 2005). L'ubiquitination des protéines est effectuée par trois

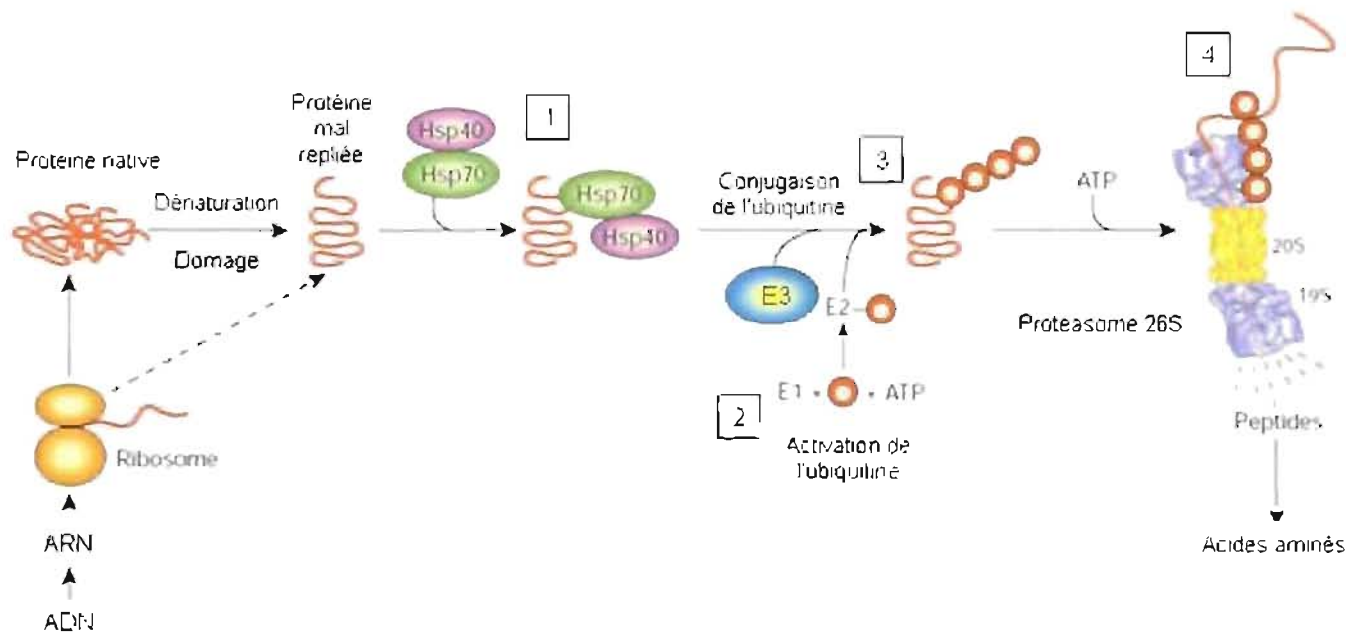
types de protéines (Fig 1.5). Les protéines E1 (enzymes activatrices d'ubiquitine) transfèrent l'ubiquitine libre aux protéines E2 (protéines transporteuses d'ubiquitine). Les protéines E2 et E3 (ubiquitine ligases) transfèrent ensuite l'ubiquitine à la protéine à dégrader. Les protéines E3 sont les enzymes-clés de la réaction puisqu'ils reconnaissent les protéines substrats et leur transfèrent l'ubiquitine. Les protéines poly-ubiquitinées sont ensuite dirigées vers le protéasome, où les ubiquitines sont libérées avant la dégradation des protéines. Les ubiquitines libres retournent dans le cytoplasme où elles peuvent à nouveau être attachées à des protéines à dégrader (Lecker et al. 2006; Nandi et al. 2006).

1.3.4 Les protéinopathies et le contrôle de qualité

On découvre de plus en plus de maladies causées par un problème de repliement des protéines. Certains spécialistes estiment que la moitié des maladies connues pourraient impliquer des protéines mal repliées (Bradbury 2003). Ces maladies, nommées protéinopathies, incluent de nombreuses maladies héréditaires comme la fibrose kystique, l'anémie à hématie falciforme et la phénylcétonurie (Dobson 2004; Gregersen et al. 2006). Ces maladies sont causées par une mutation qui modifie la séquence d'une protéine de telle manière qu'elle ne pourra plus être correctement repliée. Dans le cas de la fibrose kystique la protéine en cause est la CFTR, une protéine transmembranaire de 1480 acides aminés, qui porte une délétion du résidu F508 (Chaudhuri and Paul 2006). La protéine CFTR mutée est reconnue par la calnexine comme une protéine mal repliée et n'est pas exprimée à la surface des cellules, ce qui cause la maladie (Gregersen 2006).

D'autres protéinopathies sont associées à un âge avancé, comme la maladie d'Alzheimer (voir aussi section 1.5.3). Certains ont proposé qu'elles seraient causées par une diminution de l'expression des chaperones moléculaires chez les cellules plus âgées. D'autres suggèrent que les cellules plus vieilles ont accumulé plus de mutations et produisent donc plus de protéines mal repliées, ce qui causerait un encombrement et un mal fonctionnement de la machinerie de contrôle de qualité (Chaudhuri and Paul 2006).

Figure 1.5 : Le système de dégradation des protéines. Les protéines mal-repliées sont reconnues par le système de contrôle de qualité des Hsp40-70 (1). Si les chaperones moléculaires ne parviennent pas à replier correctement les protéines, elles seront ubiquitinées. L'ubiquitine (représentée par les cercles rouges) est activée par les protéines E1, puis attachée sur les protéines E2 (2). Les ubiquitines-ligases E3 transfèrent ensuite l'ubiquitine sur la protéine mal repliée (3). Cette ubiquitination se répétera jusqu'à former une courte chaîne de poly-ubiquitine. Les protéines poly-ubiquitinées sont ensuite reconnues et dégradées par le protéasome 26S (4). Modifiée d'après Goldberg (2003).



1.4 ClpB et Hsp104 : les désagrégases moléculaires

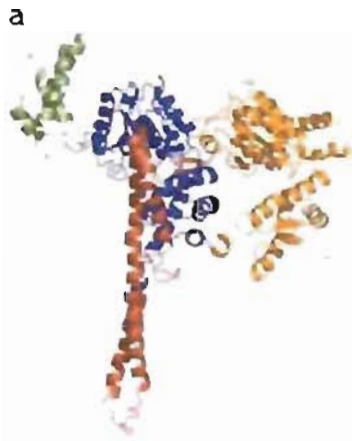
Parfois, les cellules subissent des stress si violents qu'une grande quantité de protéines sont dénaturées à la fois. Les Hsp70, assistés des Hsp40, se lient aux protéines mal repliées et tentent de leur redonner leur conformation native. Par contre, leur activité désagrégase est plutôt limitée face aux agrégats de grande taille (Diamant et al. 2000; Ben-Zvi et al. 2004; Zietkiewicz et al. 2004). Dans ces conditions, la machinerie des chaperones moléculaires de la cellule est rapidement saturée et certaines fonctions vitales comme la traduction sont affectées, ce qui empêche la cellule de répondre efficacement à la situation. Pour survivre, la cellule doit rapidement redonner à un maximum de protéines leur conformation native (Weibezahn et al. 2004).

Chez la levure *S. cerevisiae*, la protéine Hsp104 a été identifiée comme le principal facteur de la thermotolérance, soit la résistance aux chocs thermiques (Sanchez and Lindquist 1990). Des études *in vitro* ont montré que Hsp104 purifié peut renaturer seule des protéines agrégées, mais aussi que Hsp104 est plus efficace en coopérant avec les Hsp40-70 (Glover and Lindquist 1998; Shorter and Lindquist 2006). Une analyse comparative de la séquence de Hsp104 permet de classer cette chaperone comme une protéine de la famille des AAA+ (« ATPases associated with various cellular activities »). Des homologues de Hsp104 ont été caractérisés chez plusieurs organismes et organelles, mais pas chez les vertébrés. L'homologue bactérien, nommé ClpB, est mieux caractérisé que Hsp104. Je présente donc d'abord la protéine ClpB du point de vue de sa structure avant de m'attarder aux détails de son mécanisme d'action. Pour finir, je compare les connaissances acquises avec ClpB avec les données recueillies avec Hsp104.

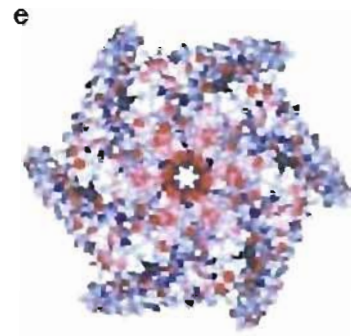
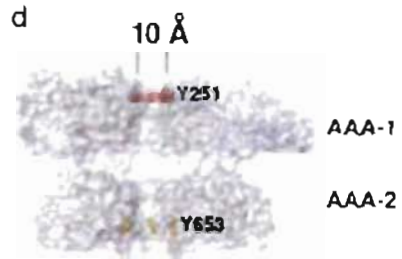
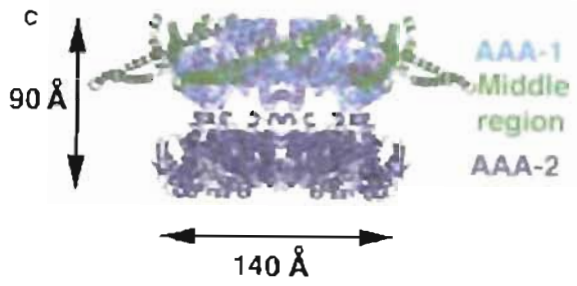
1.4.1 Analyse structurale de ClpB

Les protéines AAA+ ont une forte tendance à oligomériser sous la forme d'un hexamère ou d'un heptamère présentant un pore en son centre (Hanson and Whiteheart 2005). Les protéines AAA+ sont caractérisées par la présence d'un ou de deux modules ATPase (modules AAA) ; ClpB possède deux modules AAA (Fig 1.6). La structure de ClpB de la bactérie *Thermus thermophilus* montre que les deux modules AAA forment le cœur de cette désagrégase (Fig 1.6) (Lee et al. 2003). Chaque domaine AAA est formé d'un site de liaison à l'ATP et d'une courte boucle flexible, tous deux très conservés chez toutes les protéines AAA+. Au centre de chacune de ces boucles, on trouve un résidu tyrosine qui est positionné de manière à fermer le pore de l'hexamère (Schlieker et al. 2004b; Lee et al. 2007). L'analyse de la structure de ClpB révèle également la présence d'un élément de type torsade torsadée, nommé domaine M, qui s'élance hors de la structure générale de l'hexamère au niveau du premier module AAA (Fig 1.6). Le domaine M est spécifique aux désagrégases et n'est pas retrouvé chez les autres protéines AAA+. Ce domaine est flexible et son mouvement est essentiel à la fonction désagrégase de ClpB (Lee et al. 2003). Ce domaine est aussi impliqué dans l'interaction de ClpB avec ses partenaires Hsp40-70 (Haslberger et al. 2007).

Figure 1.6 : Structure de la désagrégase ClpB. Schémas et structures adaptés de Lee et al. (2003), Shorter and Lindquist (2005) et Bosl et al. (2006). (a) Structure cristalline obtenue pour un monomère de ClpB de *Thermus thermophilus*. Les deux modules AAA sont colorés en bleu (le premier) et en orange (le second), le domaine M en rouge et le domaine *N*-terminal en vert. La queue *C*-terminale n'est pas représentée. (b) Schéma présentant l'organisation des domaines de ClpB, ClpA, ClpX et Hsp104. L'organisation prédite de Hsp104 est identique à celle de ClpB, à l'exception de sa queue *C*-terminale. ClpA, elle, diffère surtout de ClpB par le domaine M, tandis que ClpX ne contient qu'un seul module AAA. (c) Représentation de l'hexamère de ClpB vu de côté. L'identification des différents domaines respecte le même code de couleur qu'en (b). (d) Présentation des deux résidus tyrosines Y251 (en rouge) et Y653 (en jaune) situées dans les boucles flexibles au centre de l'hexamère de ClpB. L'hexamère est vu de côté avec deux monomères en moins (e) Modèle de l'hexamère de ClpB vue de haut, l'extrémité *N*-terminale face au lecteur, dans sa représentation de potentiel électrostatique de surface, les résidus bleus et rouges indiquant les zones chargées positivement et négativement. Les représentations de l'hexamère de ClpB présentées en (c), (d) et (e) ont été construites à partir de la structure de ClpB sans son domaine *N*-terminal.



b



ClpB possède également un domaine globulaire à son extrémité *N*-terminale. Ce domaine est formé de deux hélices alpha repliées sur elles-mêmes, le tout étant articulé par un court segment flexible le liant au premier module ATPase (Lee et al. 2003; Li and Sha 2003). Cette organisation forme une structure en coquille dont le centre est hydrophobe et la périphérie riche en résidus polaires. Cette structure suggère que ce domaine pourrait lier un polypeptide linéaire (Lee et al. 2003; Li and Sha 2003; Tanaka et al. 2004b; Barnett et al. 2005). À l'autre extrémité de la molécule, le second module AAA se termine par une courte extension peu structurée et peu caractérisée qui est très peu conservée entre les différentes désagrégases (voir section 1.4.3).

1.4.2 Mécanisme d'action de ClpB

On peut diviser le mécanisme d'action de ClpB en deux grandes étapes : la reconnaissance des protéines-agrégées et la désagrégation de ces protéines. Des études récentes montrent que ClpB peut lier et désagréger ses substrats de manière autonome *in vitro* (Doyle et al. 2007a; Doyle et al. 2007b). Par contre, la solubilisation des agrégats protéiques est beaucoup plus efficace si ClpB s'associe avec d'autres chaperones, notamment avec la Hsp70 bactérienne DnaK et ses co-chaperones DnaJ (Hsp40) et GrpE (facteurs d'échange de nucléotides) (Mogk et al. 1999; Motohashi et al. 1999; Zolkiewski 1999). De plus, l'interaction entre ClpB et le complexe DnaK-DnaJ-GrpE est spécifique (Glover and Lindquist 1998; Schlee et al. 2004; Haslberger et al. 2007). Une étude menée avec des bibliothèques de peptides révèle que ClpB reconnaît les peptides présentant des résidus aromatiques, mais aussi des résidus chargés positivement (lysine et arginine) (Schlieker et al. 2004b). Il est aussi intéressant de constater que la capacité de désagrégation de ClpB est surtout nécessaire pour solubiliser les agrégats riches en structures secondaires de type bêta, alors que DnaK (assisté des co-chaperones DnaJ et de GrpE) est en mesure de désagréger les autres types d'agrégats, ce qui suggère que ClpB possède une certaine spécificité pour ce type de substrat (Lewandowska et al. 2007).

L'analyse de la structure du domaine *N*-terminal de ClpB (voir 1.4.1) suggère que ce domaine jouerait un rôle important dans la reconnaissance des substrats. Pourtant, la production d'une protéine tronquée de son domaine *N*-terminal n'affecte pas de manière marquée son activité désagrégase, ce qui démontre que ce domaine n'est pas essentiel à la reconnaissance des substrats (Beinker et al. 2002; Mogk et al. 2003; Schlieker et al. 2004b). Par contre, d'autres études démontrèrent que le domaine *N*-terminal de ClpB, bien que n'étant pas essentiel à la fonction désagrégase, facilite la liaison aux agrégats protéiques de tailles importantes (Barnett et al. 2005; Chow et al. 2005). Des résultats semblables ont été obtenus pour ClpA, une autre chaperone AAA, ce qui ammena l'hypothèse que le domaine *N*-terminal de ClpA agit un peu comme une tentacule très mobile qui facilite le recrutement et la liaison aux substrats (Ishikawa et al. 2004; Xia et al. 2004). Comme ClpA et ClpB sont structurellement similaires, on peut envisager un modèle semblable pour ClpB.

Le site principal de reconnaissance des substrats de ClpB se trouve sur le premier module AAA (voir 1.4.1 et Fig 1.6). Chaque module AAA porte une boucle flexible contenant un résidu tyrosine. La structure de ClpB, montre que ces boucles se trouvent au centre de l'hexamère et que le résidu tyrosine du premier module AAA ferme l'entrée du pore de l'hexamère (Fig 1.6). Le résidu tyrosine de cette boucle (Y251) y joue un rôle crucial (Schlieker et al. 2004b). Les boucles flexibles sont également responsables de l'activité désagrégase de ClpB. L'étude du rôle de chaque module ATPase montre que la liaison des substrats est ATP-dépendante du premier module AAA+ tandis que la relâche des substrats est effectuée par le second module (Bosl et al. 2005; Lee et al. 2007). La construction d'une chimère de ClpB capable, comme ClpA, de lier le complexe de dégradation de ClpP permit de confirmer que ClpB désagrège les protéines en forçant leur passage au centre de l'hexamère par le mouvement ATP-dépendant des boucles portant les résidus Y251 et Y653 (Fig 1.6). Comme l'ouverture de ce pore ne fait que 10 Å, les protéines ne peuvent être transloquées que lorsqu'elles ont perdu toute structure (Weibezahn et al. 2004). Un mécanisme de translocation semblable a été démontré pour

ClpA (Fig 1.5) et plusieurs autres protéines AAA, ce qui démontre une certaine conservation dans le mode d'action de cette famille de protéines (Hinnerwisch et al. 2005). D'autres études confirment que les substrats de ClpB sont relâchés sous la forme de protéines monomériques linéarisées (Watanabe et al. 2000; Schlieker et al. 2004a; Doyle et al. 2007b). ClpB permet ainsi aux protéines agrégées de reprendre leur repliement du début, ce qui permet leur réactivation. Il est fort probable que cette renaturation des protéines soit assistée par les autres chaperones cytosoliques, mais aucun modèle précis n'a encore été proposé pour cette partie du mécanisme de désagrégation de ClpB. Pour finir, soulignons que le domaine M est également nécessaire à l'activité de ClpB (Mogk et al. 2003). Bien que le rôle du domaine M dans le mécanisme de désagrégation soit encore mal défini, ce domaine flexible semble réguler l'activité ATPase du premier module AAA+ et assister l'interaction avec ses partenaires DnaK-DnaJ-GrpE (Haslberger et al. 2007).

1.4.3 Similarités et différences entre Hsp104 et ClpB

Tout comme ClpB, Hsp104 coopère activement avec la machinerie des Hsp40-70 pour désagréger de manière efficace les protéines mal repliées, tout en étant capable d'agir seul (Glover and Lindquist 1998; Doyle et al. 2007b). Le mécanisme d'action de Hsp104 est par contre mal compris et peu étudié. La conservation des modules AAA+ et de leurs boucles flexibles suggère que Hsp104 utilise un mode de désagrégation semblable à celui décrit pour ClpB (Lum et al. 2004). L'étude de l'activité ATPase révèle aussi que c'est le premier module AAA+ qui est responsable de la liaison des protéines à Hsp104, tandis que le second module est crucial pour la relâche des polypeptides. La linéarisation des protéines-substrats a également pu être observée *in vitro* (Bosl et al. 2005; Doyle et al. 2007b; Schaupp et al. 2007). La régulation et la coordination de l'activité des deux domaines ATPase sont également cruciales pour l'activité de Hsp104, comme pour ClpB. Aussi, il semble que le domaine M joue un rôle important dans cette action coordonnée des modules AAA+ (Cashikar et al. 2002). Finalement, comme chez ClpB, le domaine N-

terminal semble jouer un rôle accessoire dans la reconnaissance des substrats et dans l'activité de Hsp104 (Hung and Masison 2006).

La plus grande différence existant entre Hsp104 et ClpB se trouve au niveau de leurs interactions avec certains types d'agrégats protéiques. En effet, en plus de désagréger les amas protéiques formés dans des conditions de stress, Hsp104 peut, contrairement à ClpB, solubiliser des protéines agrégées sous la forme de fibres amyloïdes (voir section 1.5 et 1.7.4 pour plus de détails) (Shorter and Lindquist 2004). Des études menées *in vivo* montrent aussi que la thermotolérance et la solubilisation des fibres amyloïdes sont deux activités qui peuvent être indépendantes (Hattendorf and Lindquist 2002; Jung et al. 2002; Hung and Masison 2006; Kurahashi and Nakamura 2007). Bien que plusieurs substrats sont maintenant connus pour Hsp104, aucune étude systématique n'a jusqu'ici été effectuée pour caractériser la reconnaissance des substrats de cette chaperone. Une étude menée avec des homopolymères d'acides aminés a par contre montré que tout comme ClpB, la liaison aux peptides riches en résidus basiques comme la poly-L-lysine stimule grandement l'activité ATPase de Hsp104. Selon cette étude, la queue C-terminale de la protéine semble être un site de liaison aux substrats (Cashikar et al. 2002). Cette partie de la protéine est très riche en résidus acides et n'est pas retrouvée chez ClpB (Fig 1.6). On a également proposé que la partie C-terminale de Hsp104 joue un rôle de recrutement de co-chaperones associées aux Hsp90. Cette hypothèse repose sur la haute concentration en résidus acides de la queue C-terminale de Hsp104 qui est similaire au motif TPR reconnue par les co-chaperone associées aux Hsp90 (voir section 1.3.1.2). Deux études ont également montré une association entre Hsp104 et deux co-chaperones des Hsp90, l'une d'elle identifiant les huit dernier résidus de Hsp104 comme domaine d'interaction (Abbas-Terki et al. 2001; Liou et al. 2007). L'impact de ces interactions sur l'activité de Hsp104 n'a pas été étudié.

1.5 Les fibres amyloïdes

Le terme « amyloïde » fut utilisé pour la première fois dans le contexte de la pathologie par Rudolph Virchow en 1854 pour décrire des anomalies du foie d'un patient souffrant d'amyloïdose systémique. Il utilisa ce terme en référence à l'amidon (amylon en grec) car il croyait que des dépôts de cellulose étaient responsables de la maladie (Westermarck 2005). De nos jours, nous savons que ces dépôts amyloïdes sont formés de protéines agrégées en fibres ordonnées. L'identification des dépôts et des fibres amyloïdes se fait encore aujourd'hui de manière empirique, par leur liaison à des colorants tel que le Rouge Congo et la thioflavin T (Elghetany and Saleem 1988; Khurana et al. 2005), mais les détails structuraux des fibres amyloïdes sont maintenant connus. Cette section décrit la structure et la formation des fibres amyloïdes, ainsi que leurs impacts dans plusieurs maladies.

1.5.1 Structure et caractéristiques des fibres amyloïdes

Les fibres amyloïdes sont des agrégats protéiques aux caractéristiques bien particulières. Une analyse des propriétés physiques des fibres amyloïdes d'insuline au niveau atomique nous informe qu'elles possèdent une force comparable à l'acier et une rigidité semblable à celle de la soie (Smith et al. 2006). Cette grande résistance aux assauts physiques s'explique par la structure particulière des fibres amyloïdes, qui sont principalement formées par un important réseau de ponts hydrogène (Meersman and Dobson 2006). Ces fibres sont principalement constituées de brins β étroitement compactés les uns aux autres dans une conformation dite « cross- β » (Fig 1.7) où les feuillets β sont perpendiculaires à l'élongation des fibres (Dobson 2004; Ohnishi and Takano 2004). Cette conformation « cross- β » est très stable, probablement même plus stable que la conformation native des protéines (Meersman and Dobson 2006).

Même si le cœur des fibres amyloïdes adopte une structure commune, chaque protéine stabilise cette conformation par plusieurs facteurs incluant l'hydrophobicité, la disposition des résidus chargés et la propension à adopter une structure en feuillet β . La composition en acides aminés des protéines impliquées est donc importante dans la détermination de la structure précise de chaque fibre amyloïde (Fig 1.7). Par exemple, les protéines présentant des extensions riches en glutamines et en asparagines (désignées sous le terme de polyQ/N) sont connues pour former spontanément des fibres amyloïdes. Ce phénomène est d'ailleurs la cause de plusieurs maladies (voir 1.5.3). La détermination de la structure des fibres amyloïdes de polyQ/N a également révélé que ces fibres sont stabilisées par des interactions inédites très étroites entre les résidus polaires qui s'imbriquent les uns aux autres (Nelson et al. 2005; Sikorski and Atkins 2005). Aussi, une étude récente propose que la structure des « zipper » polaires pourrait être commune à toutes les fibres amyloïdes (Sawaya et al. 2007). Finalement, il faut aussi savoir que la détermination de la structure des fibres ne permet pas de déterminer l'organisation des fibres entre elles, qui sont souvent torsadées les unes aux autres (Fig 1.7).

1.5.2 Formation des fibres amyloïdes

L'étude du repliement des protéines *in vitro* a énormément contribué à notre compréhension des facteurs favorisant la formation de fibres amyloïdes. Tel que vu à la section 1.2.2, lorsque le repliement protéique est perturbé, on observe l'apparition d'agrégats de protéines liées entre elles par des interactions protéines-protéines aberrantes (Fig 1.1). L'étude des agrégats protéiques a montré que ceux-ci possèdent une composition enrichie en feuillets β . Aussi, on a pu observer que les agrégats protéiques désordonnés tendent à adopter une structure intermédiaire possédant une partie des caractéristiques des fibres amyloïdes ; on nomme ces espèces protéiques « oligomères amyloïdes ». Ces oligomères peuvent ensuite former des fibres amyloïdes matures (Ohnishi and Takano 2004; Meersman and Dobson 2006).

En utilisant la capacité des fibres amyloïdes à lier des colorants comme la thioflavine T, il a été possible d'étudier la cinétique de formation des fibres amyloïdes. Ces études *in vitro* démontrent que la formation des fibres amyloïdes suit une cinétique sigmoïdale en trois phases comprenant une phase lente, une augmentation rapide suivie d'une stabilisation (Fig 1.8). Il est également possible d'éliminer la première phase lente par l'ajout de fibres amyloïdes déjà formées (Harper and Lansbury 1997; Meredith 2005).

La formation des fibres amyloïdes exige l'adoption d'une structure complexe très ordonnée qui est souvent très différente de la conformation native des protéines. Ainsi, bien peu de protéines forment des fibres amyloïdes dans des conditions normales. Par contre, des conditions dénaturantes (variations de pH, dénaturant chimique, élévation de la température) de même qu'une altération de la séquence primaire (par des mutations ou par une protéolyse) peuvent favoriser la formation de fibres amyloïdes (Dobson 2004; Ohnishi and Takano 2004; Stathopoulos et al. 2004). Dans ces conditions, il a été possible d'obtenir des fibres amyloïdes à partir de protéines n'étant impliquées dans aucune pathologie (Jimenez et al. 1999; Fandrich et al. 2001). De même, certains homopolymères comme la polylysine et la polythréonine sont en mesure de former des fibres amyloïdes (Fandrich and Dobson 2002). Ces données suggèrent que la formation des fibres amyloïdes est une caractéristique générique de tous les polypeptides (Chiti et al. 1999; Dobson 2004).

Figure 1.7 : Représentations structurelles de quelques fibres amyloïdes. Protofilament (a) et fibre amyloïde mature (b) obtenue avec le domaine SH3 de la phosphatidylinositol-3'-kinase (Dobson 1999; Jimenez et al. 1999). La fibre amyloïde mature est constituée de quatre protofilaments torsadés. (c) Protofilament de la protéine A β vu le long de l'axe d'élongation de la fibre amyloïde. Les régions 12-24 (en rouge) et 30-40 (en bleu) forment les feuillets β (Tycko 2003). (d) Fibre du domaine prionique de la protéine HET-s, responsable du prion [*Het-s*] chez *Podospora anserina* (voir section 1.7.2) (Ritter et al. 2005). (e) Fibre du domaine prionique NM de la protéine Sup35, responsable du prion de levure [*PST*⁺] (voir section 1.7.3.2). Les régions 25-38 (en rouge), 39-90 (en bleu) et 91-106 (en vert) forme le cœur de la fibre (Krishnan and Lindquist 2005).

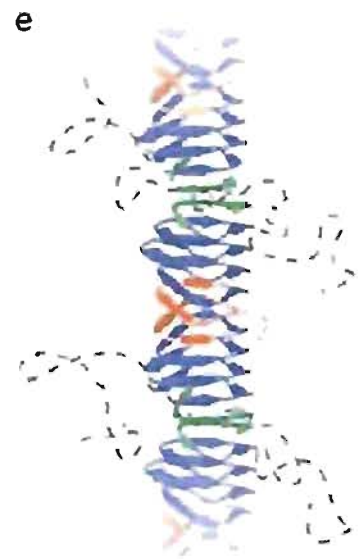
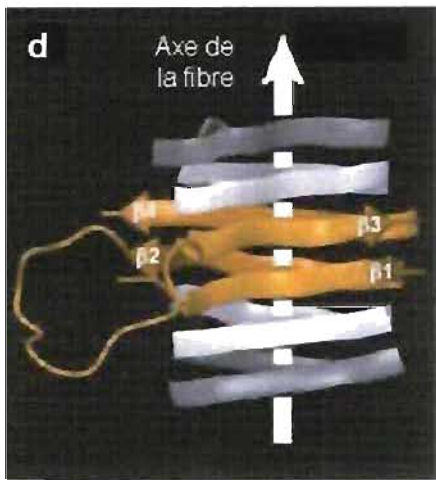
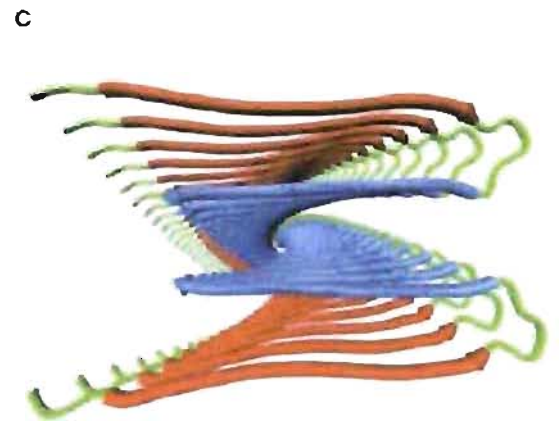
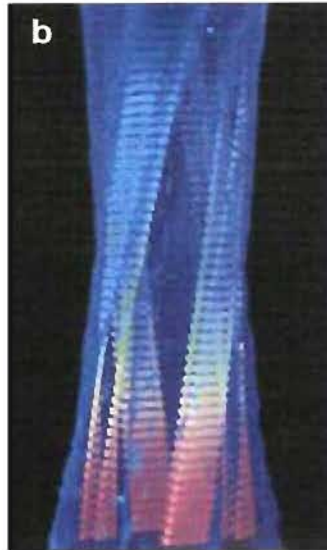
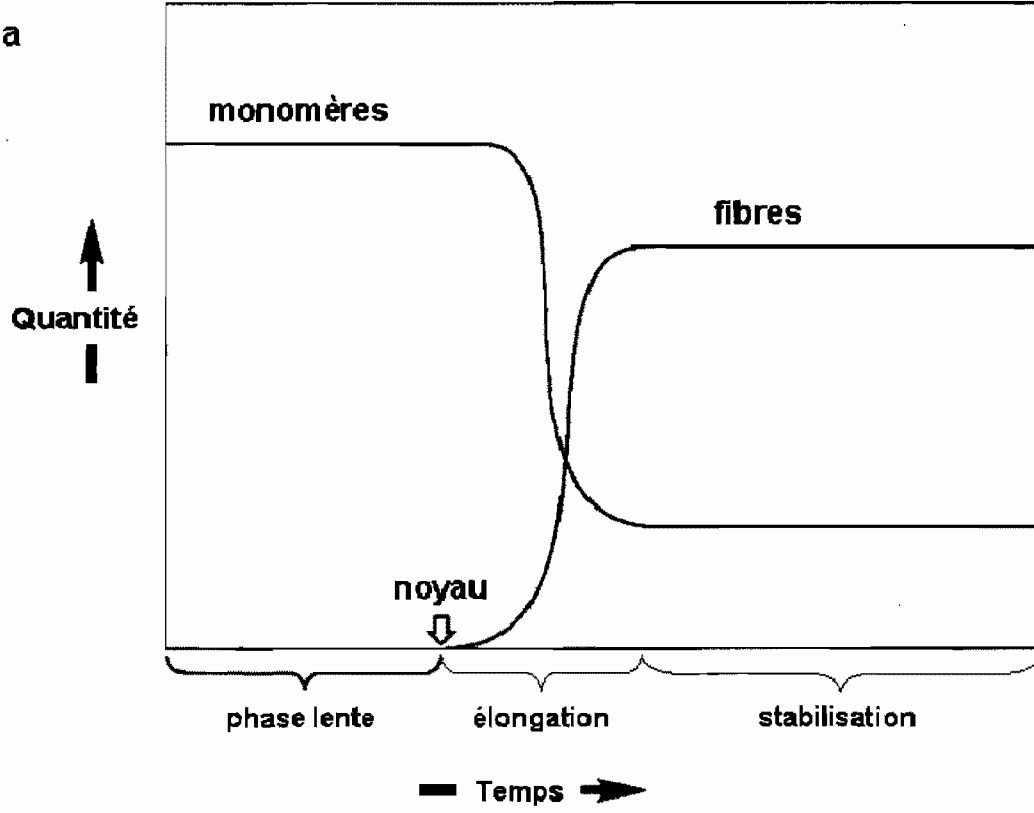
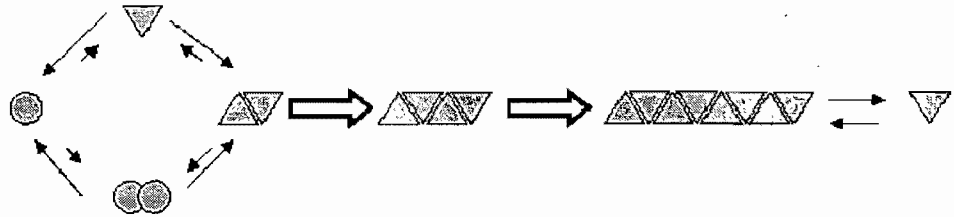


Figure 1.8 : Cinétique de formation des fibres amyloïdes en solution. (a) Schéma théorique montrant la quantité de protéines solubles (monomères) et la quantité de fibres amyloïdes (fibres) retrouvées en solution au cours du temps à une concentration donnée suffisante pour favoriser l'agrégation (d'après Harper and Lansbury 1997). La quantité de fibres amyloïdes retrouvée en solution est mesurée par la fluorescence de colorants comme la thioflavine T ou le Rouge Congo, qui se lient spécifiquement aux fibres amyloïdes. Le noyau est une forme d'agrégat qui change l'équilibre de la solution et favorise la polymérisation des protéines qui s'y trouve en fibres amyloïdes. On assimile souvent les oligomères amyloïdes au noyau de la réaction. (b) Représentation des espèces protéiques retrouvées en solution dans les trois phases de la formation des fibres amyloïdes. Le cercle représente la protéine en conformation native et le triangle représente la forme amyloïde de cette protéine.

a



b



1.5.3 Les amyloïdies et la toxicité des fibres amyloïdes

Les fibres amyloïdes sont impliquées dans plus de 40 maladies (Chiti and Dobson 2006). Leur étude a révélé que les fibres amyloïdes sont principalement constituées d'une seule protéine agrégée. Parmi les amyloïdies, on compte de nombreuses maladies neurodégénératives, notamment les maladies d'Alzheimer et de Parkinson qui sont les plus dévastatrices, mais aussi le diabète de type II, la Chorée de Huntington et la formation de cataracte (Kelly 1998; Shastry 2003; Chiti and Dobson 2006). La présence de fibres amyloïdes, avec leurs caractéristiques particulières, affecte le fonctionnement normal de la cellule. Dans le cas des amyloïdoses systémiques, la toxicité est causée par l'accumulation de quantités importantes de fibres amyloïdes dans les tissus, jusqu'à plusieurs kilos, ce qui finit par encombrer les organes et entraîner le décès (Dobson 2004; Chaudhuri and Paul 2006). Dans le cas des amyloïdies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer par contre, les espèces les plus toxiques sont des oligomères amyloïdes solubles composé de quelques molécules de la protéine A β (Meredith 2005; Lesne et al. 2006). L'étude des fibres amyloïdes obtenues *in vitro* à partir de diverses protéines a permis d'établir que la toxicité est une propriété inhérente à toute fibre amyloïde et que cette toxicité était principalement causée par les oligomères (Bucciantini et al. 2002; Bucciantini et al. 2004; Baglioni et al. 2006).

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la toxicité des oligomères amyloïdes. Certains estiment que les espèces amyloïdes agissent comme tout autre protéines mal repliées et génèrent simplement un important stress d'agrégation protéique (voir section 1.2.2) (Meredith 2005; Chiti and Dobson 2006). D'autres proposent que les oligomères amyloïdes sont cytotoxiques parce qu'ils perturbent les membranes cellulaires. Différents laboratoires ont en effet observé que plusieurs oligomères amyloïdes pathogènes ou conçus *de novo* étaient amphiphiliques et avaient la capacité de se lier aux membranes cellulaires et de les perméabiliser (Meredith 2005; Glabe 2006; Glabe and Kaye 2006). Ce mode de toxicité s'apparenterait à celui de certaines toxines bactériennes (Bieler et al.

2005; Geny and Popoff 2006; Oh et al. 2007). Une variante de cette hypothèse est que la toxicité de certaines protéines amyloïdes comme PrP (la protéine responsable de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, voir section 1.6 et tableau I) et A β peut être expliquée par la présence d'un motif de « zipper » de glycines encodé dans leur séquence. Ce motif riche en glycines est également retrouvé chez certaines toxines bactériennes. De plus, la conservation des résidus glycines de la protéine A β est importante dans la toxicité et la perméabilisation des membranes par cette protéine (Kim et al. 2005). Par contre, on ne retrouve ce motif que dans la séquence de quelques protéines amyloïdes.

Le rôle des fibres amyloïdes matures dans la toxicité des espèces amyloïdes *in vivo* reste encore sujet à débat. En effet, certains considèrent les fibres et plaques amyloïdes comme des réservoirs potentiels d'oligomères toxiques (Haass and Selkoe 2007). Cette hypothèse reste encore à être démontrée, mais est soutenue par l'étude de la dynamique des fibres amyloïdes (voir 1.5.2) (Carulla et al. 2005). D'autres soutiennent que la cellule est en mesure de maintenir les fibres amyloïdes dans un état non-toxique grâce à sa machinerie de contrôle de qualité des protéines. Il a en effet été démontré que plusieurs chaperones moléculaires pouvaient limiter ou abolir la toxicité des espèces amyloïdes dans plusieurs, sinon toutes les maladies amyloïdes. L'étude des chaperones comme outil thérapeutique pourrait donc mener à des thérapies efficaces pour lutter contre les amyloïdies (Chaudhuri and Paul 2006; Gregersen 2006).

Tableau I : Description de quelques amyloïdies et de leur protéine amyloïde associée.

Amyloïdie	Protéine associée	polyQ/N	Localisation cellulaire	Organes touchés
Maladie d'Alzheimer	A β	Non	extracellulaire	SNC
Maladie de Parkinson	α -synucléine	Non	cytoplasmique	SNC
Maladie de Creutzfeld-Jakob	PrP	Non	membranaire	SNC
Diabète de type II	amyline (IAPP)	Non	extracellulaire	pancréas
Amylose systémique secondaire	protéine amyloïde A (SAA)	Non	extracellulaire	systémique
Chorée de Huntington	huntingtine	Oui	nucléaire et cytoplasmique	SNC

SNC signifie système nerveux central. IAPP est l'abréviation de « islet amyloid polypeptide », un autre nom de l'amyline et SAA est pour « serum amyloid A ».

1.5.4 Les fibres amyloïdes fonctionnelles

De plus en plus d'études démontrent aussi que les protéines amyloïdes peuvent être utilisées à des fins utilitaires par divers organismes. Récemment, il a été démontré qu'une protéine de mammifère, nommée Pmel17, formait des fibres amyloïdes dans un but fonctionnel (Fowler et al. 2006). Cette protéine est impliquée dans la formation de la pigmentation par la mélanine. La fibrine pourrait aussi former des fibres amyloïdes lors de la coagulation sanguine (Kranenburg et al. 2002; Gebbink et al. 2005). Les champignons, certaines levures et quelques bactéries ont aussi su tirer profit de la composition très hydrophobe des protéines amyloïdes. Trois grandes familles de protéines, les hydrophobines, les chaplines et les curlines, sont sécrétées à l'extérieur des cellules où elles polymérisent pour former un manteau de fibres amyloïdes. Ces trois familles de protéines

utilisent les caractéristiques exceptionnelles des fibres amyloïdes pour se protéger du milieu extérieur, mais également pour réduire la surface de tension de l'eau, ce qui facilite la dispersion aérienne de ces microorganismes et leur attachement à l'hôte (Gebbinck et al. 2005; Chiti and Dobson 2006; Fowler et al. 2007). De même, certains poissons et insectes, comme le ver à soie, forment des fibres amyloïdes pour fabriquer leurs œufs avec les protéines de chorion (Iconomidou et al. 2000; Podrabsky et al. 2001). Il semble donc que les fibres amyloïdes soient utilisées par les êtres vivants dans des buts utilitaires de natures diverses.

1.6 Les maladies à prions : quand l'agrégation se propage

C'est Stanley Prusiner qui, il y a 25 ans, inventa le terme prion (« protéine infectieuse ») en proposant que l'élément infectieux de la tremblante du mouton, était uniquement composé de protéines. L'identification de cette protéine (qu'il nomma PrP, « Prion Protein ») lui valut un prix Nobel en 1997 (Prusiner 1982; Sailer et al. 1994; Prusiner 1998). Une décennie plus tard, nous pouvons maintenant définir les prions comme une protéine présentant une conformation alternative, dite prionique, capable de propager sa conformation de manière autorépliquative aux autres protéines. Cette maladie affecte également les bovins (maladie de la vache folle), les cervidés (maladie débilante chronique) et les humains (variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob). Ces maladies à prions sont regroupées sous le terme d'encéphalopathies spongiformes transmissibles ou TSE (Prusiner 1998; Mabbott and MacPherson 2006). Bien que la grande majorité des transmissions de maladies à prions soient causées par la consommation de viande contaminée, on a également rapporté des cas de transmission de TSE par des manipulations médicales, notamment par des transfusion de sang ou d'autres produits contaminés (Flechsigt et al. 2001; Mabbott and MacPherson 2006). Puisque les TSE sont fatales et sans remèdes connus, la propagation des prions constitue un problème de santé publique sérieux. De nombreuses études ont été effectuées pour élucider les mécanismes de propagation des prions, mais encore aujourd'hui, certains aspects de cette propagation demeurent obscurs.

Je présenterai donc un résumé des connaissances acquises sur la protéine responsable des TSE, PrP, dans sa forme native et dans sa forme prionique. Je ferai ensuite un bref survol des dernières avancées visant à recréer *in vitro* la propagation des prions. La dernière partie sera consacrée à l'analyse de la toxicité de la forme prionique de PrP.

1.6.1 La protéine PrP, structure et fonction

Le prion retrouvé chez les mammifères est propagé par la protéine PrP. On identifie l'isoforme normale par PrP^C (pour constitutive) et l'isoforme pathogène capable de se propager PrP^{Sc} (pour « scrapie », faisant référence à la maladie de tremblante du mouton). PrP est une petite protéine ancrée à la surface cellulaire par une ancre GPI exprimée par la plupart des cellules (Prusiner 1998). PrP^C est constituée d'une extrémité *N*-terminale flexible et d'un domaine globulaire riche en hélices α (Prusiner 1998; Zahn et al. 2000). La structure de PrP^{Sc} est difficile à déterminer avec précision, mais on sait qu'elle est plus riche en feuillets β que PrP^C et qu'elle tend à former des fibres amyloïdes (Prusiner 1998; Chien et al. 2004; Harris and True 2006). La structure exacte de PrP^{Sc} est inconnue, de même que sa fonction. De plus, on ignore si PrP^{Sc} adopte la même structure lors de sa transmission et de la formation des fibres amyloïdes ni quelle structure est toxique pour la cellule (voir sections suivantes).

La fonction de PrP^C reste encore aujourd'hui mal comprise, principalement parce que les animaux n'exprimant pas cette protéine ne présentent aucun défaut physiologique évident (Marc et al. 2007). On sait que PrP^C peut lier au moins deux types de molécules : les métaux et les sucres (les glucosaminoglycans par exemple) (Caughey and Baron 2006; Marc et al. 2007). Le rôle physiologique de cette affinité pour les métaux et les sucres reste encore à déterminer et plus d'une dizaine de fonctions ont été proposées pour la protéine PrP^C. L'hypothèse principale à ce jour est que la fonction de PrP^C serait celle de senseur multifonctionnel (Caughey and Baron 2006; Marc et al. 2007).

1.6.2 Les preuves de « l'hypothèse prion »

On peut considérer les prions comme des protéines amyloïdes capables de propager leur conformation amyloïde d'une cellule à l'autre. Par contre, toutes les fibres amyloïdes ne sont pas des prions. Il a par exemple été impossible de transmettre la maladie d'Alzheimer à des rongeurs ou à des primates (Goudsmit et al. 1980; Godec et al. 1994; Chien et al. 2004), bien que l'injection de fibres amyloïdes semblent accélérer la progression de certaines amyloïdies (Soto et al. 2006). La propagation des prions nécessite donc d'autres caractéristiques ou l'assistance de facteurs particuliers (Chien et al. 2004; Harris and True 2006). Bien que la très grande majorité de la communauté scientifique accepte maintenant que les maladies à prions se propagent par la protéine PrP, il faut reconnaître que la preuve ultime de « l'hypothèse prion » soumise par Prusiner n'a pas encore été faite chez les mammifères. En effet, cette hypothèse suppose que les maladies à prions peuvent être générées *in vitro* avec des protéines recombinantes ayant adoptée *de novo* la conformation PrP^{Sc} (Baskakov 2007). Bien que cette expérience n'ait pas encore été réussie, deux équipes sont arrivées très près de démontrer cette « hypothèse prion ».

La première équipe a utilisé la capacité des protéines prioniques à servir de plateforme au changement conformationnel de PrP^C en PrP^{Sc}. Cette conversion peut être effectuée *in vitro* avec des protéines PrP purifiées mises en présence d'extraits contenant des particules prioniques, mais cette conversion est peu efficace (Kocisko et al. 1994). Le taux de PrP purifiée converti en prion peut être largement augmenté grâce à une technique nommée PMCA (« protein misfolding cyclic amplification ») basée sur la fragmentation des fibres par sonication. Le PMCA permet d'amplifier indéfiniment les prions à partir de protéines purifiées jusqu'à un point où il ne reste virtuellement aucune protéine PrP^{Sc} provenant de l'extrait initial (Soto et al. 2002; Castilla et al. 2005). Par contre, il n'a pas été possible jusqu'à présent de reproduire ces résultats avec des protéines recombinantes (rPrP), ce qui poussent certains à croire que d'autres facteurs sont nécessaires à la conversion de PrP (Baskakov 2007). Aussi, on a récemment réussi à produire la

conformation PrP^{Sc} *de novo* par cette approche en ajoutant des polyanions (des glucosaminoglycans par exemple) à la préparation (Deleault et al. 2007).

La seconde stratégie utilisée pour tenter de démontrer l'hypothèse prion consiste à favoriser l'agrégation *in vitro* des protéines PrP par des méthodes dénaturantes dans le but d'obtenir la conformation PrP^{Sc} *de novo*. Plusieurs études suggèrent que PrP^{Sc} est tronquée de sa partie *N*-terminale (Prusiner et al. 1983; Prusiner 1998). En utilisant des protéines recombinantes tronquées de PrP de souris et en les soumettant à des conditions partiellement dénaturantes, elles forment des fibres amyloïdes (Baskakov 2007). Ces fibres ont été injectées à des souris, qui développèrent la maladie avec un temps d'incubation assez long. Les extraits de PrP^{Sc} obtenues à partir de ce groupe de souris se sont également montrés contagieux lorsqu'ils ont été injectés à un second groupe de souris, mais ces dernières développèrent la maladie plus rapidement que les souris du premier groupe (Legname et al. 2004). Aucune explication satisfaisante n'a encore été émise pour expliquer ce phénomène « d'adaptation », mais les chaperones moléculaires ont souvent été proposées comme facteur espèce-dépendant, notamment sous l'appellation de la « protéine X » (Telling et al. 1995).

1.6.3 La propagation de PrP^{Sc}

Les particules prioniques sont capables de se transmettre d'une cellule à l'autre, de telle manière que l'ingestion de viande contaminée finira par causer la dégénération des cellules du cerveau. Il est généralement accepté que les prions sont incorporés au niveau des cellules intestinales, transmises ensuite au système lymphatique où ils s'accumulent avant de rejoindre finalement le système nerveux central (Nicotera 2001; Mabbott and MacPherson 2006; Beekes and McBride 2007). On en connaît bien peu sur le mécanisme par lequel les prions se transmettent d'une cellule à l'autre, mais une étude récente propose que PrP^{Sc} pourrait se propager en utilisant les exosomes, des petites vésicules sécrétées par les cellules (Vella et al. 2007). Plusieurs études suggèrent que le changement

conformationnel de PrP^C en PrP^{Sc} s'effectue à la surface cellulaire (Pinheiro 2006; Tatzelt and Schatzl 2007). L'expression d'une protéine PrP mutante ne portant pas d'ancre GPI a montré que l'ancrage de PrP^{Sc} est essentiel à sa toxicité, mais pas à sa propagation (Chesebro et al. 2005; Tatzelt and Schatzl 2007). Ainsi, si la conversion de PrP^C en PrP^{Sc} s'effectue à la membrane, il semble que son ancrage ne soit pas nécessaire. Le lien unissant l'ancre GPI à la toxicité n'est pas bien compris. Il est par ailleurs intéressant de constater que les particules prioniques les plus « infectieuses » (par injection intracérébrale, chez le hamster) sont constituées de 14 à 28 protéines PrP^{Sc} (Silveira et al. 2005). Comme pour la toxicité des fibres amyloïdes (voir section 1.5.3), l'infectivité des particules de PrP^{Sc} est donc principalement médiée par les oligomères et non par les fibres amyloïdes.

La propagation des prions est également sujette à un phénomène de « barrière des espèces » (Baskakov 2007). Par exemple, PrP^{Sc} de souris peut convertir PrP^C de hamster en PrP^{Sc}, mais l'efficacité de cette conversion est plus faible que celle de la protéine de souris. PrP^{Sc} de hamster par contre, est incapable de convertir PrP^C de souris (Kocisko et al. 1995; Chien et al. 2004). Cette barrière des espèces s'explique en partie par les différences de séquences protéiques de PrP entre les espèces (Chien et al. 2004; Tessier and Lindquist 2007). Par contre, les facteurs permettant la propagation des prions d'une espèce à l'autre sont très mal connus. Aussi, bien que la plupart des mammifères puissent être atteints de maladies à prions par la consommation de viande ou de farine animale contaminée, les seuls cas connus de transmission inter-espèce de PrP^{Sc} à l'homme résultent de la consommation de viande bovine d'animaux malades (Prusiner 1998). Beaucoup reste donc à faire pour que nous puissions bien comprendre, prévenir et traiter les maladies à prions.

1.7 Les prions de levure

Le concept de prion (protéine capable de propager sa conformation à d'autres protéines) fut repris par Reed Wickner en 1994, pour décrire un élément épigénétique transmis de manière non-chromosomique, nommé [URE3], chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. [URE3] est la forme prionique de Ure2p, une protéine sans aucune similitude avec PrP, le prion de mammifères (Wickner 1994). Cette découverte montra que d'autres protéines que PrP peuvent répondre à la définition de « protéines infectieuses » de Prusiner (voir section 1.6). Trois autres prions, [PSI⁺] et [PIN⁺] chez la levure *S. cerevisiae* et [Het-s] chez le champignon *Podospora anserina*, furent ensuite découverts (Tuite 1994; Coustou et al. 1997; Derkatch et al. 2000; Sondheimer and Lindquist 2000). Pour plus de simplicité, ces quatre prions seront regroupés sous le terme de prions de levure.

Comme les prions de mammifères, les prions de levure [URE3], [PSI⁺], [PIN⁺] et [Het-s] forment des fibres amyloïdes. Ces protéines adoptent donc au moins deux conformations, dont l'une, la forme prionique, est autorépliquative et forme des fibres amyloïdes tandis que l'autre, la forme native, est soluble. Ce changement conformationnel de la forme native à la forme prionique sera inévitablement accompagné d'un changement ou perte de la fonction de la protéine (Uptain and Lindquist 2002; Chien et al. 2004; Benkemoun and Saupe 2006).

L'étude des prions de levure a permis d'augmenter considérablement notre compréhension des prions. Cela nous a appris que seule une partie des protéines prioniques, nommé domaine prion ou PrD, est responsable de la formation des fibres amyloïdes à la base de la propagation des prions de levure. Aussi, il a été montré que ce domaine prionique est modulaire, c'est-à-dire qu'il peut être fusionné à tout autre peptide ou protéine et permettre une agrégation et une propagation de type prionique (Li and Lindquist 2000; Sondheimer and Lindquist 2000). On a également constaté que les PrD

des prions de *S. cerevisiae* sont riches en résidus asparagine et glutamine (polyQ/N, voir section 1.5 et Tableau II).

Tableau II : Description et nomenclature des prions connus :

Prion ¹	Phénotype non-prionique	Gène associé	Protéine impliquée	Organisme modèle	PrD ³ avec polyQ/N	PrD ³ avec répétitions
PrP ^{Sc}	PrP ^C	<i>PRNP</i>	PrP	Souris transgénique ²	Non	Oui
[<i>Het-s</i>]	[<i>Het-s*</i>]	<i>het-s</i>	HET-s	<i>Podospora anserina</i>	Non	Non
[<i>URE3</i>]	[<i>ure-o</i>]	<i>URE2</i>	Ure2p	<i>S. cerevisiae</i>	Oui	Non
[<i>PSI⁺</i>]	[<i>psi⁻</i>]	<i>SUP35</i>	Sup35p	<i>S. cerevisiae</i>	Oui	Oui
[<i>PIN⁺</i>]	[<i>pin⁻</i>]	<i>RNQ1</i>	Rnq1p	<i>S. cerevisiae</i>	Oui	Non

¹ : Le prion et le phénotype prionique sont normalement désignés sous le même terme.

² : Les souris transgéniques exprimant le gène humain *PRNP* sont le principal modèle d'étude. D'autres données sont obtenues d'humains ou d'animaux malades.

³ : PrD est une abréviation pour domaine prionique. Le PrD est la région minimale de la protéine requise pour former les fibres amyloïdes nécessaire à la propagation des prions. Deux caractéristiques des PrD sont identifiées ici : la présence d'une région riche en asparagine et/ou glutamine (polyQ/N) et la présence de pseudo-répétitions.

Comme c'est le cas pour les prions de mammifères, la preuve ultime de la présence de prions demeure la transmission par l'injection de fibres amyloïdes générées *de novo* avec des protéines recombinantes. Or, contrairement au prion PrP^{Sc} responsable des TSE (section 1.6 et Tab II), cette preuve de l'hypothèse prion a été obtenue pour les quatre prions de levure (Sparrer et al. 2000; Maddelein et al. 2002; King and Diaz-Avalos 2004; Tanaka et al. 2004a; Brachmann et al. 2005; Patel and Liebman 2007). La structure des

fibres amyloïdes des prions [*Het-s*] et [*PSI*⁺] a récemment été décrite (Krishnan and Lindquist 2005; Nelson et al. 2005; Ritter et al. 2005). Dans les sections suivantes, je présente les quatre prions de levure, puis je m'attarderai sur [*cif*], un élément non-chromosomique qui pourrait bien être le premier prion découvert chez la levure *S. pombe*.

1.7.1 Présentation des prions de levures

1.7.1.1 [*URE3*]

Premier prion identifié chez une levure, [*URE3*] est la forme prionique de la protéine Ure2p. Cette protéine est la première enzyme de la voie de biosynthèse de l'uracile et elle utilise l'ammoniaque ou la glutamine comme substrat. Son rôle consiste à réprimer des gènes permettant l'importation de sources azotées moins efficaces comme l'uréidosuccinate (USA) (Wickner et al. 1999). Les cellules possédant le prion [*URE3*] peuvent quant à elles utiliser l'USA comme source d'azote, ce qui permet de les différencier facilement sur pétri (Lacroute 1971; Aigle and Lacroute 1975). Ainsi, la protéine Ure2p ne peut plus accomplir sa fonction lorsqu'elle est sous sa forme amyloïde prionique (Fig 1.9) (Wickner et al. 1999; Uptain and Lindquist 2002; Benkemoun and Saupé 2006). Le domaine *N*-terminal est responsable de la formation des fibres amyloïdes de cette protéine (Fig 1.9) et est particulièrement riche en résidus asparagine (Tuite and Cox 2003).

Figure 1.9 : Mode d'action des prions [*PSI*⁺] et [*URE3*]. (a) Structure de la protéine Sup35p. On distingue trois régions : la région N (vert), contenant le domaine prion, le domaine M (bleu) et le domaine fonctionnel en C-terminal (orange). (b) Chez les cellules [*psi*⁻], Sup35p est un facteur de terminaison de la traduction. Chez les cellules [*PSI*⁺], Sup35p est agrégé ce qui nuit à la terminaison de la traduction. Cette variation de fonction peut être mesurée à l'aide d'un allèle mutant d'un gène impliqué dans le métabolisme de l'adénine qui produit une coloration rouge (voir le texte pour plus de détails). (c) La structure de la protéine Ure2p est principalement constituée de deux domaines : un domaine prion en N-terminal (en vert, incluant une courte région au centre de la protéine) et un domaine fonctionnel (orange). (d) Chez les cellules [*ure-o*], Ure2p séquestre Gln3p, un activateur transcriptionnel. Chez les cellules [*URE3*], la protéine Ure2p est agrégée et ne peut plus lier Gln3p efficacement. Comme Gln3p active la transcription de certains gènes régulant l'apport de sources d'azotes, la présence du prion [*URE3*] peut être révélée par la capacité des cellules à pousser sur certains milieux (voir le texte pour plus de détails). USA est une abréviation d'uréidosuccinate, une source d'azote. Adapté de Wickner (1999).

a Sup35p

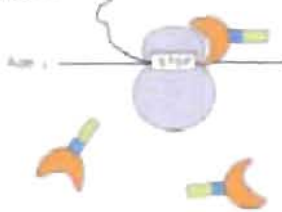


c Ure2p

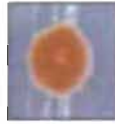


b [psi⁻]

Sup35p soluble



Croissance sur milieu faible en adénine



Croissance en milieu sans adénine

Non

d [ure^{-o}]

Ure2p soluble

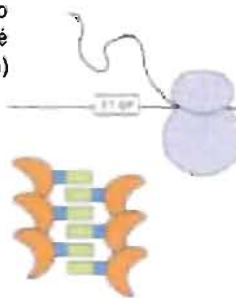


Croissance en milieu USA

Non

[PSI⁺]

Sup35p agrégé (prion)



Croissance sur milieu faible en adénine

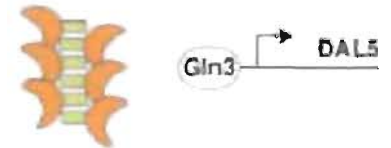


Croissance en milieu sans adénine

Oui

[URE3]

Ure2p agrégé (prion)



Croissance en milieu USA

Oui

1.7.1.2 [*PSI*⁺]

Le prion [*PSI*⁺] est propagé par des fibres amyloïdes formées de protéine Sup35p, un facteur de terminaison de traduction de type eRF3 (« eucaryotic release factor 3 »). La protéine Sup35 s'associe avec la protéine Sup45 (eRF1) ce qui lui permet de lier un ribosome positionné sur un codon de terminaison, favorisant la relâche du ribosome (Liebman and Derkatch 1999; Uptain and Lindquist 2002). Dans sa forme prionique, la protéine Sup35 est séquestrée, ce qui réduit l'efficacité de la terminaison de la traduction. Comme pour [*URE3*], la forme prionique de Sup35p entraîne une perte de fonction, bien qu'elle soit partielle. En effet, puisque la protéine Sup35 est essentielle à la survie des cellules (Inge-Vechtomov et al. 2003), l'état [*PSI*⁺] ne doit pas complètement inhiber la fonction de Sup35p puisque ces cellules survivent bien. La forme prionique de Sup35p produit des « read through » occasionnels, générant des protéines possédant des extensions C-terminales ou encore l'élimination de mutations non-sens (Fig 1.9) (Uptain and Lindquist 2002). Certaines études proposent que l'état [*PSI*⁺] pourrait ainsi avoir un avantage évolutif (True et al. 2004).

En utilisant des cellules possédant une mutation non-sens dans un gène marqueur donné, par exemple *ade1-14* qui produit l'accumulation d'un pigment rouge, il devient alors très facile de distinguer les colonies [*psi*⁻] des colonies possédant le prion [*PSI*⁺] (pour plus de détails, voir la figure 1.9) (Tuite and Cox 2006). Ce système de détection très simple a permis de faire des découvertes très importantes et a fait du prion [*PSI*⁺] le prion de levure le plus étudié. La protéine Sup35p présente trois domaines distincts (Fig 1.9). La partie C-terminale forme le domaine fonctionnel de Sup35p tandis que le domaine prion forme l'extrémité N-terminal de la protéine (Tuite and Cox 2003; Chernoff 2007). Entre le domaine prion (également nommé domaine N pour Sup35) et le domaine fonctionnel (domaine C) se trouve le domaine M qui est riche en résidus lysines qui joue un rôle dans la propagation du prion [*PSI*⁺] (voir section 1.7.2). Le domaine prion (PrD) de Sup35p est riche en résidus asparagines et glutamines (polyQ/N) et peut être subdivisé en deux régions.

La première portion est surtout impliquée dans la formation de fibres amyloïdes tandis que la seconde partie est importante pour le maintien de l'état $[PSI^+]$. Cette dernière est constituée de cinq pseudo-répétitions rappelant les répétitions présentes dans la queue N-terminale de PrP (voir tableau II). Le fragment de Sup35p minimal requis pour la propagation du prion $[PSI^+]$ contient au moins deux répétitions, ce qui montre bien que ces répétitions jouent un rôle important dans la propagation de $[PSI^+]$ (Tuite and Cox 2003; Osherovich et al. 2004; Tuite 2004; Chernoff 2007).

D'importantes découvertes sur les « souches » ou « variantes » de prion ont été réalisées avec le prion $[PSI^+]$. Les souches du prion $[PSI^+]$ expriment des phénotypes plus ou moins forts, ce qui peut être visualisé par l'intensité de la coloration des colonies. Le phénomène de souches de prion a également été observée chez le prion de mammifère PrP^{Sc} (Chien et al. 2004; Wadsworth and Collinge 2007). L'étude des « souches » de fibres amyloïdes de $[PSI^+]$ produites *in vitro de novo* et de leur effet *in vivo* a permis de valider le modèle selon lequel les différences phénotypiques observées chez les « souches » de prions sont le résultat de différences au niveau de la structure tridimensionnelle de leurs fibres amyloïdes (Diaz-Avalos et al. 2005; Tanaka et al. 2006). Une étude structurale du domaine protéique responsable de l'agrégation de Sup35p a récemment pu définir plusieurs variations structurelles observées dans des micro-cristaux, appuyant la notion que les fibres de Sup35p peuvent adopter plusieurs structures différentes (Sawaya et al. 2007). De même, l'étude des homologues de Sup35p provenant d'autres levures a également fait progresser nos connaissances sur les notions de « barrières des espèces » des prions (voir section 1.6.3) (Tessier and Lindquist 2007).

1.7.1.3 $[PIN^+]$

Le prion $[PIN^+]$ a d'abord été identifié comme un déterminant non-Mendélien permettant l'apparition du prion $[PSI^+]$ par la surexpression de Sup35p (Derkatch et al. 1997; Derkatch et al. 2000; Derkatch et al. 2001). Une étude parallèle dont le but était

d'identifier de nouveaux prions par la recherche de domaines polyQ/N permet d'identifier Rnq1p, une protéine dont le domaine polyQ/N (situé dans la partie C-terminale de la protéine) est en mesure de remplacer le PrD de Sup35 (Sondheimer and Lindquist 2000). On réalisa ensuite que la protéine Rnq1p est le facteur déterminant le prion [*PIN*⁺] (Derkatch et al. 2001). La fonction de la protéine Rnq1p demeure encore inconnue, mais la délétion du gène *RNQ1* montre que ce gène pourrait avoir un rôle dans la sporulation des cellules (Orlowska-Matuszewska and Wawrzycka 2006). La présence de [*PIN*⁺] ne semble pas toxique aux cellules et plusieurs souches sauvages de *S. cerevisiae* portent ce prion (Nakayashiki et al. 2005).

La découverte du prion [*PIN*⁺] a ouvert la voie à l'étude des interactions entre les différents prions de *S. cerevisiae*. De manière générale, la présence du prion [*PIN*⁺] favorise l'apparition du prion [*PSI*⁺] (Derkatch et al. 1997; Derkatch et al. 2000; Derkatch et al. 2001; Bradley et al. 2002; Bradley and Liebman 2003). L'étude de [*PIN*⁺] montre également que l'agrégation des protéines possédant un domaine polyQ/N (comme Sup35p et Rnq1p) est co-favorisée, bien que chaque protéine forme des fibres amyloïdes composées d'un seul type de protéine (Bagriantsev and Liebman 2004; Derkatch et al. 2004; Vitrenko et al. 2007). Ce phénomène nommé ensemencement croisé ou « cross-seeding » semble avoir une importance particulière dans certaines pathologies (voir section 1.5.3) (Osherovich and Weissman 2001).

1.7.1.4 [*Het-s*], le prion de *Podospora anserina*

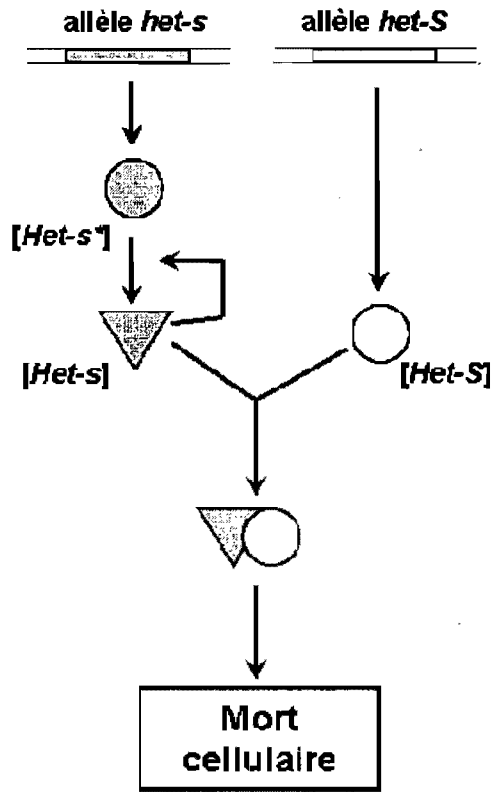
Découvert il y a plus de cinquante ans, ce n'est qu'il y a une dizaine d'année qu'on a compris que le phénomène d'histoincompatibilité lié au gène *het-s* était médiée par un prion (Fig 1.10) (Coustou et al. 1997). Brièvement, le phénomène d'histoincompatibilité se produit lorsque deux colonies de *Podospora anserina* se rencontrent. Ce champignon filamenteux forme des colonies dont les cellules partagent le même cytoplasme. Pour éviter que des virus ne se transmettent à l'ensemble de la colonie, *Podospora anserina* a

développé un système de reconnaissance du soi assurant que seules les cellules génétiquement compatibles sont en mesure de survivre à la fusion des cellules (Wickner et al. 1999).

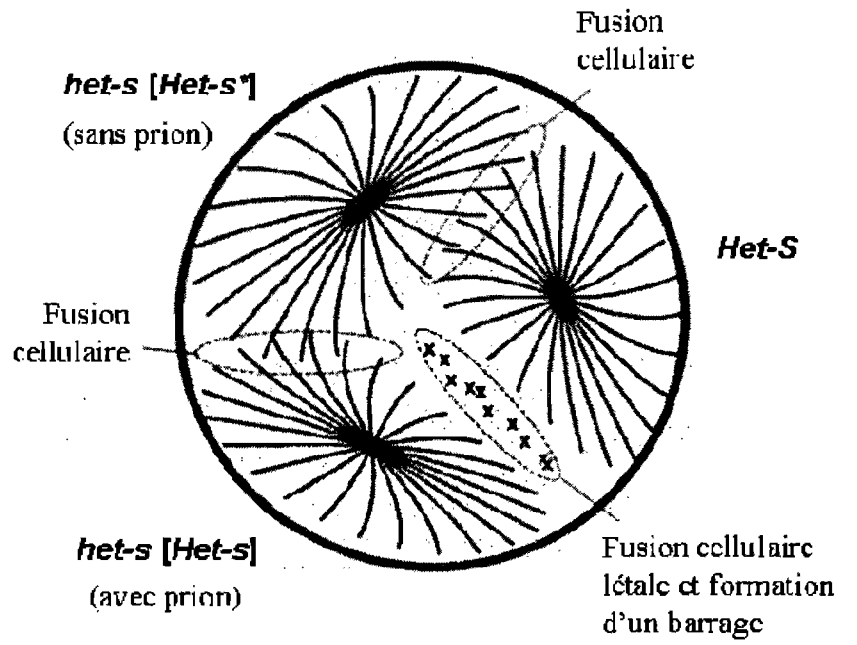
L'un de ces gènes est le gène *het-s*, qui possède deux allèles différents *het-s* et *het-S*. De plus, l'allèle *het-s* produit deux phénotypes distincts : le phénotype [*Het-s*], qui est prionique, et le phénotype [*Het-s**] qui ne l'est pas. Ainsi, si une cellule [*Het-s*] fusionne avec une cellule [*Het-S*], on observe la formation d'un « barrage » à la rencontre des deux colonies, résultat de l'apoptose des cellules possédant des allèles différentes ([*Het-s*] et [*Het-S*]). Par contre, la fusion d'une cellule [*Het-s**] avec une cellule [*Het-S*] ne produit aucun effet (voir la figure 1.10 pour plus de détails) (Coustou et al. 1997; Wickner et al. 1999; Benkemoun and Saupe 2006). Il a également été établi que la protéine HET-S (encodée par l'allèle *het-s*, voir le tableau II) peut former des fibres amyloïdes *in vitro* (Dos Reis et al. 2002; Ritter et al. 2005). Ces fibres amyloïdes ne semblent pas nuire à la survie des cellules *in vivo* et la toxicité est plutôt causée par l'association des protéines HET-s et HET-S lors de la rencontre entre 2 colonies. Pourtant, ces deux protéines ne diffèrent que par 13 résidus (Balguerie et al. 2003). Comme la protéine HET-S ne forme pas spontanément des fibres amyloïdes, il a été suggéré que l'association de HET-S avec les espèces amyloïdes de protéines HET-s forment des oligomères amyloïdes toxiques qui seraient à l'origine de la mort cellulaire observée (voir section 1.5.3) (Coustou-Linares et al. 2001; Balguerie et al. 2004). Le prion [*Het-s*] peut aussi être maintenu et propagé chez des cellules de *S. cerevisiae*, démontrant que ce dernier partage toute les caractéristiques des autres prions retrouvés chez cette levure (Taneja et al. 2007).

Figure 1.10 : Mode d'action du prion [*Het-s*]. (a) Schéma illustrant le mode d'action de la mort induite par les allèles *het-s* et *het-S*. La protéine produite par *het-s* peut adopter deux formes distinctes : une forme soluble (représentée par un cercle) retrouvée chez les colonies [*Het-s**] et une forme prionique (représentée par un triangle) retrouvée chez les colonies [*Het-s*]. Seule la forme prionique de la protéine induit la mort cellulaire si elle est associée avec la protéine produite par l'allèle *het-S*. Adaptée de Coustou (1997). (b) Illustration d'un essai de barrage effectué pour déterminer le phénotype d'une colonie. Seule la rencontre d'une colonie [*Het-s*] avec une colonie [*Het-S*] produit un barrage, résultat de l'induction de la mort cellulaire des cellules. Adapté de Wickner (1999).

a



b



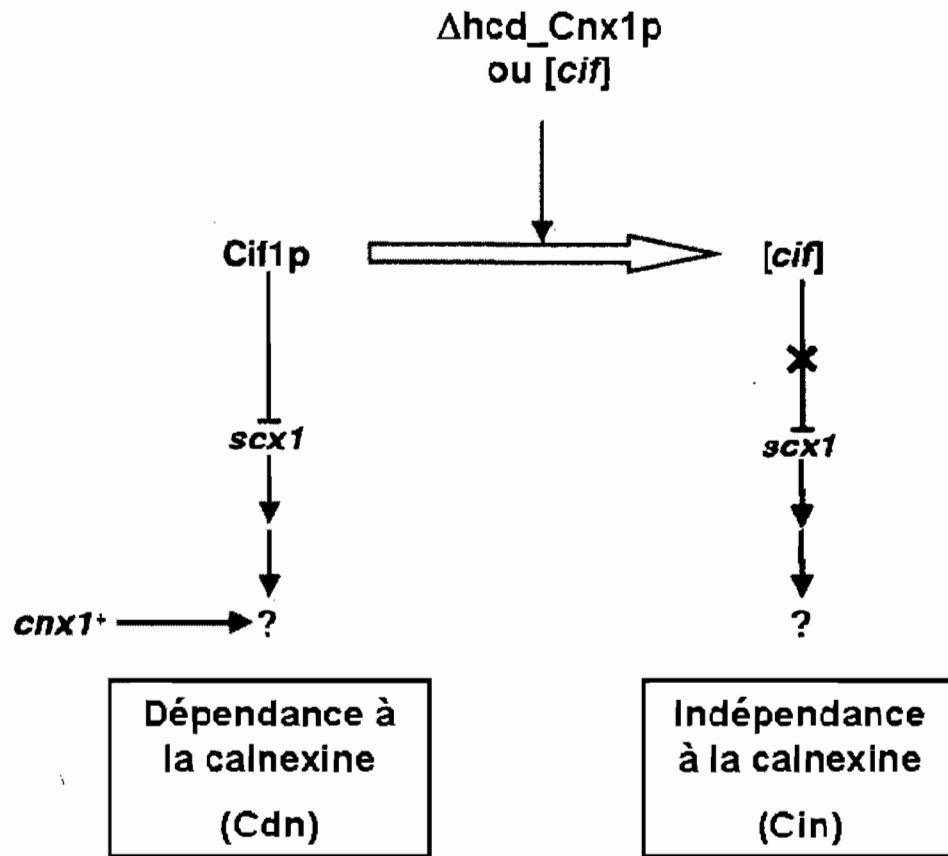
1.7.2 [*cif*], un nouvel élément prionique chez *S. pombe*

Notre laboratoire s'intéresse à la calnexine, une chaperone du réticulum endoplasmique essentielle chez la levure *S. pombe* (voir section 1.3.2). Pour tenter d'identifier la cause de l'essentialité de la calnexine, différents mutants de délétions furent construits et étudiés. L'un de ces mutants a produit un phénomène totalement inattendu. En effet, la transformation de ce mutant produit un changement chez les cellules qui sont alors capables de survivre en absence de toute forme (sauvage ou mutante) de calnexine. Cet état a été nommé Cin, pour calnexine indépendante, par opposition aux cellules qui sont normalement calnexine dépendante (Cdn), c'est-à-dire qu'elles ne peuvent pas survivre en absence de calnexine (Collin et al. 2004). L'état Cin est stable, puisque la re-transformation d'un plasmide encodant la calnexine ne permet pas de renverser le phénomène, c'est-à-dire que les cellules peuvent à nouveau perdre le plasmide si on ne sélectionne pas à l'aide de marqueur de sélection. La caractérisation des cellules Cin a révélé que cet état est encodé par un élément qui possède des caractéristiques génétiques similaires aux prions de levure : l'état Cin est dominant dans les cellules diploïdes, même en présence de la calnexine génomique, et il est transmis de manière non-Mendélienne aux spores. De plus, la transformation d'extraits cellulaires de cellules Cin dépourvu d'acides nucléiques permet de transmettre le phénomène à une cellule Cdn, ce qui suggère que le phénomène Cin est médié par un ou plusieurs élément(s) protéique(s) (Collin et al. 2004).

Le facteur protéique hypothétique aux caractéristiques prioniques responsable de l'état Cin a été nommé [*cif*] (« calnexin independence factor ») (Collin et al. 2004). Comme la forme prionique des protéines est habituellement accompagnée d'une perte de fonction de la protéine impliquée (Cif1p, une protéine hypothétique dans ce modèle), le modèle proposé suppose également la présence d'un ou de plusieurs gènes regroupés sous le terme *scx1*, pour suppresseur de la calnexine, qui est en mesure de remplacer la fonction essentielle de la calnexine (voir la figure 1.12 pour plus de détails). La caractérisation des cellules Cin a montré que les cellules ne présentent pas de stress évident au niveau du RE.

Comme la calnexine est une chaperone luminale essentielle chez les cellules Cdn, ce résultat supporte un modèle dans lequel les cellules Cin possèdent un contrôle de qualité du RE renforcé (*scx1*) (Turcotte et al. 2007). Puisqu'aucun prion n'a jusqu'ici été identifié chez la levure *S. pombe* et que le système de contrôle de qualité du RE de cette levure est similaire à celui des mammifères, la caractérisation des protéines impliquées dans la régulation de l'état Cin est donc d'un intérêt certain.

Figure 1.11 : Modèle d'étude permettant d'expliquer la survie des cellules Cin en absence de la calnexine. Le modèle comprend deux éléments principaux : *cif* (« calnexin independence factor ») et *scx1* (« suppressor of calnexin »). *cif* produit une protéine Cif1p qui est un répresseur de *scx1*. Dans cet état, la survie de la cellule est assurée par la calnexine. Les cellules sont donc calnexine-dépendante (Cdn). Dans certaines conditions, Cif1p peut adopter une conformation prionique nommée [*cif*], ce qui modifie la fonction de la protéine qui ne peut alors plus réprimer le gène *scx1*. Ce dernier est alors exprimé et peut jouer un rôle recoupant le rôle essentiel de la calnexine (indiqué par « ? » puisque inconnu). Les cellules sont alors capables de survivre en absence de calnexine et sont donc calnexine indépendantes (Cin). Notre hypothèse est que le mutant Δhcd_Cnx1p adopte une conformation favorisant l'induction du phénomène Cin par une voie qui reste à être identifiée.



1.8 Le bien-fondé du projet de recherche

1.8.1 Le bien-fondé des études sur les prions de levures

La levure est un microorganisme simple, facile et peu coûteux à utiliser. Tel que vu plus haut, les prions de levure possèdent des caractéristiques similaires aux protéines responsables de plusieurs maladies neurodégénératives, notamment les maladies à prions et les amyloïdies à polyQ/N. Par des criblages à grande échelle effectués chez *S. cerevisiae* avec une petite banque de molécules organiques, il a été possible d'identifier des composés efficaces contre la propagation des prions de mammifères et des dommages causés par les protéines polyQ/N. Certains de ces composés sont également efficaces pour contrer la propagation des prions [*PSI⁺*] et [*URE3*]. Il semble donc que les mécanismes fondamentaux régissant le maintien et la propagation des fibres amyloïdes aient des éléments communs qui peuvent être exploités dans un but pharmacologique et médical (Bach et al. 2003; Outeiro and Giorgini 2006; Tribouillard et al. 2006).

L'autre grande utilité de l'étude des prions de levure est plus fondamentale et concerne notre compréhension des mécanismes de régulation utilisés par les cellules pour moduler l'activité de certaines protéines. Par exemple chez l'aplysie, un escargot marin, la protéine CPEB régule la traduction des ARNm et joue un rôle important dans la consolidation de la mémoire à long terme. Or, CPEB possède un domaine polyQ/N qui a toutes les caractéristiques attendues d'un domaine prion et peut agir comme tel lorsque exprimé chez *S. cerevisiae* (Si et al. 2003a; Si et al. 2003b). Qui plus est, l'activité de CPEB est augmentée lorsqu'elle est dans une forme agrégée, ce qui suggère que le changement conformationnel de CPEB vers un conformère prionique pourrait jouer un rôle dans la mémoire (Si et al. 2003b). Des résultats préliminaires suggèrent que les homologues murins de CPEB possèdent des caractéristiques similaires (Ter-Avanesyan et al. 2005). Un autre exemple a été découvert chez des cellules humaines. La protéine TIA-1 est un répresseur traductionnel qui lie les ARNm et joue un rôle dans la formation des

granules de stress, des inclusions cytoplasmiques dans lesquelles les complexes d'initiation de la traduction bloqués par des stress environnementaux sont recrutés (Gilks et al. 2004). La protéine TIA-1 possède également un domaine polyQ/N de type prionique qui est nécessaire à la formation des granules de stress. Aussi, ce domaine peut être fonctionnellement remplacé par le domaine prion de Sup35p (Gilks et al. 2004). De plus, une autre protéine des granules de stress, Pum-2, nécessite un domaine polyQ/N pour être fonctionnelle (Vessey et al. 2006). La modulation de l'activité protéique par la formation d'agrégats de type prionique semble donc jouer différents rôles régulateurs chez plusieurs espèces eucaryotes.

1.8.2 Le rôle de Hsp104 dans la propagation des prions de *S. cerevisiae*

La recherche d'agents chimiques influençant la propagation du prion [*PSI*⁺] permet de découvrir qu'une faible concentration de chlorure de guanidinium (GuHCl) élimine ce prion en quelques générations. Le GuHCl agit en fait comme un inhibiteur de l'activité ATPase de Hsp104 (Eaglestone et al. 2000; Ferreira et al. 2001; Jung et al. 2002; Ness et al. 2002; Grimminger et al. 2004). L'utilisation du GuHCl a permis de mieux définir le rôle de Hsp104 dans la fragmentation des fibres de prions de levure et a mis en lumière l'importance des oligomères solubles dans la propagation des prions de levures (Ness et al. 2002; Cox et al. 2003; Kryndushkin et al. 2003; Narayanan et al. 2003; Ripaud et al. 2003). Plusieurs études ont ensuite établies que les prions de levure nécessitent la désagrégase Hsp104 (voir section 1.4) pour être maintenu à l'intérieur d'une population de cellules (Fig 1.11) (Chernoff et al. 1995; Moriyama et al. 2000; Sondheimer and Lindquist 2000; Taneja et al. 2007). En effet, l'analyse biochimique des protéines Sup35 a montré que cette protéine prionique forme des agrégats insolubles de haut poids moléculaire dans les cellules [*PSI*⁺] et que la taille de ces agrégats augmente au fur et à mesure que l'expression de Hsp104 diminue (Wegrzyn et al. 2001; Kryndushkin et al. 2003). En absence de Hsp104, la taille des fibres prionique devient si importante que les prions ne peuvent plus se propager d'une cellule à l'autre lors des divisions cellulaires (Fig 1.11) (Jones and Tuite

2005; True 2006; Satpute-Krishnan et al. 2007). De même, on a isolé une variante de $[PSI^+]$ qui accumule des agrégats de tailles si importantes, qu'elle n'est en mesure de se propager que dans une souche exprimant anormalement élevé de Hsp104 (Borchsenius et al. 2006).

Aussi, la surexpression de Hsp104 permet d'éliminer complètement le prion $[PSI^+]$ (Chernoff et al. 1995), mais pas $[PIN^+]$, $[URE3]$ ou $[Het-s]$ lorsqu'il est propagé chez *S. cerevisiae* (Moriyama et al. 2000; Sondheimer and Lindquist 2000; Taneja et al. 2007). L'élimination du prion $[PSI^+]$ est causée par la désagrégation complète des fibres amyloïdes tel que démontré par l'étude *in vitro* de protéines purifiées (Fig 1.11). Il est par contre impossible de dissoudre complètement les fibres amyloïdes du prion $[URE3]$ de manière à éliminer leur infectivité (Shorter and Lindquist 2006). La raison de cette différence est encore inconnue et aucune étude n'a été faite *in vitro* sur $[PIN^+]$ et $[Het-s]$. L'étude des protéines purifiées a montré que l'interaction entre Hsp104 et ses substrats est faible et transitoire, mais aussi que l'activité de Hsp104 pouvait, dans certaines conditions non-physiologiques, favoriser la formation de fibres amyloïdes (Shorter and Lindquist 2004; 2006; Doyle et al. 2007b). L'importance de cette activité favorisant la formation de fibres amyloïdes n'a par contre pas été démontrée *in vivo*.

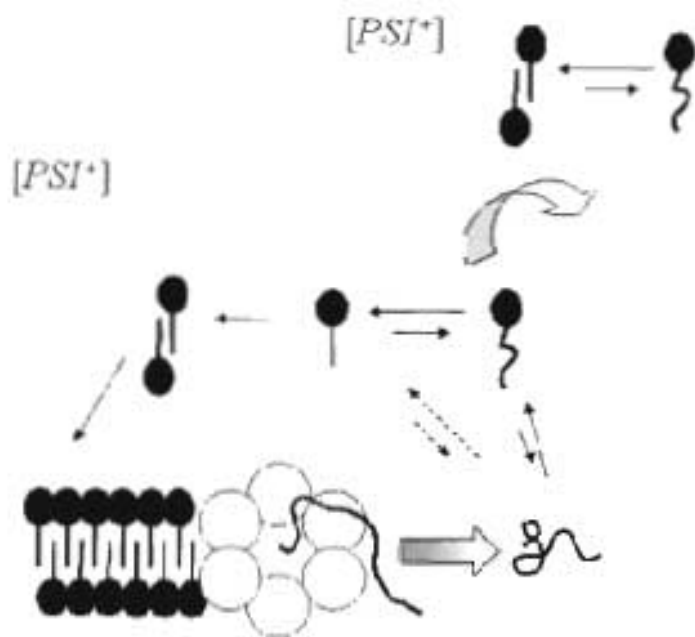
La construction de différents mutants du prion $[PSI^+]$ a contribué à notre compréhension des liens unissant Hsp104 et la propagation de ce prion. Le domaine N de Sup35p (Fig 1.9) est particulièrement important pour la formation des fibres amyloïdes responsables du prion $[PSI^+]$ (section 1.7). Il n'est donc pas surprenant de constater que des mutations touchant ce domaine affectent également la propagation de $[PSI^+]$. Par exemple, la protéine Sup35 chimérique construite avec le domaine N de la levure *Pichia methanolica* est éliminé par la délétion de *HSP104* mais ne peut pas être éliminer par la surexpression de ce gène (Kushnirov et al. 2000). Aussi, le prion artificiel nommé $[PHI^+]$, dont les pseudo-répétitions (similaires à celle de PrP, voir 1.7.1.2 et figure 1.9) du domaine N ont été remplacées par celles de d'autres levures, se propage de manière Hsp104-

indépendante, c'est-à-dire que sa propagation n'est pas affectée par une délétion de *HSP104*. Cette variante de $[PSI^+]$ forme des fibres moins longues qui ne nécessiteraient pas d'activité désagrégase pour être propagées d'une cellule-mère à une cellule-fille (Crist et al. 2003). On peut également générer un prion artificiel en remplaçant l'ensemble du domaine prion de Sup35p (la région polyQ/N et les pseudo-répétitions, section 1.7) par les répétitions du prion PrP (Tank et al. 2007). La région M de Sup35p (Fig 1.9) semble jouer un rôle dans la propagation du prion $[PSI^+]$ par Hsp104. En effet, si on remplace cette région flexible riche en lysines (des résidus reconnus par Hsp104, voir section 1.4.4) par d'autres séquences semblables provenant d'autres protéines, il est possible de créer une variante artificielle de $[PSI^+]$ qui n'est affectée ni par la délétion ni par la surexpression de *HSP104* (Liu et al. 2002). La propagation de $[PSI^+]$ par Hsp104 est donc influencée par la séquence et la structure de la protéine Sup35. Par contre, les autres prions de levures ne présentent pas les mêmes caractéristiques structurales. $[Het-s]$ par exemple ne présente ni région polyQ/N, ni pseudo-répétitions, ni domaine riche en lysines et dépend tout de même de Hsp104 pour sa propagation chez *S. cerevisiae* (Taneja et al. 2007). Aussi, PrP^{Sc} se propage en absence de tout homologue connu de Hsp104 (Wickner et al. 1999; Tuite 2004).

Tel que décrit dans la section 1.4, Hsp104 agit en conjonction avec d'autres chaperones et co-chaperones. Or, la propagation des différents prions de *S. cerevisiae* est modulée par ces chaperones de manière spécifique à chaque prion (Jones and Tuite 2005; Trué 2006). La délétion des gènes encodant pour des facteurs d'échange de nucléotides bloque la propagation de $[URE3]$ et de $[PSI^+]$ (Kryndushkin and Wickner 2007). Le prion $[URE3]$ est aussi très sensible au niveau d'expression des différentes Hsp70 et Hsp40 (Moriyama et al. 2000; Schwimmer and Masison 2002; Roberts et al. 2004), tandis que le prion $[PIN^+]$ est éliminé par la surexpression et la délétion d'une Hsp40 (Sondheimer et al. 2001; Aron et al. 2007). On peut donc constater que les chaperones et co-chaperones cytosoliques jouent aussi un rôle important dans la propagation des prions de levures, mais que d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre les interactions entre ces facteurs cellulaires et les différents prions de levures.

Figure 1.12 : Rôle de Hsp104 dans la propagation de $[PSI^+]$. (a) Chez une cellule $[PSI^+]$, les protéines Sup35p produites sont majoritairement retrouvées sous leur conformation prionique et forment des fibres amyloïdes. Hsp104 lie ces fibres amyloïdes et les désagrège en linéarisant les protéines une à une, ce qui favorise leur retour à une conformation native. Il se forme ainsi un équilibre entre les différentes formes de la protéine Sup35p et les fibres de Sup35p sont maintenues à une taille suffisamment petite pour être transmises aux cellules filles. (b) En absence de Hsp104, les fibres de Sup35p deviennent rapidement très longue et ne pourront plus être transmises aux cellules-filles. (c) La surexpression de Hsp104 permet de solubiliser les fibres de Sup35p. Le prion $[PSI^+]$ est alors perdu et ne pourra plus être transmis aux cellules filles.

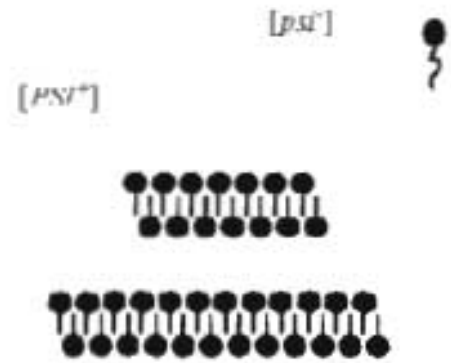
a



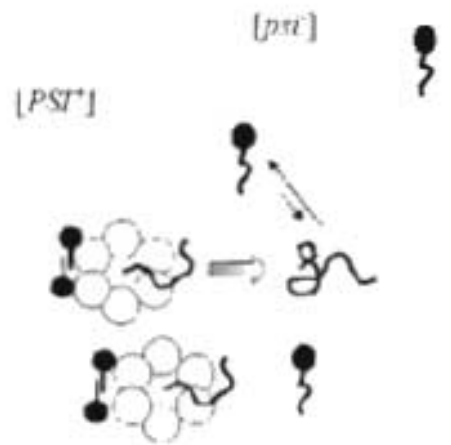
Légende



b



c



1.8.3 Étude de Hsp104 de la levure *S. pombe* et de son rôle dans la propagation des prions de levure

Tel que mentionné à la section 1.4, la plupart des levures possèdent une protéine de la classe des ClpB/Hsp100, mais bien peu ont été caractérisées. Outre la protéine Hsp104 de la levure *S. cerevisiae*, seul l'homologue chez *Candida albicans* a fait l'objet d'une étude de caractérisation (Zenthon et al. 2006). La caractérisation d'une autre protéine membre de cette famille apporterait de nouvelles données utiles à notre compréhension du mécanisme de ces désagrégases et de leurs rôles dans la propagation des prions de levure. Une recherche informatique a permis d'identifier un seul gène encodant un homologue de Hsp104 chez *S. pombe*, gène qui n'avait jusqu'ici jamais été étudié. En respect avec la nomenclature de la génétique de *S. pombe*, j'ai nommé ce gène *hsp104⁺*. Par contre, pour éviter toute confusion avec le gène de *S. cerevisiae* *HSP104*, je nommerai ici ce gène *Sp_hsp104⁺* et la protéine qu'il encode *Sp_Hsp104*.

Le but de mon projet était de caractériser ce nouveau gène et d'évaluer l'impact de cette protéine sur la propagation de l'état Cin chez *S. pombe* et des prions [*PSI⁺*] et [*PIN⁺*] chez *S. cerevisiae*. L'étude de l'impact de *Sp_Hsp104* sur la propagation des prions de levures fournira de nouvelles données mécanistiques sur la transmission des éléments [*PSI⁺*] et [*PIN⁺*]. Finalement, comme notre modèle de l'état Cin prédit qu'il est médié par un nouveau prion chez la levure *S. pombe* et que tous les prions de levure caractérisés (dans leur forme sauvage) se propagent grâce à l'action de Hsp104 chez *S. cerevisiae*, l'étude de la désagrégase correspondante chez *S. pombe* nous apportera des informations supplémentaires sur le maintien et le mode de transmission de l'état Cin.

2. Article

The disaggregase function of Hsp104 is not sufficient for the propagation of the yeast prions [*PSI*⁺] and [*PIN*⁺]

Patrick Sénéchal, Geneviève Arseneault and Luis A. Rokeach[§]

From the Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

[§]To whom correspondence should be addressed: Department of Biochemistry, Université de Montréal, C.P. 6128 succursale Centre-ville, Montréal, QC, Canada H3C 3J7. Tel.:

[information retirée /
information withdrawn]

fax:

[information retirée /
information withdrawn]

e-mail:

[information retirée / information withdrawn]

Running title: *S. pombe* Hsp104 cannot propagate *S. cerevisiae* prions.

Keywords: Hsp104, yeast prions, molecular chaperone, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*.

Contributions : Patrick Sénéchal a effectué la majorité des expériences et Geneviève Arseneault a participé à plusieurs expériences de clonage.

Summary

When submitted to stressful conditions, heat shock for example, proteins misfold and aggregate. The molecular chaperone Hsp104 (Sc_Hsp104) is a crucial factor for the acquisition of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by mediating the reactivation of these aggregated proteins. Sc_Hsp104 is also involved in the propagation of yeast prions in *S. cerevisiae*. For instance, the well-characterized [*PSI*⁺] prion of *S. cerevisiae* cannot be propagated in Δ *hsp104* cells or in cells overexpressing Sc_Hsp104. In this study, we identified and characterized a *Schizosaccharomyces pombe* protein (Sp_Hsp104) showing a high level of amino acid identity with Sc_Hsp104. Our results showed that Sp_Hsp104 is a heat-inducible functional disaggregase and a major factor responsible for the acquisition of thermotolerance in fission yeast. Heterologous expression of Sp_Hsp104 in *S. cerevisiae* confirmed that this protein is a functional orthologue of Sc_Hsp104. Unlike Sc_Hsp104, Sp_Hsp104 did not support the propagation of the prions [*PSI*⁺] and [*PIN*⁺] in *S. cerevisiae* and the overexpression of Sp_Hsp104 did not cure [*PSI*⁺]. Remarkably, a chimeric Sp_Hsp104 bearing the C-terminal part of Sc_Hsp104 was able to cure the [*PSI*⁺] prion, suggesting that this divergent region plays an important role in the propagation of prions in *S. cerevisiae*.

Introduction

Yeasts have the aptitude to adapt and survive to a broad spectrum of stress conditions. Normally, the exposition to a mild stress triggers an adaptative response that modifies genes expression, thus enhancing the cells capacity to survive to a subsequent harsher stress (Lindquist 1986). In the case of a heat-shock stress, this adaptative response is called thermotolerance. Hsp104 is an AAA+ protein (ATPase associated with various activities) involved in the acquisition of thermotolerance in budding yeast (Sanchez and Lindquist 1990). As many AAA+ proteins, *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104 (Sc_Hsp104) proteins oligomerize in barrel-shaped hexamers in its functional state (Parsell et al. 1994a). Unlike classical molecular chaperones that assist protein folding and prevent their aggregation, Sc_Hsp104 is a disaggregase able to dissolve already formed protein aggregates (Parsell et al. 1994b). Sc_Hsp104 possesses two ATPase domains that are both implicated in the mechanism of protein disaggregation. The first nucleotide-binding domain (NBD1) regulates the disaggregating activity of Sc_Hsp104, while NBD2 is implicated in both processing of protein aggregates and Sc_Hsp104 oligomerization (Lum et al. 2004; Tkach and Glover 2004; Bosl et al. 2005; Schaupp et al. 2007). Importantly, the activity of the two NBDs are modulated by the middle (or M) domain of Hsp104 (Cashikar et al. 2002). Based upon the structure of the bacterial Hsp100 homologue ClpB (Lee et al. 2003), it is believed that the two ATPase domains form the core of the Sc_Hsp104 barrel, while the *N* and *C*-terminal domains (NTD and CTD) protrude from each side of the core of the hexamer (Bosl et al. 2006).

In vitro experiments showed that Sc_Hsp104 can bind and untangle aggregated proteins and release them in an unfolded state, which allows the proteins to subsequently

adopt their native state (Doyle et al. 2007b; Schaupp et al. 2007). These observations are consistent with data obtained for ClpB from *Escherichia coli* and from *Thermus thermophilus*, the bacterial homologues of Sc_Hsp104, suggesting that the mechanisms of protein disaggregation are well conserved across the ClpB/Hsp100 family (Bosl et al. 2006; Zolkiewski 2006). Although *in vitro* Sc_Hsp104 and ClpB are able to untangle protein aggregates by themselves, their collaboration with the Hsp40 and Hsp70 molecular chaperones greatly enhances their disaggregating activity (Glover and Lindquist 1998; Goloubinoff et al. 1999).

Sc_Hsp104 is also essential for the propagation of several *S. cerevisiae* prions. Prions are proteins that can adopt an alternative conformation that allow them to self-replicate by propagating this alternative conformation to other identical proteins. The best characterized fungal prions are [*PSI*⁺], [*URE3*] and [*PIN*⁺] from *S. cerevisiae*, and [*Het-s*] of the fungus *Podospora anserina*. In *S. cerevisiae*, these prions form amyloid fibers, and cannot be propagated in cells devoid of Hsp104 (Chernoff et al. 1995; Moriyama et al. 2000; Sondheimer and Lindquist 2000; Taneja et al. 2007).

The most studied yeast prion, [*PSI*⁺], results from the amyloidogenic conformational switch of the Sup35 protein, a factor involved in the fidelity of translation termination (Chien et al. 2004). The study of [*PSI*⁺] propagation show that prion fibers need to be shortened or cleaved by Sc_Hsp104 in order to be correctly transmitted to the mitotic progeny during cell division (Jones and Tuite 2005; Byrne et al. 2007). Also, *in vivo* experiments showed that a reduction of the quantity of Sc_Hsp104 results in an increase of the length of the [*PSI*⁺] fibrils and in a reduction of their capacity to be transmitted to the mitotic progeny (Kryndushkin et al. 2003; Satpute-Krishnan et al.

2007). On the other hand, overexpression of Sc_Hsp104 can eliminate or “cure” the $[PSI^+]$ prion (Chernoff et al. 1995), and *in vitro* experiments showed that Sc_Hsp104 is able to completely disassemble Sup35p amyloid fibers (Shorter and Lindquist 2006). The Hsp104 orthologue of the yeast *Candida albicans* (Ca_Hsp104) is also able to propagate $[PSI^+]$ in *S. cerevisiae*, suggesting that this ability might be conserved in other yeast species (Zenthon et al. 2006). However, the molecular details of the action of Sc_Hsp104 on yeast prions remain ill defined.

Whereas protein folding has been extensively studied in the budding yeast, much less is known about the function of molecular chaperones of *Schizosaccharomyces pombe*. Some studies reported that the fission yeast can acquire thermotolerance (De Virgilio et al. 1990; Ribeiro et al. 1997), but the existence of an Hsp104 *S. pombe* orthologue has not been confirmed. In the present study, we characterized the functional homologue of Hsp104 in *S. pombe*. This *S. pombe* Hsp104 orthologue (Sp_Hsp104) shows a high level of identity with the *S. cerevisiae* Hsp104 (Sc_Hsp104). Thermotolerance assays performed with an *S. pombe* $\Delta hsp104$ strain revealed that, like its *S. cerevisiae* counterpart, Sp_Hsp104 is required for survival after heat shock. Heterologous expression in *S. cerevisiae* $\Delta hsp104$ cells showed that Sp_Hsp104 is a functional disaggregase that can reactivate heat-aggregated luciferase. However, unlike Sc_Hsp104, Sp_Hsp104 did not propagate the $[PSI^+]$ or the $[PIN^+]$ prion when expressed in *S. cerevisiae* cells. Likewise, the overexpression of Sp_Hsp104 was unable to impair $[PSI^+]$ propagation. Moreover, the overexpression of a chimeric Hsp104, in which the C-terminal domain of Sc_Hsp104 was replaced with the corresponding domain of Sp_Hsp104, gained the ability to cure the $[PSI^+]$ prion. Our study showed that while the

ability to untangle aggregated proteins is conserved between these two Hsp104 orthologues, the ability to assist prion propagation seems to depend, at least in part, upon the primary structure of the least conserved C-terminal domain.

Results

S. pombe encodes a single Hsp104 orthologue.

In order to identify a putative *S. pombe* homologue of the *S. cerevisiae*'s Hsp104 protein, we performed a protein-protein BLAST research (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) of the *S. pombe* proteome with the *S. cerevisiae* Hsp104 amino acid sequence. One *S. pombe* predicted protein, encoded by the gene systematically named SPBC16D10.08c (Wood et al. 2002), shared 52 % identity and 83 % similarity of amino acids with the *S. cerevisiae* Hsp104 protein (Fig 1A). While this *S. pombe* protein was not characterized before, genome-wide expression analyses demonstrated that its gene is expressed and its protein is translated (Chen et al. 2003; Matsuyama et al. 2006). Thus, we named the gene SPBC16D10.08c *hsp104*⁺ following the *S. pombe* terminology. However, to avoid any confusion with the *S. cerevisiae* gene *HSP104* (*Sc_HSP104*) encoding the Hsp104 protein (here called Sc_Hsp104), we have designated this gene as *Sp_hsp104*⁺ and the corresponding protein Sp_Hsp104 in this article.

Like all members of the ClpB/Hsp100 family, Sp_Hsp104 sequence contains two putative nucleotide-binding domains (NBD1 and NBD2) that are well conserved between the *S. pombe* and the *S. cerevisiae* orthologues (63 % and 60 % amino acid identity respectively, Fig 1A). All the critical residues required for the ATPase activity of those

domains are perfectly conserved between these two proteins (Zenthon et al. 2006). The M domain, which is important for the disaggregase activity, shows 47 % amino acid identity with that of Sc_Hsp104 (Fig 1A). This sequence analysis shows that Sp_Hsp104 has the characteristics of the ClpB/Hsp100 proteins, suggesting that it can be a functional disaggregase.

Sp_hsp104⁺ is required for the acquisition of thermotolerance in the fission yeast.

As mentioned previously, Hsp104 is a major factor involved in the acquisition of thermotolerance in budding yeast (Sanchez and Lindquist 1990). Interestingly, it was previously shown in a *S. pombe* genome-wide DNA microarray study that the transcription of the SPBC16D10.08c gene (*Sp_hsp104⁺*) is greatly induced (54 fold) by a mild heat shock of 15 minutes at 39°C (Chen et al. 2003). This demonstrates that the expression of *Sp_hsp104⁺* is enhanced by an environmental stress, like it was shown for *S. cerevisiae*'s *HSP104* (Grably et al. 2002; Seppa et al. 2004).

To verify if the level of Sp_Hsp104 protein was also affected in heat shock condition, we carried out immunoblot analyses with polyclonal antibodies raised against full-length Sc_Hsp104 protein (Tkach and Glover 2004). These antibodies detected a protein of about 100 kDa in cell extracts from a *S. pombe* wild-type strain (SP3220) and no protein were detected in extracts prepared from a Δ *Sp_hsp104* strain (SP12422), thus confirming the specificity of our immunodetection (Fig 2A). Western blot analysis revealed that the amount of Sp_Hsp104 protein detected increased several fold after 1 hour at 37°C with respect to cell extracts from unstressed cells (Fig 2A). Thus, like its *S. cerevisiae* counterpart, Sp_Hsp104 expression is heat-inducible.

Next we investigated whether Sp_Hsp104 confers thermotolerance in the fission yeast. As shown in Figure 2B, ΔSp_hsp104 cells did not show any significant growth defect when cultured at 30°C. As expected, most wild-type cells and ΔSp_hsp104 cells did not survive a severe heat shock of 20 minutes at 50°C. However, when wild-type cells were pre-treated at 37°C for 1 hour before being submitted to a severe heat shock, they acquired thermotolerance and survived (Fig 2B). In contrast, the pre-treatment at 37°C could not rescue the death of ΔSp_hsp104 cells following a severe heat shock at 50°C. Neither wild-type nor ΔSp_hsp104 cells showed growth defects at 37°C (data not shown). This experiment shows that Sp_Hsp104 is required for thermotolerance in *S. pombe*.

Sp_hsp104⁺ functionally complements Sc_HSP104 thermotolerance in the budding yeast.

To investigate if Sp_Hsp104 displays the same function in thermotolerance than Sc_Hsp104, the *Sp_hsp104⁺* gene was cloned into a galactose inducible *S. cerevisiae* expression vector that was subsequently transformed into $\Delta hsp104$ *S. cerevisiae* cells. ΔSc_hsp104 cells bearing an inducible *Sc_HSP104* plasmid or an empty vector were used as controls. As expected, the polyclonal antibody directed against the full length Sc_Hsp104 protein detected Sp_Hsp104 (Fig 3A), thus confirming that Sp_Hsp104 is expressed in budding yeast grown in galactose media. Sc_Hsp104 was detected using a monoclonal antibody (17B) that recognizes the M domain (Cashikar et al. 2002). This antibody does not detect Sp_Hsp104 protein even at very high concentration and is thus very specific to the *S. cerevisiae* Hsp104 protein (Fig 3B and data not shown).

To evaluate the capacity of Sp_Hsp104 to confer thermotolerance in *S. cerevisiae*, we performed serial dilution experiments. As expected, most ΔSc_hsp104 *S. cerevisiae* cells bearing an empty vector died after a severe heat shock at 50°C. In contrast, the cells having a plasmid overexpressing *Sc_HSP104* presented a significantly better survival (Fig 3C). Likewise, most ΔSc_hsp104 cells overexpressing *Sp_hsp104*⁺ survived the severe heat shock. This result shows that *Sp_hsp104*⁺ can complement thermotolerance in ΔSc_hsp104 *S. cerevisiae* cells as efficiently as *Sc_HSP104*.

To assess whether the thermotolerance conferred by *Sp_hsp104*⁺ expression was the result of a disaggregating activity, we performed luciferase reactivation assays (Parsell et al. 1994b). As shown in Figure 3D, both Sp_Hsp104 and Sc_Hsp104 reactivated heat-aggregated luciferase in *S. cerevisiae* cells. These results indicate that *Sp_hsp104* is a functional disaggregase complementing the *Sc_HSP104* deletion in the budding yeast.

Sp_Hsp104 cannot sustain the propagation of the yeast prions.

Another well known function of Sc_Hsp104 is its capacity to propagate fungal prions in *S. cerevisiae* (True 2006). Therefore, we investigated whether Sp_Hsp104 is able to sustain the propagation of yeast prions in *S. cerevisiae* cells. To this end, *Sp_hsp104*⁺ was cloned in a centromeric plasmid under the native promoter of *Sc_HSP104*. This construction was then transformed into a [*PSI*⁺][*PIN*⁺] ΔSc_hsp104 strain bearing a centromeric *Sc_HSP104* plasmid (Zenthon et al. 2006). Since both the [*PSI*⁺] and the [*PIN*⁺] prions cannot be maintained in the absence of Sc_Hsp104, we carried out a plasmid shuffling experiment to eliminate the *Sc_HSP104*-encoded plasmid,

which will allow us to evaluate the capacity of Sp_Hsp104 to maintain yeast prions. The presence of the $[PSI^+]$ prion was monitored using strains with *ade1-14* or *ade2-1* mutation streaked on selective media, as reported elsewhere (Chernoff et al. 1995). The shuffling was confirmed by streaking on selective media and by Western blotting (data not shown). All the cells bearing the *Sp_hsp104*⁺ plasmid or an empty plasmid exhibit the $[psi^-]$ phenotype (Fig 4A). Of note, the transformation of the *Sp_hsp104*⁺ plasmid or of an empty vector did not affect by themselves the propagation of $[PSI^+]$ in YJW532 (data not shown). This experiment demonstrates that *Sp_hsp104*⁺ is not able to propagate the $[PSI^+]$ prion.

To test if Sp_Hsp104 was able to sustain the propagation of the $[PIN^+]$ prion, the ΔSc_hsp104 strains were transformed with another centromeric vector expressing the *RNQ1-GFP* fusion gene under the *CUP1* promoter and induced for 24 hours. The cells were then observed by fluorescence microscopy. As expected, the cells bearing the *Sc_HSP104*-encoded plasmid show Rnq1p-GFP foci, hallmark of the $[PIN^+]$ phenotype (Fig 4B). However, the cells bearing a *Sp_hsp104*⁺ plasmid show a diffuse fluorescence, as a ΔSc_hsp104 control strain, thus presenting a $[pin^-]$ phenotype (Fig 4B). Hence, Sp_Hsp104 is not able to sustain the propagation of neither the $[PIN^+]$ nor the $[PSI^+]$ yeast prions.

The overexpression of Sp_Hsp104 does not eliminate the $[PSI^+]$ prion.

To assess whether Sp_Hsp104 overexpression is able to cure $[PSI^+]$, we transformed galactose-inducible expression plasmids encoding *Sp_hsp104*⁺, *Sc_HSP104*⁺, or an empty vector into $[PSI^+]$ 74-D694 cells. The induction of expression

of a gene under the control of the *GAL1* promoter is increased 1000 fold in the presence of galactose and in the absence of glucose in the medium, resulting in a significant overexpression of the corresponding protein (Ronicke et al. 1997). Because these strains also possess the genomic version of *Sc_HSP104*⁺ and since the anti-Sc_Hsp104 polyclonal antibody cannot discriminate Sp_Hsp104 from Sc_Hsp104, we confirmed Sp_Hsp104 overexpression by Northern blotting (data not shown). As expected, the overexpression of Sc_Hsp104 did cure the [*PSI*⁺] prion from most of the cells, as seen by their red color (Fig 4C). In contrast, the overexpression of Sp_Hsp104 did not cure [*PSI*⁺]. This result shows that, even at high concentration, Sp_Hsp104 is unable to block [*PSI*⁺] propagation.

The C-terminal portion of Sc_Hsp104 is crucial for the curing and propagation of yeast prions.

We have shown that Sp_Hsp104 is a functional disaggregase able to confer thermotolerance in both *S. pombe* and *S. cerevisiae*. Surprisingly however, this protein is not able to propagate [*PSI*⁺] and overexpression of Sp_Hsp104 was not able to cure the [*PSI*⁺] prion. Because Sp_Hsp104 is highly similar but not identical to Sc_Hsp104 (Fig 1A), it is reasonable to assume that its inability to propagate [*PSI*⁺] may involve other functions of this chaperone, such as substrate recognition.

The NTD and the CTD are the least conserved domains between Sp_Hsp104 and Sc_Hsp104 (Fig 1A). In particular, the CTD show a very divergent region at the extreme C-terminus of all Hsp104 orthologues (Fig 1B). Also, even if the NTD is globally less conserved between Sp_Hsp104 and Sc_Hsp104 than the CTD, a recent study show that

the NTD is dispensable for prion propagation (Hung and Masison 2006). Since Sp_Hsp104 and Sc_Hsp104 show interesting differences in the primary structures of their CTD, we decided to investigate the role of this domain in $[PSI^+]$ propagation.

Accordingly, we created chimeric sequence of Sc_HSP104 and of Sp_hsp104⁺ by interchanging their CTD. These constructions were named Sp104-CTDSc and Sc104-CTDSp. The recombinant genes were cloned into a galactose-inducible expression vector and transformed into $[PSI^+]$ 74-D694 and into Δ Sc_hsp104 cells. The correct synthesis of the plasmid-encoded proteins (Sp104-CTDSc and Sc104-CTDSp) was confirmed by immunoblotting on extracts from *S. cerevisiae* Δ hsp104 cells, and by Northern blotting on extracts from $[PSI^+]$ 74-D694 cells (data not shown). Thermotolerance and luciferase reactivation assays in Δ Sc_hsp104 cells showed that the chimeric proteins Sp104-CTDSc and Sc104-CTDSp were functional disaggregase able to untangle heat-aggregated proteins at a level only slightly lower than the wild type Hsp104 proteins (data not shown). We thus conclude that the chimeras were functional disaggregases.

When overexpressed in $[PSI^+]$ 74-D694 cells, the Sc104-CTDSp chimeric protein did cure the $[PSI^+]$ prion, but was less efficient than Sc_Hsp104 (Fig 5A). Strikingly, the Sp104-CTDSc chimeric protein gains the ability to cure the $[PSI^+]$ prion, although at a lower level than the wild-type Sc_Hsp104 protein (Fig 5A). To measure the clearance of the $[PSI^+]$ aggregates in the cell, we also performed a Sup35p aggregate analysis. As expected, the overexpression of Sc_Hsp104 completely solubilizes the Sup35p aggregates, while Sp_Hsp104 did not affect the level of aggregation of Sup35p in $[PSI^+]$ cells. Both chimeric proteins present an intermediate phenotype of Sup35p clearance, supporting the notion that both Sc104-CTDSp and Sp104-CTDSc proteins can cure the

[*PSI*⁺] prion, although less efficiently than Sc_Hsp104 (Fig 5B). Interestingly, Sp104-CTDSc is more efficient than Sc104-CTDSp to solubilize the Sup35p aggregates, thus underscoring the importance of the C-terminal part of Sc_Hsp104 in [*PSI*⁺] curing. These results indicate that the CTD of Sc_Hsp104 play an important role in the capacity of Hsp104 to cure the [*PSI*⁺] prion and that this function can be transferred to Sp_Hsp104. However, since the Sc104-CTDSp chimera is still able to impair [*PSI*⁺] propagation, other parts of the Sc_Hsp104 protein seems also to be important for this function.

The [cif] epigenetic element does not require Sp_hsp104⁺ for its propagation in S. pombe.

Our laboratory identified an epigenetic element exhibiting prion-like properties in *S. pombe*, the [*cif*] element (Collin et al. 2004). The presence of the [*cif*] element can be monitored by the ability of *S. pombe* cells to survive in the absence of the essential endoplasmic reticulum chaperone calnexin. The calnexin-independent (Cin) state is detected by using a strain containing a plasmid encoding *cnxI*⁺, the calnexin gene of fission yeast, in a $\Delta cnx1$ background (Collin et al. 2004). Following a plasmid segregation assay in non-selective media, Cin cells are score as those able to grow in the absence of the plasmid bearing *cnxI*⁺.

To evaluate the role of Sp_Hsp104 in the maintenance of the Cin state, a $\Delta Sp_hsp104 \Delta cnx1 + pcnxI^+ [cif]$ strain was constructed. Plasmid segregation assays showed that the deletion of *Sp_hsp104*⁺ had no effect on the propagation of the element [*cif*] since the $\Delta cnx1 \Delta Sp_hsp104$ cells remain in the calnexin-independent state (data not

shown). Moreover, these cells did not show any major growth defect, even after several generations, showing that the Cin state (and thus the [cif] element) can be maintained in absence Sp_Hsp104. Hence, the propagation of the [cif] element is independent of Sp_Hsp104.

Discussion

In this study, we characterized Sp_Hsp104, the fission yeast orthologue of the *S. cerevisiae* Hsp104 chaperone. We showed that *Sp_hsp104*⁺ is heat-inducible and is required for the acquisition of thermotolerance in *S. pombe*. Even if Sp_Hsp104 is a functional disaggregase, it is not able to maintain the propagation of the [PSI⁺] nor the [PIN⁺] prion and its overexpression cannot cure [PSI⁺] in the budding yeast. However, a chimera in which the C-terminal domain of Sc_Hsp104 was replaced with the corresponding domain of Sp_Hsp104 gained the ability to impair the propagation of [PSI⁺] in *S. cerevisiae* when overexpressed.

Hsp100 proteins are well known for their role in thermotolerance. Eukaryotic Hsp100 proteins have been identified as heat-shock factors in yeasts (Sanchez and Lindquist 1990; Zenthon et al. 2006), fungi (Lee et al. 2006; Malato et al. 2007), parasites (Hubel et al. 1995) and plants (Lee et al. 1994; Schirmer et al. 1994; Wells et al. 1998; Agarwal et al. 2003). However, no Hsp104 orthologue have been identified in mammals. Interestingly, Hsp100 proteins from the related yeast *Candida albicans* (Zenthon et al. 2006), but also from soybean (Lee et al. 1994), rice (Agarwal et al. 2003), tobacco (Wells et al. 1998), *Arabidopsis thaliana* (Schirmer et al. 1994) and from the fungus *Pleurotus sajor-caju* (Lee et al. 2006) are able to complement thermotolerance defect in

ΔSc_hsp104 *S. cerevisiae* cells. It is thus not surprising that the *S. pombe* Sp_Hsp104 orthologue is also able to confer thermotolerance in ΔSc_hsp104 cells. These studies suggest that Hsp100 proteins can act in concert with heterologous heat-shock factors of other organisms to increase cell survival in severe heat stress. Accordingly, when expressed in human cultured cells, Sc_Hsp104 act as a functional disaggregase and cooperate with endogenous chaperone to disentangle heat-shock aggregated proteins (Mosser et al. 2004).

The propagation of [*cif*], an epigenetic element displaying prion-like features in *S. pombe*, did not depend upon *Sp_hsp104*⁺ expression. This may seem surprising since *S. cerevisiae* prion propagation requires Sc_Hsp104. However, some [*PSI*⁺] variant can be propagated in *S. cerevisiae* without Sc_Hsp104, presumably because they form shorter and more soluble aggregates easily transmitted to the mitotic progeny (Liu *et al.* 2002; Crist *et al.* 2003). Some putative prions described in budding yeast also propagate to the mitotic progeny in a Hsp104-independent manner (Talloczy *et al.* 2000; Volkov *et al.* 2002; Aksenova *et al.* 2007). In addition, other epigenetic elements show the phenotypical characteristics of yeast prions but are perpetuated by an autocatalytic protease activity or by self-positively regulated MAP kinase cascade (Roberts and Wickner 2003; Benkemoun and Saupe 2006; Kicka et al. 2006). Surely, the identification of the proteins responsible for the [*cif*] element will provide more insights about the mode of transmission of this epigenetic factor

Our results show that, even if Sp_Hsp104 is a functional disaggregase, it is neither able assist yeast prion propagation nor cure [*PSI*⁺] when overexpressed. Interestingly, others report that Sc_Hsp104 mutations can distinctly affect prion propagation and

thermotolerance (Hattendorf and Lindquist 2002; Jung et al. 2002; Kurahashi and Nakamura 2007). Notably, all these mutant Sc_Hsp104 proteins show lower ATPase activities than Sc_Hsp104. *In vitro* analysis also show that Sc_Hsp104 disassembly of Sup35p amyloid fibers requires a higher level of ATP than the untangling of heat-aggregated protein (Doyle et al. 2007b). Because we did not evaluate the ATPase activity of Sp_Hsp104, we cannot exclude the possibility that the *S. pombe* chaperone may exhibit a lower ATPase activity than Sc_Hsp104, which could result in its inability to cure the [PSI⁺] prion. However, Sp_Hsp104 is as efficient as Sc_Hsp104 in the acquisition of thermotolerance in the budding yeast, suggesting that the ATPase activity of Sp_Hsp104 must thus be sufficient to efficiently disentangle heat-aggregated protein.

Our analysis of the protein sequence of Sp_Hsp104 prompted us to investigate the implication of the carboxy-terminal domain (CTD) in prion propagation. We found that a mutant Sp_Hsp104 protein bearing the CTD from Sc_Hsp104 gained the ability to cure the [PSI⁺] prion. One hypothesis is that the Sc_Hsp104 CTD enables the Sp104-CTDSc chimeric protein to cure the [PSI⁺] prion by increasing its ATPase activity. This hypothesis is supported by the structural characterization of the bacterial orthologue ClpB, that predict a close interaction between the CTD and the second ATPase domain of this Hsp100 protein (Lee et al. 2003). On the other hand, ClpB present a divergent CTD (Fig 1B) is unable to untangle the aggregated Sup35p fibers responsible for the [PSI⁺] prion (Shorter and Lindquist 2004). Certainly, the determination of the structure of Sc_Hsp104 will bring new light on the role of the CTD in the various Sc_Hsp104 activities. Further characterization of the mechanism of amyloid fibers solubilization by

Sc_Hsp104 will also be needed to clarify the role played by the CTD in the elimination of the $[PSI^+]$ prion by Sc_Hsp104 overexpression.

It was proposed that the acidic C-terminal region of Sc_Hsp104 can act as a substrate-binding region that recognizes lysine residues (Cashikar et al. 2002). Moreover, mutations in the middle region of Sup35p, a domain rich in lysine residues, modify the properties of $[PSI^+]$ propagation and its dependence on Sc_Hsp104 (Liu et al. 2002). Poly-L-lysine was also shown to stimulate the activity ATPase of both Sc_Hsp104 and the bacterial homologue ClpB by binding to their CTD region. The CTD could thus act as a substrate-binding site or as an effector-binding site (Cashikar et al. 2002; Strub et al. 2003).

Others suggested that the Hsp90 co-factors Sti1p and Sgt2p can interact with Sc_Hsp104 (Abbas-Terki et al. 2001; Liou et al. 2007). The authors proposed that these co-factors recognize the last residues of Sc_Hsp104 (DDLDD) as a tetratricopeptide-repeat (TPR), similar to those found in Hsp70 and Hsp90 which share a consensus motif EEVD at their C-terminal end. A possibility is that the interaction between Sc_Hsp104 and $[PSI^+]$ prion fibers requires the interaction with these co-factors and that Sp_Hsp104 is unable to cooperate with *S. cerevisiae* Hsp90 co-chaperones. Since the last residues of Sp_Hsp104 (EELE) are more closely related to the consensus TPR motif EEVD than the last residues of Sc_Hsp104 (DDLDD), we disfavor this hypothesis. Furthermore, The *Candida albicans* Hsp104 shows an even less conserved TPR motif (PGLDD) but can correctly assist $[PSI^+]$ propagation in *S. cerevisiae* (Zenthon et al. 2006). Moreover, the implication of the Hsp90 co-chaperone on $[PSI^+]$ propagation was shown to be non-

essential and primarily link with their interaction with Ssa1p, an Hsp70 molecular chaperone (Jones et al. 2004).

Although our CTD-chimeras characterization showed that the main phenotypic difference between Sp_Hsp104 and Sc_Hsp104 resides in its C-terminal domain, we cannot exclude that others regions of the chaperone could be involved in the Sp_Hsp104 propagation of the $[PSI^+]$ prion since the overexpression of Sc104-CTD_{Sp} chimeric protein can also solubilize Sup35p aggregates. Another study showed that the overexpression of Sc_Hsp104 mutants lacking the NTD are unable to cure the $[PSI^+]$ prion, but is still able to propagate $[PSI^+]$ and to induce thermotolerance (Hung and Masison 2006). It thus seems that mutations of both NTD and CTD can modulate the curing of the $[PSI^+]$ prion by Sc_Hsp104 overexpression. This also suggests that there may be a distinction between the Hsp104 function in propagation and curing of $[PSI^+]$.

In conclusion, we and others have been able to distinguish protein disaggregation and prion remodeling activities of Sc_Hsp104. Importantly, Sp_Hsp104 is the first wild-type yeast AAA+ protein known to be able to complement thermotolerance in *S. cerevisiae* without possessing prion remodeling activity. Moreover, the construction of chimeric proteins between Sc_Hsp104 and Sp_Hsp104 allow us to pinpoint for the first time the CTD of Sc_Hsp104 as an important modulator of $[PSI^+]$ and $[PIN^+]$ propagation. We thus think that Sp_Hsp104 offers an opportunity to discriminate between the molecular requirements of prion propagation from the characteristics necessary for the disaggregation of heat-aggregated proteins.

Experimental procedures

Strains and media.

The *S. pombe* strain SP3220 (*h⁻, his3-D1, ade6-M216, ura4-D18, leu1-32, Δcnx1::his3 + pREP41-cnxl⁺*) (Elagoz et al. 1999) was the parental strain used for the study of thermotolerance. The ΔSp_hsp104 strain (SP12422) was derived from SP3220 (see Table I). To study the impact of *Sp_hsp104⁺* on the propagation of the [*cif*] element, we used the strain SP7202 and the strain SP12115 ([*cif*] ΔSp_hsp104 ; see Table I) that harbors the [*cif*] epigenetic element and a pREP41*cnxl⁺* plasmid (Collin et al. 2004). The study of thermotolerance in *S. cerevisiae* was performed with the ΔSc_hsp104 strain SL303a (a kind gift from Susan Lindquist). The SL303a strain was transformed with the galactose-inducible, *Sc_HSP104*-encoding plasmid pYSGAL104 (from Susan Lindquist, Addgene plasmid 1190, SC12469), with an empty version of this plasmid (SC12506) or with a plasmid expressing *Sp_hsp104⁺* (SC12511). These three strains were also transformed with the plasmid pGPD-*luxAB*(HIS) (Addgene plasmid 1106) expressing the *Vibrio harveyi* luciferase resulting in the strains SC12609 (*Sc_HSP104*), SC12614 (empty plasmid) et SC12615 (*Sp_hsp104⁺*). To study if *Sp_Hsp104* can support [*PSI⁺*] propagation, we used the strain YJW532 (a kind gift from Mick Tuite) that has the genotype *MATa ade1-14 his3-11,15 leu2-3,112 ura3-1 trp1-1 can1-100 hsp104::HIS3* (pRS316-*Sc_HSP104*) [*PSI⁺*] [*PIN⁺*]. This strain was transformed with an empty pRS315 vector or with the pRS315-*Sp_hsp104⁺* and the pRS316-*Sc_HSP104* plasmid was shuffled using 5-FOA (5-fluoro-orotic acid) to make the strains SC12749 and SC12752. The [*psi⁻*] 74-D694 strain and the [*PSI⁺*] 74-D694 strain used as controls were from S. Lindquist. The transformation of pYSGAL104, pYSGAL, pYSGAL-*Sp_hsp104⁺*,

pYSGAL-104/CTD Sp and pYSGAL- $Sp104$ /CTD Sc in [PSI^+] allow us to obtain the strains SC12536, SC12534, SC12540, SC12841 and SC12844, respectively.

Unless otherwise indicated, *S. pombe* strains were grown at 30°C in minimal medium (EMM, here designated MM) supplemented with the required nutrients (Moreno et al. 1991). For growth of the various *S. cerevisiae* yeast strains, standard growth media were used, and cells were routinely cultured at 30°C as previously described (Sherman et al. 1981). To ensure plasmid retention, transformed cells were grown on a selective synthetic medium (SD, also called YNBD) containing all necessary supplement (Sigma). The [PSI^+]-mediated suppression of the *ade1-14* marker was routinely assessed by the color of colonies formed on YPD $\frac{1}{4}$ plates (YEPD but with 2.5 g/liter of yeast extract rather than 10 g/liter) and confirmed on plates containing SD-adenine defined medium supplemented with 2.5% (vol/vol) YEPD. The *GALI* promoter was induced by incubating cells in SDGal (SD containing 20 g of galactose/liter instead of glucose as the carbon source) after a preliminary growth to saturation in SDLG (YEPD containing 3 % of lactate and 3% of glycerol instead of glucose) to eliminate all glucose from the liquid medium (Peng and Hopper 2000). For plasmid amplification and construction, the *Escherichia coli* strain DH5 α (Hanahan 1983) was used. *E. coli* was grown in standard Luria broth (LB) plates or in 2x yeast extract-tryptone (2YT) liquid media supplemented with ampicillin (100 μ g/mL).

Identification, cloning and sequencing of Sp_hsp104⁺.

Using the *S. cerevisiae* Sc_HSP104/YLL026W protein sequence, the *S. pombe* genome database was searched using the BLASTP (Altschul et al. 1997) alignment program. A single sequence at locus NP_596503 encoding the hypothetical protein SPBC16D10.08c showed significant sequence identity (52 %) to the *S. cerevisiae* Hsp104 protein sequence. Two oligonucleotide primers (5'-CTT TGT TAA ATT GGC CAT ATG ATG GCT GAT TAT CCT-3' and 5'-TAT GGG TAA AAG ATG AGA TCT TTA TTC CAA TTC TTC ATC-3') were designed and used in a PCR amplification with the Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich, MA, USA) to obtain a 2.7-kb DNA fragment from the genomic DNA of *S. pombe* strain SP556. The primers produced unique *Nde*I (5') and *Bgl*II (3') restriction sites at either end of the amplified sequence. The *Nde*I/*Bgl*II -digested PCR product was ligated to *Nde*I/*Bam*HI -digested pREP2 vector (Maundrell 1993) to generate plasmid pREP2-*Sp_hsp104⁺*. Using various oligonucleotide primers (synthesized by BioCorp inc. Montréal, Canada), both strands of the cloned *Sp_hsp104⁺* gene were sequenced (by the IRIC genomic platform, Université de Montréal, Canada) using the dideoxy chain termination method.

Plasmids constructions and transformations.

Unless told otherwise, all constructions were transformed in *E. coli* DH5 α CaCl₂-competent cells. DNA transformations into *S. pombe* and *S. cerevisiae* cells were performed by the polyethylenglycol (PEG)-lithium acetate procedure as previously described (Elble 1992).

The pYSGAL empty vector was created by a *Bam*HI digestion of pYSGAL104. The absence of *Sc_HSP104* was confirmed by sequencing analysis of pYSGAL. The pYSGAL-*Sp_hsp104*⁺ was generated by *in vivo* recombination in *S. cerevisiae*. The strategy was to amplify *Sp_hsp104*⁺ with 50 bases flanking the coding region to recombine it with pYSGAL104 in order to replace the open reading frame of *Sc_HSP104* with that of *Sp_hsp104*⁺ without affecting the rest of the plasmid. With pREP2-*Sp_hsp104*⁺ as template, the PCR was achieved with the primers 5'-CAA AGA AAA AAG AAA TCA ACT ACA CGT ACC ATA AAA TAT ACA GAA TAT ATG GCT GAT TAT CCT TTT ACT GAC-3' and 5'-AGA GTT CCA ATT CTT CTT GCA ATG AGC TTC CTT CTG CCT AGC TAA CTT TAT TCC AAT TCT TCA TCA TTA AC-3'. The *Bgl*II linearized pYSGAL104 vector and the PCR amplification of *Sp_hsp104*⁺ were transformed into W303a competent *S. cerevisiae* cells with the specifications described in Knop *et al.* (1999). The recombinant clones were selected by *URA3* selection on selective media. The plasmids were extracted using the lyticase extraction protocol of Ling *et al.* (1995). Electrocompetent DH5 α cells were then transformed with the DNA extraction using a BioRad MicroPulse electroporator and grow on LB ampicillin media.

The pRS315-*Sp_hsp104*⁺ was constructed in a similar manner. The cloning strategy was to replace the *GAL1-10* promoter of pYSGAL-*Sp_hsp104*⁺ with the genomic 5'UTR 640-bp region of *S. cerevisiae* in an *in vivo* recombination cloning to then extract the *Not*I fragment and to insert it in the centromeric plasmid pRS315. This region was amplified using genomic *S. cerevisiae* DNA with the primers 5'-ATA CAT ATC CAT ATC TAA TCT TAC TTA TAT GTT GTG GAA ATG TAA AGA GCG

CGG CCG CAT CGA TTC AAA GGC GTT ATT CAG C-3' and 5'-CAT ATA TTC TGT ATA TTT TAT GGT ACG TG-3'. The PCR product was transformed with linearized pYSGAL-*Sp_hsp104*⁺ into W303a competent *S. cerevisiae* cells. The plasmid from the *URA3* clones were extracted and sequenced using the same specifications described for pYSGAL-*Sp_hsp104*⁺ to verify the insertion of the 5'-UTR *S. cerevisiae* region. This plasmid was digested by *NotI* and the (3.6-kb) fragment was inserted into pRS315 linearized by *NotI*.

The chimeric genes were constructed using the same approach of *in vivo* recombinational cloning using PCR amplification of the C-terminal domains (CTDs). *Sp_Hsp104* CTD was amplified using pREP2-*Sp_hsp104*⁺ as matrix with the following primers: 5'-AAG ACG ATC GAC TGT TCC AAT TGT ATT GTC ATC ATG ACT TCC AAT CTA GGT GCT GAA TAC TTG ACA ACA GAC AAT GAG TCT-3' and 5'-TTA TAT TAC TGA TTC TTG TTC GAA AGT TTT TAA AAA TCA CAC TAT ATT AAA TTA TTC CAA TTC TTC ATC ATT AAC ATC GTC-3'. *Hsp104* CTD was amplified using pYSGAL104 as matrix with the following primers: 5'-CAG GTT GTT GAT GCC AAG AAT GCT GTT ATC ATT ATG ACT TCT AAC TTG GGC GCT GAA TTT ATC AAT TCT CAA CAA GGA TCA-3' and 5'-ATA TTA CTG ATT CTT GTT CGA AAG TTT TTA AAA ATC ACA CTA TAT TAA ACT TTA ATC TAG GTC ATC ATC AAT TTC CAT ACT.

All PCR amplifications were performed with the Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich, MA, USA). All plasmid were tested for protein expression by immunoblotting with appropriate antibodies. Other nucleic-acid manipulations and analyses were carried out as previously described (Sambrook et al. 1989).

Construction of the ΔSp_hsp104 strain and Southern blot analysis.

The deletion of Sp_hsp104^+ was carried out by the method described in Krawchuk and Wahls (1999). Using the pFA6a-KanMX6 plasmid (Bahler et al. 1998) as a template, the neomycin resistance gene was amplified with the primers 5'-CAC CGG TCC GGG TTA ATT AA -3' and 5'-CCT TAA TTA ACG AGC TCG TTT AAA CTG G-3'. A PCR reaction was performed to amplify Sp_hsp104^+ with its flanking regions with the primers 5'-CTC GAG CAA CCT CTT CAT CCT CAG-3' and 5'-CTC GAG CCA TAT TAG CTG CTA CCG-3' and cloned in the vector pCR-XL-TOPO. The coding region of Sp_hsp104^+ was extracted by an *AgeI/PacI* digestion to keep only the 0.5 kb flanking regions. The cassette was completed by a ligation between this *AgeI/PacI* digested plasmid and the *AgeI/PacI* extracted neomycin resistance gene. The Sp_hsp104^+ knock-out cassette was extracted with an *XhoI* digestion and transformed into SP3220 and SP7202 strains. Recombinant clones were selected on plate containing 100 mg/L neomycin. Southern blot analyses were performed to confirm the correct and unique insertion of the cassette in the *S. pombe* genome (data not shown). Genomic DNA extractions and DNA-DNA hybridization were carried out as previously described (Sambrook et al. 1989; Moreno et al. 1991). For Southern blotting, the probe was amplified by PCR using genomic *S. pombe* DNA and the primers used were 5'-CCA TTG TCT GAA CGG AAA TC-3' and 5'-AGT TCA GGT TAG CTA TGT GC-3'. The genomic DNA was digested by *BglII/NheI*. As a control, the same membrane was stripped and rehybridised with the entire FL-KanMX6 *AgeI/PacI* probe (data not shown).

RNA preparation and Northern blot analysis.

RNA preparation was made using the MaXtract High Density 2 mL tubes (Qiagen) following the manufacturer's specifications using 10-15 mL exponential cultures of *S. pombe* or *S. cerevisiae* cells. Cells lysates were prepared by homogenization using a beat-beater in a modified RNA lysis solution containing 1 M β -mercaptoethanol. RNA samples (10 μ g) were analyzed by Northern blot in 1.2% agarose, 0.22 M formaldehyde gels (pH 7.0) containing 0.1 μ g/mL ethidium bromide to verify that equivalent amounts of RNA were loaded. RNA was transferred by capillarity onto a Nitran nylon membrane (Schleicher and Schuell). The probes were labeled using the Prime-it® II Random primer labeling kit (Stratagene) following the manufacturer's instructions. The probes used encompassed the entire coding region of either *HSP104* or *ACT1* for *S. cerevisiae* or *Sp_hsp104*⁺ or *act1*⁺ for *S. pombe*.

Antibodies and immunoblotting.

For the detection of Hsp104 from *S. cerevisiae*, we used the monoclonal antibody 17B as described in (Cashikar et al. 2002). For the detection of Sp_Hsp104 we used antibodies raised against the whole recombinant His-tagged Sc_Hsp104 protein (Tkach and Glover 2004). These polyclonal antibodies were able to detect Sp_Hsp104 in a specific manner when used at a dilution of 1:5000. To reduce background, we pre-blotted these antibodies with a nitrocellulose membrane and we subsequently incubated the antibodies with acetone powder of the strain Δ *Sp_hsp104*, as described in (Sambrook et al. 1989). Immunoblotting was carried out as previously described (Marechal et al. 2004).

Thermotolerance assay.

Exponentially growing cells were adjusted to an OD_{595 nm} of 0.5, serially diluted (10^{-1} to 10^{-4}), spotted on solid media, and grown for 5 days in the case of *S. pombe* cells and 3 days for *S. cerevisiae* cells at 30°C. For heat shock, cells either were or were not pretreated at 37°C for one hour, and then were incubated in a bath at 50°C for 20 minutes and subsequently cooled on ice for 5 minutes. Cells were mixed by vortexing, serially diluted and subsequently spotted on the corresponding solid media.

Luciferase reactivation assay.

The luciferase reactivation assay was essentially performed as described in (Zenthon et al. 2006). The relevant strains were transformed with the plasmid pGPD-*luxAB*(HIS) (AddGene number 1106), which expresses a temperature-sensitive *Vibrio harveyi* luciferase (Parsell et al. 1994b). The transformed cells were grown in appropriate galactose selective medium (after grow in lactate-glycerol media) to an OD_{595nm} of approximately 0.5. The luciferase activity was determined before treatment as a control. The culture was then transferred to a 46°C bath, and after 30 min, cycloheximide was added to a final concentration of 10 µg/ml. The culture was then incubated for a further 15 min, after which the cell culture was transferred back to 25°C to allow the cells to recover. Cell samples were taken immediately to determine the level of luciferase activity and then collected every 30 min for up to 3 h. The luciferase activity was determined by using 200 µl of cells plus 5 µl of decylaldehyde (Sigma), and

the resulting luminescence was immediately quantified using a Lumat LB 9507 luminometer (EG&G Berthold).

Fluorescence microscopy.

ΔSc_hsp104 strains bearing centromeric pRS315 plasmid encoding *Sc_HSP104* or *Sp_hsp104*⁺ were transformed with a pRS316-*CUP1-RNQ1-GFP* plasmid (Addgene number 1172). ΔSc_hsp104 and [*PSI*⁺] strains were also transformed with the *RNQ1-GFP* encoding plasmid and were used as negative and positive controls, respectively. The Rnq1-GFP fusion protein were induced for 24 hours with 50 μ M of CuSO₄ in exponentially growing cells, as specified elsewhere (Liebman et al. 2006). Live cells were observed in fluorescence microscopy using a Nikon TE2000U microscope.

Sup35p aggregate analysis.

Protein extracts were prepared by glass bead lysis as described for immunoblotting (Marechal et al. 2004) but were separated into soluble and high-molecular-weight fractions using ultracentrifugation (100,000 g for 15 min at 4°C) (Ness et al. 2002). Protein samples were fractionated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to a nitrocellulose membrane. Western blot analysis was carried out using primary anti-Sup35p rabbit antibodies (kind gift of S. Lindquist) at a 1:100 dilution. Antibody-antigen interactions were revealed using standard chemiluminescence techniques (ECL; Perkin-Elmer), with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc.) at a 1:5 000 dilution.

Plasmid segregation assay.

Plasmid segregation was essentially conducted as previously described (Collin et al. 2004). Briefly, *S. pombe* strains bearing one or two plasmids were grown for 6 days at 30°C in 3 ml liquid MM supplemented with adenine (Ade), uracil (Ura) and leucine (Leu) to chase the resident pREP41*cnx1*⁺ (*LEU2* marker) plasmid. Cells were plated onto MM+Ade+Ura+Leu, MM+Ade+Ura, MM+Ade and MM+Ade+Leu. Phenotypes of the cells for uracil and/or leucine auxotrophy were then analysed after 2-3 days of growth at 30°C, and statistical values for plasmid loss were calculated.

Acknowledgements

We thank Susan L. Lindquist for the kind gifts of monoclonal anti-Hsp104 antibody, for the plasmids pYSGAL104 and pGPD-*luxAB*(HIS) and for the strains SL303a, [*PSI*⁺] 74-D694 and [*psi*⁻] 74-D694. We thank Mick Tuite for the YJW532 strain and John Glover for the polyclonal anti-Hsp104 antibody. We also want to thank Pascal Chartrand for the strain W303a and Pierre Belhumeur for the pRS315 plasmid. We thank Nicolas Paquin from Pascal Chartrand's lab for technical advice on recombination cloning *in vivo* and for fruitful discussions. We also thank all the lab members for helpful discussions, and former lab member Philippe Collin who did preliminary work on this project. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (Grant MOP-62703) to L.A.R. P.S. received an FRSQ M.Sc studentship and scholarship from the Faculté des Études Supérieures–Département de biochimie, Université de Montréal.

Tables

Table I. Yeast strains used in this study

Species	Strain		Genotype	Reference or source
<i>S. pombe</i>	SP248		<i>h⁻ his3-D1 ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	(Burke and Gould 1994)
<i>S. pombe</i>	SP556		<i>h⁺ ade6-M216 ura4-D18 leu1-32</i>	P. Nurse laboratory
<i>S. pombe</i>	SP3220	(Wild-type)	SP248 Δ <i>cnx1::his3</i> + pREP41 <i>cnx1⁺</i>	(Elagoz <i>et al.</i> 1999)
<i>S. pombe</i>	SP7188	(Cin)	SP248 Δ <i>cnx1::his3</i> [<i>cif</i>] (derivative of SP3222)	(Collin <i>et al.</i> 2004)
<i>S. pombe</i>	SP7202		SP7188 + pREP41 <i>cnx1⁺</i> [<i>cif</i>]	(Collin <i>et al.</i> 2004)
<i>S. pombe</i>	SP12115		SP7202 Δ <i>Sp_hsp104::neo^R</i> [<i>cif</i>]	This study
<i>S. pombe</i>	SP12422	(Δ <i>Sp_hsp104</i>)	SP3220 Δ <i>Sp_hsp104::neo^R</i>	This study
<i>S. cerevisiae</i>	W303a	(Wild-type)	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 lys2Δ can1-100</i>	(Thomas and Rothstein 1989)
<i>S. cerevisiae</i>	SL303a	(Δ <i>Sc_hsp104</i>)	W303a Δ <i>hsp104::LEU2</i> [<i>psi⁻</i>][<i>pin⁻</i>]	(Sanchez and Lindquist 1990)
<i>S. cerevisiae</i>	SC12469		SL303a + pYSGAL104 [<i>psi⁻</i>][<i>pin⁻</i>]	This study
<i>S. cerevisiae</i>	SC12506		SL303a + pYSGAL [<i>psi⁻</i>][<i>pin⁻</i>]	This study
<i>S. cerevisiae</i>	SC12511		SL303a + pYSGAL- <i>Sp_hsp104⁺</i> [<i>psi⁻</i>][<i>pin⁻</i>]	This study
<i>S. cerevisiae</i>	SC12609		SC12469 + pGPD- <i>luxAB</i> (HIS) [<i>psi⁻</i>][<i>pin⁻</i>]	This study
<i>S. cerevisiae</i>	SC12614		SC12506 + pGPD- <i>luxAB</i> (HIS) [<i>psi⁻</i>][<i>pin⁻</i>]	This study

<i>S. cerevisiae</i> SC12615	SC12511 + pGPD- <i>luxAB</i> (HIS) [<i>psi</i> ⁻][<i>pin</i> ⁻]	This study
<i>S. cerevisiae</i> YJW532	MATa <i>ade1-14 his3-11,15 leu2-3,112 ura3-1 trp1-1 can1-100</i> <i>hsp104::HIS3</i> +pRS316- <i>Sc_HSP104</i> [<i>PSI</i> ⁺][<i>PIN</i> ⁺]	(Zenthon <i>et al.</i> 2006)
<i>S. cerevisiae</i> SC12749	as YJW532 + pRS315	This study
<i>S. cerevisiae</i> SC12752	as YJW532 + pRS315- <i>Sp_hsp104</i> ⁺	This study
<i>S. cerevisiae</i> [<i>psi</i> ⁻] 74-D694	MATa <i>ade1-14 his3 leu2 trp1-289 ura3</i> [<i>psi</i> ⁻][<i>PIN</i> ⁺]	(Chernoff <i>et al.</i> 1995)
<i>S. cerevisiae</i> [<i>PSI</i> ⁺] 74-D694	MATa <i>ade1-14 his3 leu2 trp1-289 ura3</i> [<i>PSI</i> ⁺][<i>PIN</i> ⁺]	(Chernoff <i>et al.</i> 1995)
<i>S. cerevisiae</i> SC12536	[<i>PSI</i> ⁺] 74-D694+ pYSGAL104 [<i>PSI</i> ⁺][<i>PIN</i> ⁺]	This study
<i>S. cerevisiae</i> SC12534	[<i>PSI</i> ⁺] 74-D694+ pYSGAL [<i>PSI</i> ⁺][<i>PIN</i> ⁺]	This study
<i>S. cerevisiae</i> SC12540	[<i>PSI</i> ⁺] 74-D694+ pYSGAL- <i>Sp_hsp104</i> ⁺ [<i>PSI</i> ⁺][<i>PIN</i> ⁺]	This study
<i>S. cerevisiae</i> SC12841	[<i>PSI</i> ⁺] 74-D694+ pYSGAL- <i>Sc104-CTD</i> <i>Sp</i> [<i>PSI</i> ⁺][<i>PIN</i> ⁺]	This study
<i>S. cerevisiae</i> SC12844	[<i>PSI</i> ⁺] 74-D694+ pYSGAL- <i>Sp104-CTD</i> <i>Sc</i> [<i>PSI</i> ⁺][<i>PIN</i> ⁺]	This study

Figures legends

Figure 1. Sequence alignment of Hsp104 homologues. (A) Schematic representation of the five main domains of Hsp104 as described by Hung *et al.* (2006). Hsp104 has two nucleotide binding domains (NBD1 and NBD2), which are well conserved among AAA+ proteins. These domains are separated by a middle (M) domain that is specific to the ClpB/Hsp100 subfamily. The *N*- and *C*-terminal domains (NTD and CTD) are the least conserved domains. The position of the first amino acid of each region is indicated above the representation for Sc_Hsp104 and Sp_Hsp104. The level of identity and similarity are indicated below each domain. (B) Analysis of the CTD. The sequence of seven yeast Hsp104 homologues and two bacterial ClpB were aligned using ClustalW with a gap open penalty of 2. Identical residues (*), conserved (:), and semi-conserved (.) variations are indicated. Alpha helices (gray) and beta strands (black) predicted by the SOPMA method (Geourjon and Deleage 1995) are indicated. Structural elements determined by crystallography of *Thermus thermophilus* ClpB are indicated below the sequence (Lee et al. 2003), for comparison: alpha helices are underlined and beta strands are in italic letter. The predicted structure corresponds to the defined structure for 83% of the residues in the CTD of *T. thermophilus* ClpB.

A

Hsp104	153	413	540	730	808	
Sp_Hsp104	152	412	540	737	816	
	NTD	NBD1	M	NBD2	CTD	
Identity	34%	63%	47%	67%	43%	Tot 52%
Similarity	74%	92%	70%	97%	79%	Tot 83%

B

<i>S. albicans</i>	707	AEVE--EALGDSKIDAN-TREYTHAVYANPFEFLNLS	IVV	FDI	IKKAKIKVKKLSEKESFTADQK	IKLK	EDAKVLCER	814
<i>S. pombe</i>	719	AEVI--EALGDTIISY-TRELVTHAVYANPFEFLNLS	IVV	FDI	IKKAKIKVKKLSEKESFTADQK	IKLK	EDAKVLCER	814
<i>S. kluyveri</i>	714	AEVI--EALGDTTIDG-TRELVTHAVYANPFEFLNLS	IVV	FDI	IKKAKIKVKKLSEKESFTADQK	IKLK	EDAKVLCER	814
<i>S. cerevisiae</i>	710	AEVI--EALGDTTIDG-TRELVTHAVYANPFEFLNLS	IVV	FDI	IKKAKIKVKKLSEKESFTADQK	IKLK	EDAKVLCER	814
<i>S. kluyveri</i>	710	AEVI--EALGDTTIDG-TRELVTHAVYANPFEFLNLS	IVV	FDI	IKKAKIKVKKLSEKESFTADQK	IKLK	EDAKVLCER	814
<i>S. kluyveri</i>	713	AEVI--EALGDTTIDG-TRELVTHAVYANPFEFLNLS	IVV	FDI	IKKAKIKVKKLSEKESFTADQK	IKLK	EDAKVLCER	814
<i>S. pombe</i>	717	AEVIEEEDGDSKIDT-TREYTHAVYANPFEFLNLS	IVV	FDI	IKKAKIKVKKLSEKESFTADQK	IKLK	EDAKVLCER	814
<i>S. cerevisiae</i>	710	AEVI--EALGDTTIDG-TRELVTHAVYANPFEFLNLS	IVV	FDI	IKKAKIKVKKLSEKESFTADQK	IKLK	EDAKVLCER	814
<i>S. kluyveri</i>	711	AEVI--EALGDTTIDG-TRELVTHAVYANPFEFLNLS	IVV	FDI	IKKAKIKVKKLSEKESFTADQK	IKLK	EDAKVLCER	814
<i>S. kluyveri</i>	711	AEVI--EALGDTTIDG-TRELVTHAVYANPFEFLNLS	IVV	FDI	IKKAKIKVKKLSEKESFTADQK	IKLK	EDAKVLCER	814

<i>S. albicans</i>	499	GVYFVLCAPFLNRLDQKINFLAVLLEKQIDDKK	IVV	FDI	IKKAKIKVKKLSEKESFTADQK	IKLK	EDAKVLCER	814
<i>S. pombe</i>	500	GVYFVLCAPFLNRLDQKINFLAVLLEKQIDDKK	IVV	FDI	IKKAKIKVKKLSEKESFTADQK	IKLK	EDAKVLCER	814
<i>S. kluyveri</i>	507	GVYFVLCAPFLNRLDQKINFLAVLLEKQIDDKK	IVV	FDI	IKKAKIKVKKLSEKESFTADQK	IKLK	EDAKVLCER	814
<i>S. cerevisiae</i>	508	GVYFVLCAPFLNRLDQKINFLAVLLEKQIDDKK	IVV	FDI	IKKAKIKVKKLSEKESFTADQK	IKLK	EDAKVLCER	814
<i>S. kluyveri</i>	509	GVYFVLCAPFLNRLDQKINFLAVLLEKQIDDKK	IVV	FDI	IKKAKIKVKKLSEKESFTADQK	IKLK	EDAKVLCER	814
<i>S. pombe</i>	508	GVYFVLCAPFLNRLDQKINFLAVLLEKQIDDKK	IVV	FDI	IKKAKIKVKKLSEKESFTADQK	IKLK	EDAKVLCER	814
<i>S. cerevisiae</i>	507	GVYFVLCAPFLNRLDQKINFLAVLLEKQIDDKK	IVV	FDI	IKKAKIKVKKLSEKESFTADQK	IKLK	EDAKVLCER	814
<i>S. kluyveri</i>	508	GVYFVLCAPFLNRLDQKINFLAVLLEKQIDDKK	IVV	FDI	IKKAKIKVKKLSEKESFTADQK	IKLK	EDAKVLCER	814

Figure 2. Sp_Hsp104 is required for thermotolerance in *S. pombe*. (A) *Sp_hsp104*⁺ is heat inducible. Wild-type and $\Delta hsp104$ *S. pombe* cells were treated or not for 1 hour at 37°C. Cell extracts were fractionated by SDS-PAGE, transferred on a nitrocellulose membrane and immunoblotted with rabbit polyclonal anti-Sc_Hsp104 (Tkach and Glover 2004). The nitrocellulose membrane was stripped and blotted against tubulin as a loading control. (B) Thermotolerance assay of wild-type and $\Delta hsp104$ *S. pombe* cells. Pretreatment of 1 hour at 37°C was applied or not before a heat shock of 20 minutes at 50°C. Cells were then briefly cooled on ice, spotted in serial dilution on minimal media and incubated for 5 days at 30°C.

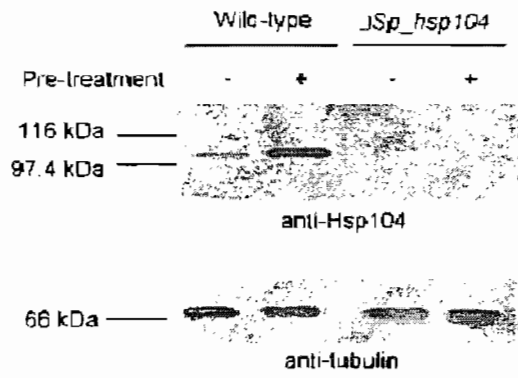
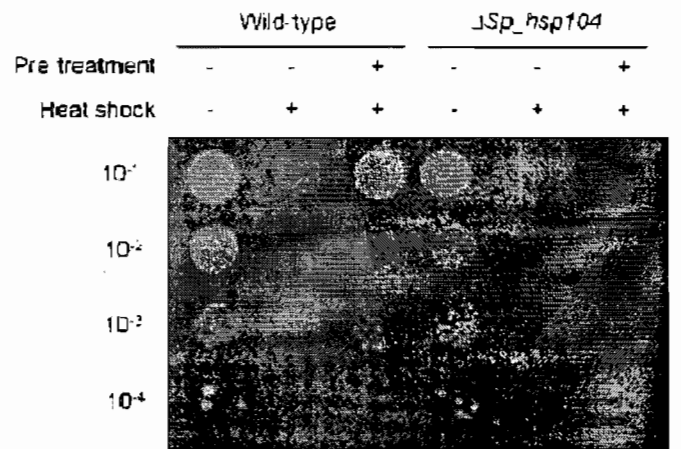
A**Immunoblotting****B****Thermotolerance assay**

Figure 3. Heterologous expression of Sp_Hsp104 complements the Sc_HSP104 deletion. (A) The expression of Sc_Hsp104 and Sp_Hsp104 was verified by immunoblotting. Monoclonal anti-Sc_Hsp104 is specific to the *S. cerevisiae* protein. The corresponding cell extracts from *S. cerevisiae* $\Delta hsp104$ cells were separated by SDS-PAGE and immunoblotted using monoclonal anti-Sc_Hsp104 (Cashikar et al. 2002). Ponceau red staining of the membrane is shown as a loading control. (B) Immunodetection of Sp_Hsp104 expression in *S. cerevisiae* ΔSc_hsp104 cells was done using a polyclonal antibody against full-length Sc_Hsp104 protein (Tkach and Glover 2004). This antibody can also stain Sp_Hsp104. Ponceau red staining of the membrane is shown as a loading control. (C) Thermotolerance assay. ΔSc_hsp104 *S. cerevisiae* cells bearing a galactose inducible vector encoding either Sc_HSP104 or Sp_hsp104⁺ were treated or not with a heat shock of 20 minutes at 50°C. An empty vector was used as a negative control. (D) Luciferase reactivation assay *in vivo*. ΔSc_hsp104 *S. cerevisiae* cells expressing bacterial luciferase were submitted to a heat shock of 45 minutes at 46°C. Then luciferase activity was measured every 30 minutes for 150 minutes and after 3 hours of recovery. Cells expressing Sc_HSP104 (□), Sp_hsp104⁺ (▲), or having an empty vector (x) are indicated. Results of three independent measures are indicated with their standard deviations.

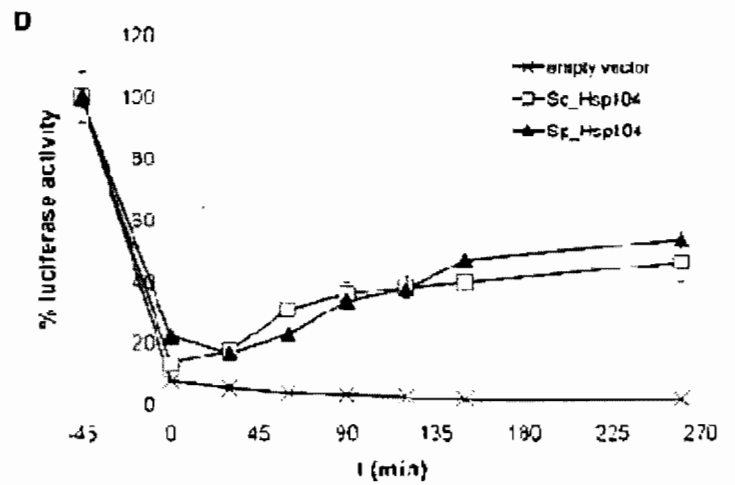
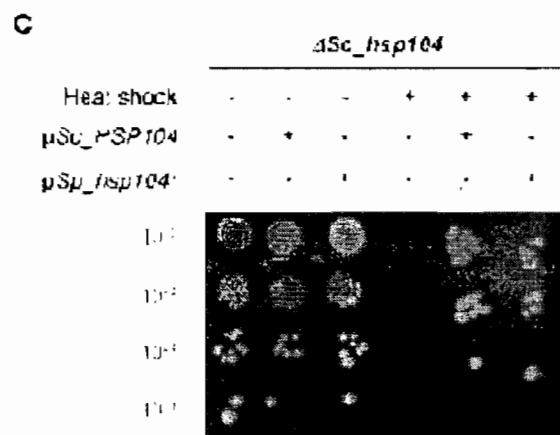
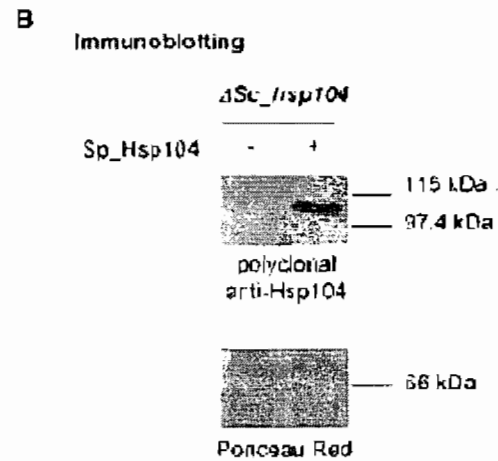
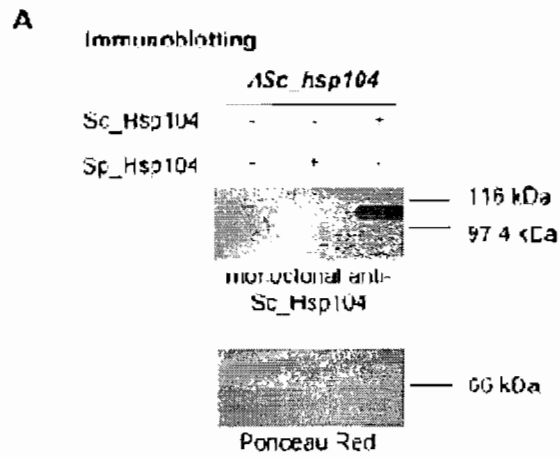


Figure 4. Impact of Sp_Hsp104 on prion propagation in *S. cerevisiae*. (A) Sp_Hsp104 cannot sustain $[PSI^+]$ propagation. A ΔSc_hsp104 $[PSI^+]$ strain bearing a centromeric plasmid encoding *Sc_HSP104* (lane 1) was used to test if Sp_Hsp104 is able to maintain $[PSI^+]$ propagation. An empty vector (lane 2) or a plasmid encoding *Sp_hsp104*⁺ (lane 3) was transformed in this strain and shuffled against the *HSP104* plasmid. The resulting strains were streaked on YPD¼. (B) Sp_Hsp104 cannot sustain $[PIN^+]$ propagation. The aggregation state of the Rnq1-GFP fusion protein was observed by fluorescence microscopy. The Nomarski contrast is shown above each picture. A wild type $[PIN^+]$ strain ($[PSI^+]$ 74-D694 strain, lane 1) was used as positive control and a ΔSc_hsp104 $[pin^-]$ strain (lane 2) was used as a negative control. The ΔSc_hsp104 + *pSc_HSP104* strain (lane 3) and ΔSc_hsp104 + *pSp_hsp104*⁺ strains (lane 4) are shown. (C) Sp_Hsp104 cannot eliminate the $[PSI^+]$ prion. A $[PSI^+]$ strain was transformed with galactose inducible overexpression plasmids. As expected, the empty vector has no effect (lane 1) and the *Sc_HSP104* plasmid cures $[PSI^+]$ with a high efficiency (lane 2). The overexpression of *Sp_hsp104*⁺ (lane 3) has no effect. For panels A and C wild-type $[PSI^+]$ and $[psi^-]$ 74-D694 strains are presented as controls.

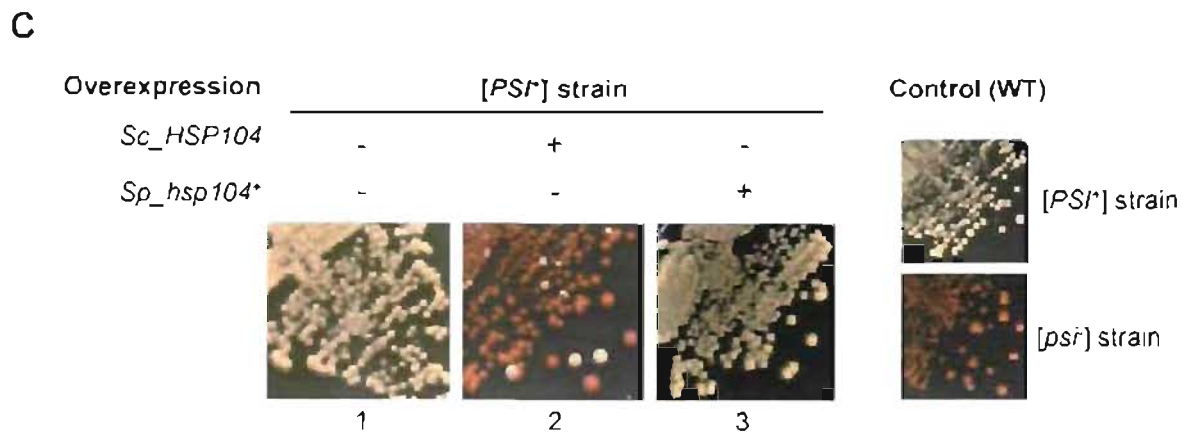
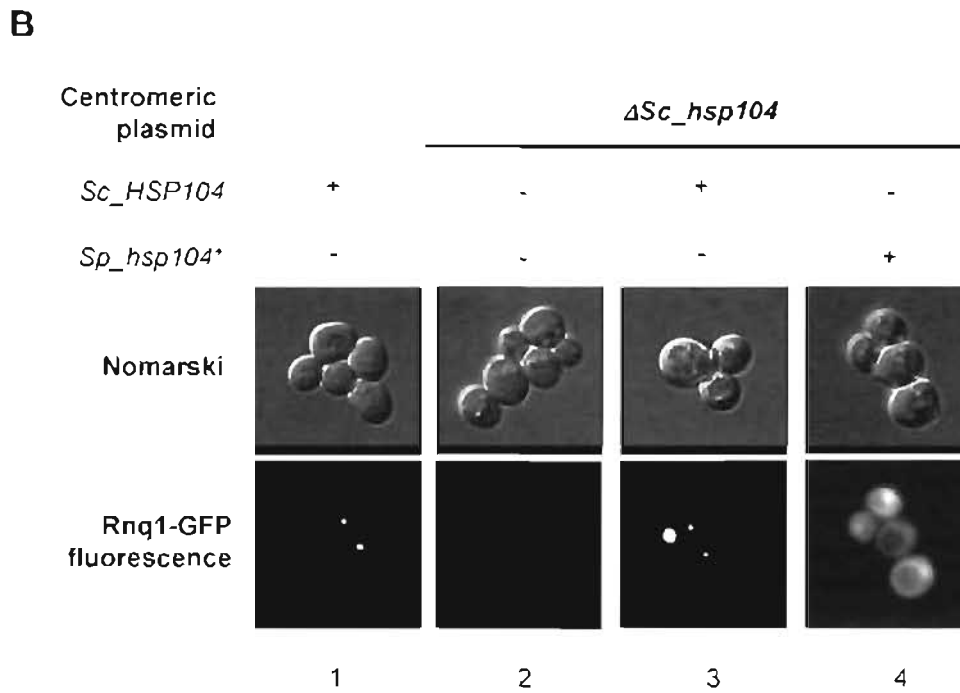
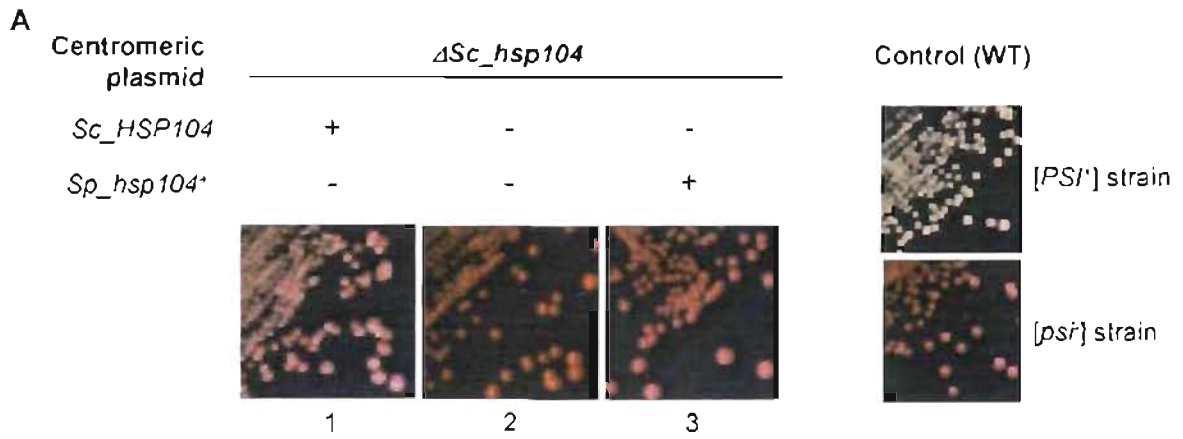
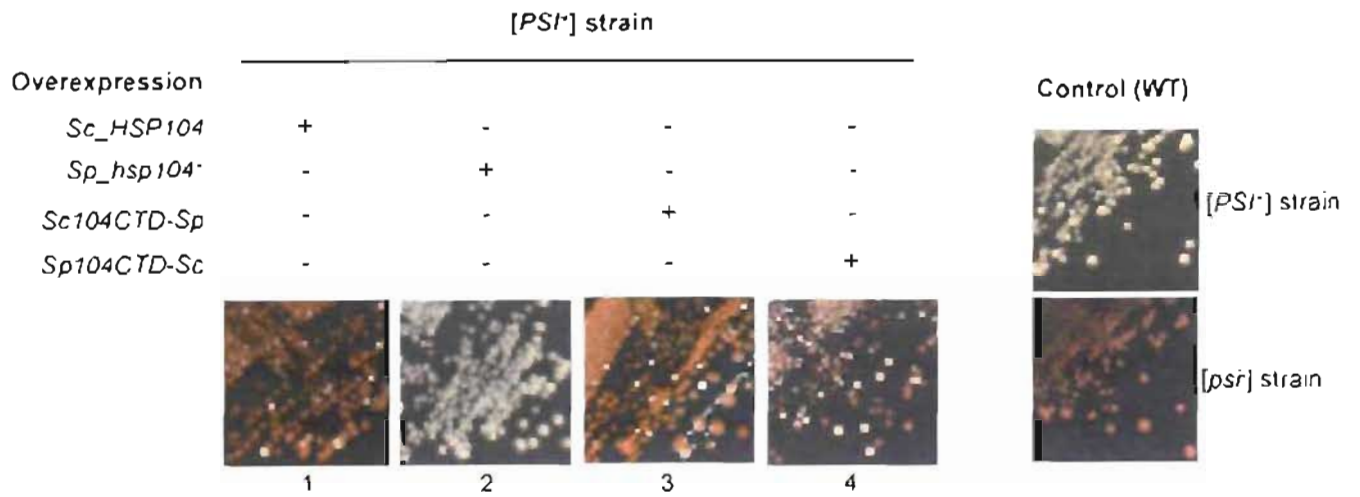
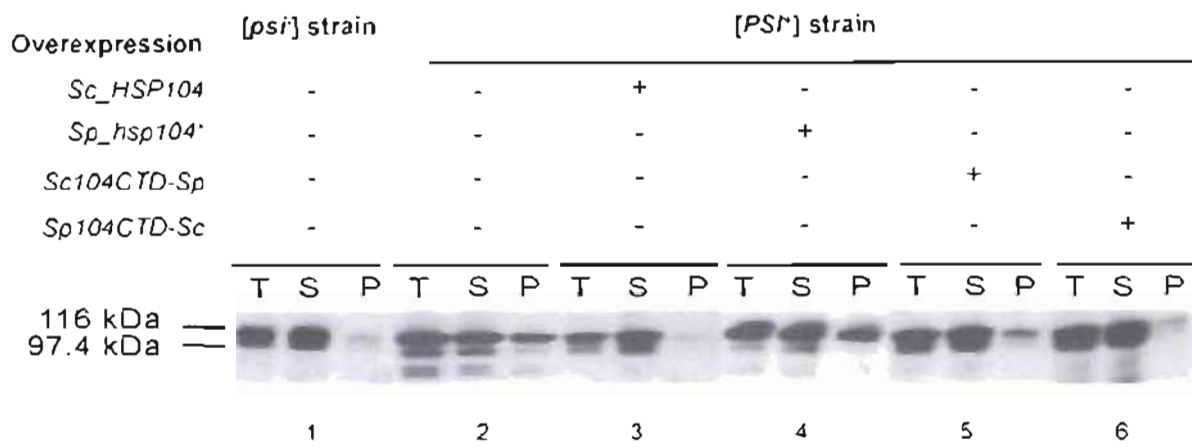


Figure 5. The C-terminal part of Sc_Hsp104 is critical for the curing of the $[PSI^+]$ prion in *S. cerevisiae*. (A) Wild-type and chimeric genes were cloned in galactose inducible expression vectors, transformed into $[PSI^+]$ cells and streaked on YPD $\frac{1}{4}$. Wild-type Sc_Hsp104 cures efficiently $[PSI^+]$ (lane 1) unlike Sp_Hsp104 (lane 2). The Sc104-CTD_{Sp} chimera and the Sp104-CTD_{Sc} chimeras can cure $[PSI^+]$ (lane 3 and 4), but less efficiently than wild-type Sc_Hsp104. $[PSI^+]$ and $[psi^-]$ strains are presented as controls. (B) Subcellular fractionation assay. The Sup35p is revealed by immunoblotting after an ultracentrifugation step in total cell extracts (T), in the pellet (P) or in the supernatant (S). $[psi^-]$ 74-D694 cells (lane 1) and $[PSI^+]$ 74-D694 (lane 2) were used as controls. As expected, the overexpression of Sc_Hsp104 (lane 3) solubilizes Sup35p aggregates, while Sp_Hsp104 (lane 4) overexpression did not affect the aggregation of Sup35p. Sc104-CTD_{Sp} (lane 5) and Sp104-CTD_{Sc} (lane 6) show an intermediate capacity to solubilize Sup35p aggregates.

A



B



References

- Abbas-Terki, T., Donze, O., Briand, P.A., and Picard, D. 2001. Hsp104 interacts with Hsp90 cochaperones in respiring yeast. *Molecular and cellular biology* **21**: 7569-7575.
- Agarwal, M., Sahi, C., Katiyar-Agarwal, S., Agarwal, S., Young, T., Gallie, D.R., Sharma, V.M., Ganesan, K., and Grover, A. 2003. Molecular characterization of rice hsp101: complementation of yeast hsp104 mutation by disaggregation of protein granules and differential expression in indica and japonica rice types. *Plant molecular biology* **51**: 543-553.
- Aksenova, A., Munoz, I., Volkov, K., Arino, J., and Mironova, L. 2007. The HAL3-PPZI dependent regulation of nonsense suppression efficiency in yeast and its influence on manifestation of the yeast prion-like determinant [ISP(+)]. *Genes Cells* **12**: 435-445.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* **25**: 3389-3402.
- Bahler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast (Chichester, England)* **14**: 943-951.
- Benkemoun, L., and Saupe, S.J. 2006. Prion proteins as genetic material in fungi. *Fungal Genet Biol* **43**: 789-803.
- Bosl, B., Grimminger, V., and Walter, S. 2005. Substrate binding to the molecular chaperone Hsp104 and its regulation by nucleotides. *The Journal of biological chemistry* **280**: 38170-38176.
- Bosl, B., Grimminger, V., and Walter, S. 2006. The molecular chaperone Hsp104--a molecular machine for protein disaggregation. *Journal of structural biology* **156**: 139-148.

- Burke, J.D., and Gould, K.L. 1994. Molecular cloning and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* his3 gene for use as a selectable marker. *Mol Gen Genet* **242**: 169-176.
- Byrne, L.J., Cox, B.S., Cole, D.J., Ridout, M.S., Morgan, B.J., and Tuite, M.F. 2007. Cell division is essential for elimination of the yeast [PSI⁺] prion by guanidine hydrochloride. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 11688-11693.
- Cashikar, A.G., Schirmer, E.C., Hattendorf, D.A., Glover, J.R., Ramakrishnan, M.S., Ware, D.M., and Lindquist, S.L. 2002. Defining a pathway of communication from the C-terminal peptide binding domain to the N-terminal ATPase domain in a AAA protein. *Molecular cell* **9**: 751-760.
- Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and Bahler, J. 2003. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Molecular biology of the cell* **14**: 214-229.
- Chernoff, Y.O., Lindquist, S.L., Ono, B., Inge-Vechtormov, S.G., and Liebman, S.W. 1995. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi⁺]. *Science* **268**: 880-884.
- Chien, P., Weissman, J.S., and DePace, A.H. 2004. Emerging principles of conformation-based prion inheritance. *Annual review of biochemistry* **73**: 617-656.
- Collin, P., Beauregard, P.B., Elagoz, A., and Rokeach, L.A. 2004. A non-chromosomal factor allows viability of *Schizosaccharomyces pombe* lacking the essential chaperone calnexin. *Journal of cell science* **117**: 907-918.
- Crist, C.G., Nakayashiki, T., Kurahashi, H., and Nakamura, Y. 2003. [PHI⁺], a novel Sup35-prion variant propagated with non-Gln/Asn oligopeptide repeats in the absence of the chaperone protein Hsp104. *Genes Cells* **8**: 603-618.
- De Virgilio, C., Simmen, U., Hottiger, T., Boller, T., and Wiemken, A. 1990. Heat shock induces enzymes of trehalose metabolism, trehalose accumulation, and thermotolerance in *Schizosaccharomyces pombe*, even in the presence of cycloheximide. *FEBS letters* **273**: 107-110.

- Doyle, S.M., Shorter, J., Zolkiewski, M., Hoskins, J.R., Lindquist, S., and Wickner, S. 2007. Asymmetric deceleration of ClpB or Hsp104 ATPase activity unleashes protein-remodeling activity. *Nature structural & molecular biology* **14**: 114-122.
- Elagoz, A., Callejo, M., Armstrong, J., and Rokeach, L.A. 1999. Although calnexin is essential in *S. pombe*, its highly conserved central domain is dispensable for viability. *Journal of cell science* **112 (Pt 23)**: 4449-4460.
- Elble, R. 1992. A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *BioTechniques* **13**: 18-20.
- Geourjon, C., and Deleage, G. 1995. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci* **11**: 681-684.
- Glover, J.R., and Lindquist, S. 1998. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**: 73-82.
- Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T., and Bukau, B. 1999. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 13732-13737.
- Grably, M.R., Stanhill, A., Tell, O., and Engelberg, D. 2002. HSF and Msn2/4p can exclusively or cooperatively activate the yeast HSP104 gene. *Molecular microbiology* **44**: 21-35.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**: 557-580.
- Hattendorf, D.A., and Lindquist, S.L. 2002. Cooperative kinetics of both Hsp104 ATPase domains and interdomain communication revealed by AAA sensor-1 mutants. *The EMBO journal* **21**: 12-21.
- Hubel, A., Brandau, S., Dresel, A., and Clos, J. 1995. A member of the ClpB family of stress proteins is expressed during heat shock in *Leishmania* spp. *Molecular and biochemical parasitology* **70**: 107-118.

- Hung, G.C., and Masison, D.C. 2006. N-terminal domain of yeast Hsp104 chaperone is dispensable for thermotolerance and prion propagation but necessary for curing prions by Hsp104 overexpression. *Genetics* **173**: 611-620.
- Jones, G., Song, Y., Chung, S., and Masison, D.C. 2004. Propagation of *Saccharomyces cerevisiae* [PSI⁺] prion is impaired by factors that regulate Hsp70 substrate binding. *Molecular and cellular biology* **24**: 3928-3937.
- Jones, G.W., and Tuite, M.F. 2005. Chaperoning prions: the cellular machinery for propagating an infectious protein? *Bioessays* **27**: 823-832.
- Jung, G., Jones, G., and Masison, D.C. 2002. Amino acid residue 184 of yeast Hsp104 chaperone is critical for prion-curing by guanidine, prion propagation, and thermotolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 9936-9941.
- Kicka, S., Bonnet, C., Sobering, A.K., Ganesan, L.P., and Silar, P. 2006. A mitotically inheritable unit containing a MAP kinase module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 13445-13450.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. 1999. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast (Chichester, England)* **15**: 963-972.
- Krawchuk, M.D., and Wahls, W.P. 1999. High-efficiency gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe* using a modular, PCR-based approach with long tracts of flanking homology. *Yeast (Chichester, England)* **15**: 1419-1427.
- Kryndushkin, D.S., Alexandrov, I.M., Ter-Avanesyan, M.D., and Kushnirov, V.V. 2003. Yeast [PSI⁺] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. *The Journal of biological chemistry* **278**: 49636-49643.
- Kurahashi, H., and Nakamura, Y. 2007. Channel mutations in Hsp104 hexamer distinctively affect thermotolerance and prion-specific propagation. *Molecular microbiology* **63**: 1669-1683.

- Lee, J.O., Jeong, M.J., Kwon, T.R., Lee, S.K., Byun, M.O., Chung, I.M., and Park, S.C. 2006. Pleurotus sajor-caju HSP100 complements a thermotolerance defect in hsp104 mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biosciences* **31**: 223-233.
- Lee, S., Sowa, M.E., Watanabe, Y.H., Sigler, P.B., Chiu, W., Yoshida, M., and Tsai, F.T. 2003. The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell* **115**: 229-240.
- Lee, Y.R., Nagao, R.T., and Key, J.L. 1994. A soybean 101-kD heat shock protein complements a yeast HSP104 deletion mutant in acquiring thermotolerance. *The Plant cell* **6**: 1889-1897.
- Liebman, S.W., Bagriantsev, S.N., and Derkatch, I.L. 2006. Biochemical and genetic methods for characterization of [PIN+] prions in yeast. *Methods (San Diego, Calif)* **39**: 23-34.
- Lindquist, S. 1986. The heat-shock response. *Annual review of biochemistry* **55**: 1151-1191.
- Ling, M., Merante, F., and Robinson, B.H. 1995. A rapid and reliable DNA preparation method for screening a large number of yeast clones by polymerase chain reaction. *Nucleic acids research* **23**: 4924-4925.
- Liou, S.T., Cheng, M.Y., and Wang, C. 2007. SGT2 and MDY2 interact with molecular chaperone YDJ1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell stress & chaperones* **12**: 59-70.
- Liu, J.J., Sondheimer, N., and Lindquist, S.L. 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 Suppl 4**: 16446-16453.
- Lum, R., Tkach, J.M., Vierling, E., and Glover, J.R. 2004. Evidence for an unfolding/threading mechanism for protein disaggregation by *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104. *The Journal of biological chemistry* **279**: 29139-29146.
- Malato, L., Dos Reis, S., Benkemoun, L., Sabate, R., and Saupe, S.J. 2007. Role of Hsp104 in the Propagation and Inheritance of the [Het-s] Prion. *Molecular biology of the cell* **18**: 4803-4812.

- Marechal, A., Tanguay, P.L., Callejo, M., Guerin, R., Boileau, G., and Rokeach, L.A. 2004. Cell viability and secretion of active proteins in *Schizosaccharomyces pombe* do not require the chaperone function of calnexin. *The Biochemical journal* **380**: 441-448.
- Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., et al. 2006. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature biotechnology* **24**: 841-847.
- Maundrell, K. 1993. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**: 127-130.
- Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in enzymology* **194**: 795-823.
- 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.
- Mosser, D.D., Ho, S., and Glover, J.R. 2004. *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104 enhances the chaperone capacity of human cells and inhibits heat stress-induced proapoptotic signaling. *Biochemistry* **43**: 8107-8115.
- Ness, F., Ferreira, P., Cox, B.S., and Tuite, M.F. 2002. Guanidine hydrochloride inhibits the generation of prion "seeds" but not prion protein aggregation in yeast. *Molecular and cellular biology* **22**: 5593-5605.
- Parsell, D.A., Kowal, A.S., and Lindquist, S. 1994a. *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104 protein. Purification and characterization of ATP-induced structural changes. *The Journal of biological chemistry* **269**: 4480-4487.
- Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A., and Lindquist, S. 1994b. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* **372**: 475-478.
- Peng, G., and Hopper, J.E. 2000. Evidence for Gal3p's cytoplasmic location and Gal80p's dual cytoplasmic-nuclear location implicates new mechanisms for controlling Gal4p

- activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **20**: 5140-5148.
- Ribeiro, M.J., Reinders, A., Boller, T., Wiemken, A., and De Virgilio, C. 1997. Trehalose synthesis is important for the acquisition of thermotolerance in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular microbiology* **25**: 571-581.
- Roberts, B.T., and Wickner, R.B. 2003. Heritable activity: a prion that propagates by covalent autoactivation. *Genes & development* **17**: 2083-2087.
- Ronicke, V., Graulich, W., Mumberg, D., Muller, R., and Funk, M. 1997. Use of conditional promoters for expression of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in enzymology* **283**: 313-322.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 3 v.
- Sanchez, Y., and Lindquist, S.L. 1990. HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* **248**: 1112-1115.
- Satpute-Krishnan, P., Langseth, S.X., and Serio, T.R. 2007. Hsp104-dependent remodeling of prion complexes mediates protein-only inheritance. *PLoS biology* **5**: e24.
- Schaupp, A., Marcinowski, M., Grimminger, V., Bosl, B., and Walter, S. 2007. Processing of proteins by the molecular chaperone Hsp104. *Journal of molecular biology* **370**: 674-686.
- Schirmer, E.C., Lindquist, S., and Vierling, E. 1994. An Arabidopsis heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast. *The Plant cell* **6**: 1899-1909.
- Seppa, L., Hanninen, A.L., and Makarow, M. 2004. Upregulation of the Hsp104 chaperone at physiological temperature during recovery from thermal insult. *Molecular microbiology* **52**: 217-225.
- Sherman, F., Fink, G.R., Hicks, J.B., and Cold Spring Harbor Laboratory. 1981. *Methods in yeast genetics*, 1981 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, pp. 120.
- Shorter, J., and Lindquist, S. 2004. Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers. *Science* **304**: 1793-1797.

- Shorter, J., and Lindquist, S. 2006. Destruction or potentiation of different prions catalyzed by similar Hsp104 remodeling activities. *Molecular cell* **23**: 425-438.
- Sondheimer, N., and Lindquist, S. 2000. Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Molecular cell* **5**: 163-172.
- Strub, C., Schlieker, C., Bukau, B., and Mogk, A. 2003. Poly-L-lysine enhances the protein disaggregation activity of ClpB. *FEBS letters* **553**: 125-130.
- Taloczy, Z., Mazar, R., Georgopoulos, D.E., Ramos, F., and Leibowitz, M.J. 2000. The [KIL-d] element specifically regulates viral gene expression in yeast. *Genetics* **155**: 601-609.
- 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.
- Thomas, B.J., and Rothstein, R. 1989. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**: 619-630.
- Tkach, J.M., and Glover, J.R. 2004. Amino acid substitutions in the C-terminal AAA+ module of Hsp104 prevent substrate recognition by disrupting oligomerization and cause high temperature inactivation. *The Journal of biological chemistry* **279**: 35692-35701.
- True, H.L. 2006. The battle of the fold: chaperones take on prions. *Trends Genet* **22**: 110-117.
- 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.
- Wells, D.R., Tanguay, R.L., Le, H., and Gallie, D.R. 1998. HSP101 functions as a specific translational regulatory protein whose activity is regulated by nutrient status. *Genes & development* **12**: 3236-3251.

- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., et al. 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**: 871-880.
- Zenthon, J.F., Ness, F., Cox, B., and Tuite, M.F. 2006. The [PSI⁺] prion of *Saccharomyces cerevisiae* can be propagated by an Hsp104 orthologue from *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **5**: 217-225.
- Zolkiewski, M. 2006. A camel passes through the eye of a needle: protein unfolding activity of Clp ATPases. *Molecular microbiology* **61**: 1094-1100.

3. Discussion

3.1 Retour sur la problématique

Le nombre de gens atteints de maladies causées par l'accumulation de fibres amyloïdes, comme la maladie d'Alzheimer et les maladies à prions, est grandissant. Il est donc important de mieux comprendre les mécanismes de formation et de propagation de ces fibres. Certaines levures et champignons possèdent des protéines formant des fibres amyloïdes et constituent des outils pratiques et peu coûteux pour mieux comprendre les mécanismes à la base de la formation des fibres amyloïdes. Celles-ci forment ce que l'on nomme des prions de levures, des éléments épigénétiques se transmettant d'une cellule à l'autre par le biais de protéines formant des fibres amyloïdes. L'étude des prions chez la levure *S. cerevisiae* a montré que la désagrégase Sc_Hsp104 est nécessaire à la propagation de ces prions. Sc_Hsp104 diminue la taille des fibres amyloïdes prioniques, ce qui permet aux prions de levure d'être transmis d'une cellule à l'autre.

Le but de mon projet était de caractériser la protéine Sp_Hsp104 et d'évaluer son implication dans la propagation de l'élément épigénétique [*cif*]. Notre étude a montré que Sp_Hsp104 est nécessaire à la réactivation des protéines dénaturées à la chaleur chez *S. pombe*, tout comme Sc_Hsp104 chez *S. cerevisiae*. Par contre, son activité désagrégase ne suffit pas à propager les prions [*PSI*⁺] et [*PIN*⁺] chez *S. cerevisiae*. La caractérisation de protéines chimériques entre Sc_Hsp104 et Sp_Hsp104 a montré pour la première fois que le domaine C-terminal (CTD) de Sc_Hsp104 favorise l'élimination du prion [*PSI*⁺]. Quand à la propagation de [*cif*], elle n'est pas influencée par l'action de Sp_Hsp104. Notre étude a donc permis de faire avancer nos connaissances sur l'élément [*cif*]. Nous avons aussi montré que Sp_Hsp104 est un outil de choix pour mieux comprendre les déterminants moléculaires nécessaires à la propagation des prions chez *S. cerevisiae*. Les prochaines sections présentent donc certaines avenues ouvertes par nos travaux. La section 3.2 porte sur l'impact de nos travaux sur la compréhension des mécanismes de thermotolérance chez

S. pombe. Les sections 3.3 et 3.4 présentent et discutent différentes hypothèses tentant d'expliquer pourquoi Sp_Hsp104 est incapable d'interagir avec les prions de *S. cerevisiae*. La discussion de ce mémoire se termine ensuite par une revue globale de nos travaux dans le contexte de la problématique de ce mémoire.

3.2 Regard sur la thermotolérance chez *S. pombe*

La résistance aux chocs thermiques sévères acquise suite à un choc thermique modéré a déjà été décrit chez *S. pombe* dans le cadre d'études sur la synthèse de tréhalose (De Virgilio *et al.* 1990; Ribeiro *et al.* 1997). Le tréhalose est un polysaccharide produit par les cellules pour se protéger de diverses conditions de stress. Les résultats présentés dans notre article sont en accord avec ces études. Ces auteurs ont montré que la synthèse de tréhalose est particulièrement importante quand les cellules sont soumises à des températures de 40 à 42.5°C, parce qu'à cette température la synthèse protéique (y compris la synthèse des protéines de choc thermique) est fortement inhibée. Par contre, l'acquisition de la thermotolérance par des traitements à 35-37°C n'est pas dépendante de la synthèse de tréhalose. En effet, lorsque les cellules sont soumises à des températures de 35 à 37°C, la synthèse des protéines inductibles à la chaleur atteint son maximum et le tréhalose joue alors un rôle secondaire dans la thermotolérance (Ribeiro *et al.* 1997). Des études similaires effectuées chez *S. cerevisiae* ont montrés que le tréhalose joue un rôle complémentaire à Sc_Hsp104 dans la thermotolérance (Elliott *et al.* 1996; Iwahashi *et al.* 1998).

Notre étude a également montré que Sp_Hsp104 est en mesure de conférer la thermotolérance chez *S. cerevisiae* aussi bien que Sc_Hsp104. Notamment, Sc_Hsp104 doit interagir avec les chaperones Ydj1p (Hsp40) et Ssa1p (Hsp70) pour agir de façon optimale (Glover and Lindquist 1998). Nos résultats suggèrent donc que Sp_Hsp104 est en mesure de coopérer efficacement avec les chaperones de *S. cerevisiae*. Tel que décrit dans notre article, d'autres membres de la famille des ClpB/Hsp100 semblent également fonctionner parfaitement chez *S. cerevisiae*. De même, Sc_Hsp104 est en mesure de

coopérer avec des chaperones Hsp40 et Hsp70 dans des cellules humaines en culture, ce qui laisse croire que la coopération entre les ClpB/Hsp100 et leur co-chaperone est peu stringente (Glover and Lindquist 1998; Mosser et al. 2004). Pourtant, on a également rapporté que Sc_Hsp104 est incapable de coopérer avec les chaperones bactériennes, ce qui laisse croire qu'une certaine spécificité est requise dans cette interaction (Glover and Lindquist 1998). D'autres études sont donc nécessaires pour mieux définir la spécificité des interactions entre les ClpB/Hsp100 et les autres membres du contrôle de qualité de la cellule.

3.3 Implications possibles du CTD sur l'activité des Hsp104

L'étude de Sp_Hsp104 m'a permis d'identifier le domaine carboxy-terminal (CTD) comme un domaine important pour la propagation des prions chez la levure *S. cerevisiae*. Bien que ces résultats aient été discutés brièvement dans l'article, je présente ici une discussion plus élaborée des rôles possibles que pourrait jouer le CTD sur l'activité des protéines Hsp104.

Des études comparatives entre différentes protéines AAA+ ont défini une région conservée nommée domaine SSD (« sensor and substrate discrimination domain ») situé dans la queue C-terminale de ClpB (Smith et al. 1999). Un modèle similaire a été proposé pour Sc_Hsp104 (Cashikar et al. 2002). Une autre étude portant sur des mutants de Sc_Hsp104 a montré que la portion C-terminale de Sc_Hsp104 est importante pour son oligomérisation (Tkach and Glover 2004). On pourrait penser que nos chimères Sc104-CTD_{Sp} et Sp104-CTD_{Sc} présenterait donc des problèmes d'oligomérisation, particulièrement dans des conditions de choc thermique, puisque ces protéines chimériques ne portent pas leur domaine natif. Pourtant, notre caractérisation des protéines chimériques montre bien que ces protéines sont tout à fait fonctionnelles et peuvent médier la thermotolérance chez *S. cerevisiae*.

La structure de ClpB montre que le CTD peut être subdivisé en deux sections distinctes. La première section est bien structurée et plutôt bien conservée alors que la seconde section est très peu conservée et semble plutôt désordonnée. Chez Sc_Hsp104, cette seconde partie est très riche en résidus acides. On a donc proposé que cette portion de Sc_Hsp104 est responsable de son interaction avec les protéines-clientes (Cashikar et al. 2002). Aussi, des expériences *in vitro* ont montré que ClpB, qui ne possède pas de section riche en résidus acides à la fin de son CTD, n'est pas en mesure d'interagir avec Sup35p, la protéine responsable du prion de levure [*PSI*⁺] (Shorter and Lindquist 2004). Cette hypothèse est très intéressante, puisque l'analyse des CTD de différentes protéines ClpB/Hsp100 montre une corrélation entre la taille et le pourcentage en résidus acides dans ce domaine et la capacité de ces protéines à interagir avec Sup35p (Tableau III). Cette théorie est supportée par la capacité de la chimère Sp104-CTDSc à éliminer le prion [*PSI*⁺] lorsqu'elle est surexprimée. Par contre, cette hypothèse n'explique pas pourquoi cette chimère n'est pas aussi efficace que Sc_Hsp104 pour éliminer ce prion. Aussi, la chimère Sc104-CTDSp est également en mesure de nuire à la propagation de [*PSI*⁺], alors que Sp_Hsp104 en est incapable, ce qui montre bien que les résidus acides du CTD ne peuvent pas être les seuls responsables de la capacité à éliminer le prion [*PSI*⁺]. Il faut aussi noter que, malgré plusieurs études démontrant une interaction entre les protéines Sup35p et Hsp104, les détails moléculaires de cette interaction demeurent nébuleux (Inoue et al. 2004; Shorter and Lindquist 2006).

Tableau III. Comparaison des domaines C-terminaux de quelques protéines de la famille des ClpB/Hsp100.

Protéine	Taille du CTD (aa)	Nombre de résidus acides	% de résidus acides	Interaction avec Sup35p
Sc_Hsp104	178	36	20.2	Oui
Ca_Hsp104	172	31	18.0	Oui
Sp_Hsp104	168	28	16.7	Non
Ec_ClpB	136	20	14.7	Non

Abbréviations : *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Candida albicans* (Ca), *Schizosaccharomyces pombe* (Sp) et *Escherichia coli* (Ec).

Notre étude nous a donc mené à proposer une autre hypothèse, qui permet de compléter (sans exclure) la première. Une étude récente a montré que Sc_Hsp104 nécessite une plus grande activité ATPase pour solubiliser des fibres amyloïdes de Sup35p que pour désaggréger des protéines agrégées à la chaleur (Doyle et al. 2007b). Or, le CTD est structurellement associé au second domaine ATPase des ClpB/Hsp100 (Fig 1.6). Nous avons donc émis l'hypothèse que Sp_Hsp104 présente une activité ATPase moins élevée que Sc_Hsp104. Cette activité désaggrégase serait suffisante pour permettre la thermotolérance, mais insuffisante pour propager efficacement les prions de levure. On peut penser que ClpB, qui possède une activité ATPase moins élevée que Sc_Hsp104 (Doyle et al. 2007b) et qui est incapable d'interagir avec Sup35p (Shorter and Lindquist 2004), agirait selon le même modèle. Selon cette hypothèse, le CTD de Sc_Hsp104 favoriserait une activité ATPase plus élevée que le domaine correspondant chez Sp_Hsp104. Aussi, cette hypothèse suppose que le gain de la capacité de la chimère Sp104-CTDSc à éliminer le prion [*PSI*⁺] serait une conséquence de cette augmentation de l'activité ATPase. On peut aussi penser que la capacité résiduelle de Sc104-CTDSp à éliminer [*PSI*⁺] serait le résultat d'une activité ATPase plus forte que Sp_Hsp104, peut-être supportée par son

premier domaine ATPase. Cette hypothèse devra être vérifiée dans le futur par la mesure de l'activité ATPase de Sp_Hsp104 et des chimères construites dans le cadre de cette étude.

3.4 Hypothèse sur l'impact d'une phénylalanine dans la première boucle flexible chez Sp_Hsp104.

Tel que vu dans les sections 1.4.2 et 1.4.3, le mécanisme d'action des protéines ClpB/Hsp100 repose sur un mouvement ATP-dépendant de boucles portant des résidus tyrosines qui entraînent les protéines-clientes vers le centre de l'hexamère, les tirant depuis l'extrémité *N*-terminale jusqu'à l'extrémité *C*-terminale de l'hexamère. Il est important de noter que ce mode d'action n'a jusqu'ici été décrit que pour la désagrégation de protéines dénaturées à la chaleur. Pourtant, l'étude des résidus tyrosine 257 et 662 suggère que ce mode d'action est également utilisé pour désagréger les fibres amyloïdes des prions de levures (Lum et al. 2004; Hung and Masison 2006). Or, l'analyse de la séquence de Sp_Hsp104 révèle que le résidu correspondant à la tyrosine 257 de Sc_Hsp104 est en fait une phénylalanine (position 254). La tyrosine de la seconde boucle est conservée. Notons au passage qu'une telle substitution est relativement courante chez les protéines AAA+ (Yamada-Inagawa et al. 2003).

L'impact d'une substitution de la tyrosine 257 n'a jamais fait l'objet d'étude et il nous est donc impossible de prévoir ces effets sur les différentes activités de Sc_Hsp104. Par contre, des études de mutagenèse sur la tyrosine 662 de Sc_Hsp104 ont montré que le remplacement de la tyrosine par une phénylalanine affecte très peu les capacités de Sc_Hsp104 à propager [*PSI*⁺] et à permettre la thermotolérance (Lum et al. 2004; Hung and Masison 2006). Cette substitution ne semble pas avoir d'impact sur la capacité de Sp_Hsp104 à désagréger les protéines dénaturées à la chaleur. Par contre, nous ne pouvons exclure la possibilité que la substitution d'une tyrosine pour une phénylalanine à cette position affecte l'interaction entre Sp_Hsp104 et les prions de *S. cerevisiae*, surtout si Sc_Hsp104 interagit avec les prions de levure selon le même modèle que ClpB avec ces

protéines-clients (Schlieker et al. 2004b). En effet, tel que vu en 1.4.2, le site principal de reconnaissance des substrats de ClpB est la tyrosine (Y251) située sur la première boucle flexible de cette désagrégase. Si Sc_Hsp104 et Sp_Hsp104 agisse de façon similaire dans leur interaction avec les prions de levure, il est possible que la substitution d'une tyrosine pour une phénylalanine affecte la spécificité de cette interaction.

D'autres études seront nécessaires pour mieux comprendre le mécanisme d'interaction entre Sc_Hsp104 et les prions de levure : par son extrémité C-terminal ou par la loupe flexible associée au premier domain ATPase. Notre étude a par contre montré que le CTD joue un rôle important dans la capacité à éliminer $[PSI^+]$. En effet, la chimère Sp104-CTDSc montre que la substitution d'une tyrosine par une phénylalanine sur la première loupe flexible n'empêche pas cette chimère d'empêcher la propagation du prion $[PSI^+]$. Qui plus est, nous avons montré que la chimère Sp104-CTDSc est plus efficace dans cette tâche que Sc104-CTDSp. Dans tous les cas, l'étude de Sp_Hsp104 permettra assurément de mieux comprendre les facteurs qui influencent l'interaction entre Sc_Hsp104 et les prions de levure.

3.5 Conclusions et perspectives

Le but de mon projet était de caractériser l'homologue de Sc_Hsp104 chez la levure *S. pombe* et d'évaluer la capacité de cette protéine à propager les prions de levure chez *S. cerevisiae* et l'élément épigénétique $[cif]$ chez *S. pombe*. Nos travaux ont montré que Sp_Hsp104 est un homologue fonctionnel de Sc_Hsp104 qui possède une activité désagrégase capable d'assister la thermotolérance chez *S. cerevisiae* et chez *S. pombe*. Pourtant, Sp_Hsp104 est incapable d'assister la propagation des prions $[PSI^+]$ et $[PIN^+]$ et sa surexpression n'élimine pas le prion $[PSI^+]$. Parallèlement, l'élément épigénétique $[cif]$ se transmet de manière indépendante à Sp_Hsp104. Dans le but d'identifier les déterminants moléculaires responsables de l'interaction entre Sc_Hsp104 et les prions de levure, nous avons donc construit les chimères Sc104-CTDSp et Sp104-CTDSc qui sont tous deux capables d'éliminer $[PSI^+]$ lorsque surexprimés. Ces résultats démontrent donc

pour la première fois que le domaine C-terminal de Sc_Hsp104 joue un rôle important dans l'élimination de [*PSI*⁺] et que l'activité désaggrégase de Sc_Hsp104 n'est pas le seul facteur permettant d'influencer la propagation des prions de levure.

Ces résultats apportent de nouvelles pistes qu'il serait pertinent d'étudier dans le futur. D'abord, il faudrait vérifier si les chimères Sc104-CTD_{Sp} et Sp104-CTD_{Sc} sont en mesure de soutenir la propagation des prions [*PSI*⁺] et [*PIN*⁺], comme nous l'avons testé avec Sp_Hsp104. Il faudrait également construire d'autres mutants et chimères de Hsp104 pour identifier avec précision les résidus nécessaires à l'élimination du prion [*PSI*⁺]. Aussi, tel que vu dans la section précédente, Sp_Hsp104 offre la possibilité d'étudier l'impact d'une substitution de la tyrosine située sur la première loupe flexible. Les mutants Y257F de Sc_Hsp104 et F254Y de Sp_Hsp104 pourraient ainsi constituer la base d'une étude de mutagenèse permettant de mieux définir l'importance de ces résidus dans les activités de leur chaperone respective. Il serait finalement intéressant d'évaluer la capacité de Sp_Hsp104 à propager les prions [*URE3*] et [*Het-s*] (chez *S. cerevisiae*) (voir section 1.7). Si on peut démontrer que Sp_Hsp104 est incapable d'interagir avec les fibres amyloïdes, cette protéine pourrait devenir un outil précieux pour comprendre ce qui permet à Sc_Hsp104 de lier et de solubiliser les fibres amyloïdes.

D'autre part, l'observation que la propagation de l'élément [*cif*] est indépendante de Sp_Hsp104, alors que Sp_Hsp104 est incapable de propager le prion [*PSI*⁺] chez *S. cerevisiae*, est intéressante d'un point de vue évolutif. Certains ont proposé que l'évolution de *S. cerevisiae* aurait permis à Sc_Hsp104 et aux prions de levure d'agir de concert pour en tirer un avantage dans certaines conditions (True et al. 2004). L'un des arguments en faveur de cette hypothèse est la sur-représentation chez la levure *S. cerevisiae* de protéines possédant un domaine riche en résidus glutamine et asparagine (polyQ/N), une caractéristique retrouvée chez les prions de levures [*PSI*⁺], [*PIN*⁺] et [*URE3*]. Ces mêmes études bioinformatiques montrent que chez la levure *S. pombe* très peu de protéines de type polyQ/N sont présentes (Harrison and Gerstein 2003; Harrison et al. 2007). Dans ces conditions, il n'est pas surprenant (d'un point de vu évolutif) de constater que Sp_Hsp104

n'est pas en mesure de propager le prion [*PSI*⁺] chez *S. cerevisiae*. Ceci n'exclut pas que l'élément [*cif*] puisse former des fibres amyloïdes et se transmettre en absence de domaine polyQ/N, à l'instar des prions PrP^{Sc} et [*Het-s*]. En supposant que l'élément [*cif*] forme des fibres amyloïdes, et puisque la propagation de [*cif*] est Sp_Hsp104-indépendante, il faudrait que les fibres de [*cif*] soient à la fois courtes et fragiles, de telle façon qu'elles ne requièrent pas l'action d'une désagrégase pour être transmises d'une cellule à l'autre. Un tel modèle a été proposé pour expliquer la transmission de certains mutants du prion [*PSI*⁺] chez *S. cerevisiae* (Liu et al. 2002; Crist et al. 2003). Nous ne pouvons toutefois pas exclure l'hypothèse que l'élément [*cif*] ne forme pas de fibres amyloïdes, mais est plutôt médié par un autre mécanisme épigénétique. Évidemment, l'identification des protéines impliquées dans le maintien de l'état Cin nous en apprendra beaucoup sur la nature de l'élément [*cif*]. Les différents criblages génétiques actuellement en cours au laboratoire nous permettront d'affiner nos connaissances à ce propos. Ainsi, l'étude de l'élément [*cif*] et des prions de levure approfondira notre compréhension des mécanismes sous-jacents aux maladies à prions ce qui permettra certainement de développer des thérapies efficaces contre ces maladies terribles.

Sc_Hsp104 est la seule protéine connue à ce jour comme étant capable de renverser la formation des fibres amyloïdes, ce qui en fait un outil thérapeutique intéressant (Chaudhuri and Paul 2006). Plusieurs l'ont compris et ont entrepris d'étudier l'interaction entre Sc_Hsp104 et diverses protéines amyloïdes pathologiques chez l'humain. Ainsi, deux groupes ont récemment mis au point des systèmes portant des protéines hybrides de Sup35p et de A β (impliquée dans la maladie d'Alzheimer, voir section 1.5.3). Ces études ont permis de montrer que Sc_Hsp104 est en mesure de lier et d'influencer l'aggrégation des peptides A β (Bagriantsev and Liebman 2006; von der Haar et al. 2007). Une étude effectuée *in vitro* montre aussi une interaction entre Sc_Hsp104 et la protéine α -synucléine (maladie de Parkinson, section 1.5.3) (Kong et al. 2005). L'impact de Sc_Hsp104 sur les protéines polyQ a aussi été étudié par plusieurs (Krobitsch and Lindquist 2000; Kimura et al. 2001). Déjà, d'autres travaux ont montré que la surexpression hétérologue de

Sc_Hsp104 chez une souris-modèle de la maladie de Huntington peut solubiliser les fibres amyloïdes (de type polyQ) retrouvées *in vivo*, ce qui permet de prolonger la vie de ces animaux (Vacher et al. 2005). Aussi, l'expression de Sc_Hsp104 dans des cellules humaines a montré que cette protéine n'est pas toxique et est capable d'interagir avec les chaperones et co-chaperones humaines pour augmenter leur capacité de résistance à la chaleur (Mosser et al. 2004). Une meilleure compréhension des mécanismes régissant l'interaction entre Sc_Hsp104 et les fibres amyloïdes permettrait de développer de nouvelles thérapies pour traiter des maladies amyloïdes tel que l'Alzheimer, la Chorée de Huntington et la maladie de Parkinson, des maladies mortelles et incurables.

4. Annexes

4.1 Étude du promoteur de *Sp_hsp104⁺* et de la réponse au stress chez *S. pombe*

Les mécanismes de régulation de l'expression de *Sp_hsp104⁺* ne sont pas connus. Notre étude a montré que l'expression de *Sp_hsp104⁺* est significativement augmentée suite à un choc thermique modéré (37°C). Comme l'expression de *Sp_hsp104⁺* est importante dans la réponse au stress de chaleur chez *S. pombe*, l'étude du promoteur de ce gène permettrait d'en apprendre davantage sur les mécanismes de réponse au stress chez *S. pombe* qui sont, pour la plupart, mal compris.

Chez *S. cerevisiae*, le promoteur du gène *Sc_HSP104* porte deux types d'éléments régulateurs : les STRE et les HSE. Il contient premièrement trois copies de l'élément STRE (« stress response element ») reconnu par les facteurs de transcription Msn2p et Msn4p (Martinez-Pastor et al. 1996). En condition normale, Msn2p et Msn4p ne lient pas le promoteur de *Sc_HSP104* parce qu'ils sont séquestrés dans le cytosol via leur phosphorylation par le complexe PKA (« protein kinase A »). Chez *S. cerevisiae*, PKA régule la réponse à plusieurs types de stress, incluant le stress thermique (Thevelein and de Winde 1999). Le second élément de réponse, un HSE (« heat-shock element »), est retrouvé en au moins deux copies sur le promoteur de *Sc_HSP104*, (Larson et al. 1988). L'élément HSE est reconnu par le facteur de transcription Hsf1p, qui est directement activé par la chaleur, mais qui peut aussi être activé par phosphorylation (Seppa et al. 2004; Voellmy 2004). Dans des conditions de stress thermique, l'expression de *Sc_HSP104* est ainsi synergiquement activée par les facteurs de transcription Msn2/4p et Hsf1p (Grably et al. 2002).

L'analyse du promoteur du gène *Sp_hsp104⁺* montre plusieurs éléments de transcription du type HSE. En revanche, on ne retrouve aucun motif STRE, ni aucun autre

motif connu. Quelques études ont déjà été consacrées au facteur de transcription Hsf1p chez *S. pombe*. Ces études ont montré que la protéine Hsf1p est activée par un stress thermique et est apparentée à ses homologues chez la drosophile, chez les humains et chez *S. cerevisiae* (Gallo et al. 1991; Gallo et al. 1993; Sakurai and Takemori 2007). L'induction de l'expression de *Sp_hsp104⁺* serait donc principalement (voire exclusivement) médiée par le facteur Hsf1p. Comme on en connaît peu sur le rôle joué par le facteur Hsf1p dans la réponse au stress chez *S. pombe*, il serait intéressant de mieux caractériser l'expression de *Sp_hsp104⁺* ainsi que le rôle joué par Hsf1p dans cette réponse au stress. Des mutants de Hsf1p ont montré que ce facteur de transcription est aussi activé par une forte concentration de cadmium, un métal lourd (Saltsman et al. 1999). Nos résultats préliminaires et une étude de l'expression des gènes de *S. pombe* en condition de stress montrent une forte induction de *Sp_hsp104⁺* suite à un choc thermique, ou en présence de fortes concentrations de cadmium (Chen et al. 2003). Ce groupe a également montré que le mécanisme d'induction de l'expression de *Sp_hsp104⁺* par le cadmium (mais pas par choc thermique) est dépendant de Sty1p, une kinase très importante dans la réponse au stress chez *S. pombe* (Toone and Jones 1998). Comme le promoteur de *Sp_hsp104⁺* ne présente aucun motif pouvant être reconnu par un facteur de transcription associé à la kinase Sty1p, on peut penser que celle-ci active Hsf1p par phosphorylation en réponse au stress de cadmium. Cette hypothèse pourrait aisément être testée au laboratoire, puisque nous disposons déjà d'une souche $\Delta sty1$ et que nous pouvons mesurer par immunobuvardage l'induction de *Sp_hsp104⁺* par le cadmium. Un inhibiteur spécifique de la fonction kinase de Sty1p a aussi récemment été découvert (Kim et al. 2006). La construction de mutants de Hsf1p et des éléments HSE du promoteur de *Sp_hsp104⁺* pourrait finalement permettre de mieux caractériser ce promoteur à la fois simple et puissant. Puisque le promoteur de *Sp_hsp104⁺* semble uniquement régulé par le facteur Hsf1p et que l'induction de la transcription par ce facteur est mal caractérisée chez *S. pombe*, le promoteur de *Sp_hsp104⁺* est un outil de choix pour mieux caractériser ce facteur de réponse au stress chez cette levure. Il serait aussi possible d'utiliser le promoteur de *Sp_hsp104⁺* pour construire de nouveaux vecteurs d'expression inductibles, qui font défaut

chez *S. pombe*. Des vecteurs semblables utilisant la région promotrice du gène *hsp16⁺* (fortement inductible, mais peu caractérisée) de *S. pombe* ont d'ailleurs récemment été construits (Fujita et al. 2006).

4.2 Élaboration de nouveaux systèmes plus performants pour détecter l'état Cin

Chez *S. cerevisiae*, l'utilisation de certaines mutations génétiques permet de détecter facilement la présence du prion [*PSI⁺*] (Fig 1.9). Par contre, la présence de l'élément [*cif*] est plus difficile à détecter. Jusqu'ici, la seule méthode de détection disponible est basée sur l'essai de ségrégation plasmidique (Collin et al. 2004). Brièvement, cette méthode consiste à utiliser des cellules qui portent une mutation dans un gène impliqué dans la biosynthèse de divers métabolites et des vecteurs portant un gène complétant cette mutation. Dans le cas du vecteur pREP41, les cellules utilisées portent une mutation dans un gène de la biosynthèse de la leucine et ne peuvent survivre qu'en présence de leucine dans leur milieu de croissance. Par contre, le gène *LEU2* présent sur le vecteur pREP41 rétablit le métabolisme de biosynthèse de la leucine et permet la croissance des cellules sur milieu sans apport de leucine. Pour détecter l'élément [*cif*], nous utilisons des cellules portant la délétion $\Delta cnx1$ et un plasmide pREP41-*cnx1⁺*. Les cellules $\Delta cnx1$ capables de survivre en absence de pREP41-*cnx1⁺* sont dites Cin (calnexine-indépendantes) et les autres sont nommées Cdn (calnexine-dépendantes) (Collin et al. 2004). La présence de l'état Cin est donc révélée grâce au marqueur de sélection *LEU2* présent sur le vecteur pREP41 (Maundrell 1993). Comme les cellules Cin meurent durant cette sélection, nous devons cultiver nos cellules en milieux non-sélectif (avec un apport de leucine) puis repiquer chaque colonie sur un milieu de culture solide sélectif (sans leucine) et sur un milieu non-sélectif de manière à pouvoir mesurer un rapport entre le taux de cellules Cin et le taux de cellules Cdn obtenu. Cette méthode est laborieuse et comporte des risques d'erreurs. Au cours de ma maîtrise, j'ai travaillé à l'élaboration de deux nouveaux systèmes de détection

de l'état Cin. Je présente donc ici la stratégie utilisée pour chaque système et le compte rendu de mes résultats préliminaires.

La stratégie du premier système est semblable au système de détection génétique de [*PSI*⁺] (Fig 1.9). L'idée est de développer une souche accumulant un pigment rouge uniquement en présence du plasmide encodant la calnexine. Les cellules Cin seront facilement identifiables par leur coloration blanche. Ce mode de détection par la coloration des cellules requiert la présence de mutations sur deux gènes de la voie de biosynthèse des purines (Moser et al. 1995). La première mutation, l'allèle *ade6M210*, affecte le gène *ade6*⁺ et cause l'accumulation d'un produit dans la voie de synthèse des purines. Ce produit forme un pigment rouge qui s'accumule dans les cellules lorsqu'elles poussent en milieu pauvre en adénine. La seconde mutation (l'allèle *ade1-D25*) inactive le gène *ade1*⁺, un gène situé en amont de *ade6*⁺ dans la voie de biosynthèse des purines. Ainsi, les cellules portant la mutation *ade6M210* accumulent un pigment leur donnant une coloration rouge, tandis que les cellules portant les mutations *ade1-D25*, *ade6M210* restent blanches. J'ai donc construit, par différents croisements génétiques, une souche portant les allèles *ade1-D25* et *ade6M210*, une délétion du gène *cnx1*⁺ et des mutation permettant l'utilisation des vecteurs pREP41 (sélection avec la leucine) et pREP42 (sélection avec l'uracile). Cette souche se nomme SP12032 et produit des colonies blanches. Puisque cette souche est Cdn, elle nécessite aussi une copie plasmidique du gène *cnx1*⁺ pour survivre et possède donc le plasmide pREP41-*cnx1*⁺. Le second élément du système de détection est un plasmide encodant à la fois les gènes *cnx1*⁺ et *ade1*⁺. Ce plasmide fut construit en sous-clonant le marqueur *ade1*⁺ (contenant la séquence codante avec son promoteur endogène) dans le vecteur pREP42-*cnx1*⁺. Le plasmide obtenu, pREP42-*cnx1*⁺-*ade1*⁺, a ensuite été transformé chez la souche SP12032. Comme le gène *ade1*⁺ peut remplacer la mutation génomique *ade1-D25*, les cellules adoptent une coloration rouge si on les fait croître sur un milieu faible en adénine. Pour être utile, il ne restait donc qu'à terminer l'échange des plasmides de manière à éliminer le plasmide pREP41-*cnx1*⁺, toujours contenu dans nos cellules. Malheureusement, malgré de nombreuses tentatives, je n'ai jamais réussi à isoler des cellules ayant perdu le plasmide pREP41-*cnx1*⁺. La raison de cet échec est inconnue,

mais il est vraisemblable qu'il soit causé par une mutation génétique spontanée affectant la sélection de ce plasmide. Ce système aurait plusieurs avantages. Entre autre, ce système serait plus rapide et permettrait d'identifier les cellules Cin et les cellules Cdn sans effectuer de sélection tuant les cellules. Par contre, ce système comporte certains inconvénients. Par exemple, l'étude de l'impact de la délétion ΔSp_hsp104 sur le phénomène Cin nécessiterait de refaire cette délétion dans notre système de détection *ade1-D25*, *ade6M210*.

J'ai donc élaboré un autre système de détection qui est compatible avec les souches *Acnx1* couramment utilisées au laboratoire et qui est plus efficace et plus précis. J'ai donc utilisé la technologie de cytométrie de flux, communément connu sous le nom de FACS®. Pour ce faire, il faut construire un vecteur exprimant à la fois la calnexine et une protéine fluorescente. Quelques test préliminaires m'ont montré qu'une forte expression de la protéine fluorescente EGFP venus (Nagai et al. 2002) permet de discerner avec certitude (100 %) les cellules fluorescentes des cellules n'exprimant aucune fluorescence par cytométrie de flux. J'ai donc cloné le gène encodant la EGFP dans le vecteur pREP1, sous le contrôle du promoteur fort *nmt1* (Basi et al. 1993; Maundrell 1993). J'ai ensuite cloné le gène *cnx1*⁺ sous le contrôle du promoteur *adh* (*Padh*) présent sur le vecteur pLEV3 (un don du Dr Charles Hoffman). Le fragment *Padh-cnx1*⁺ a ensuite été extrait et sous-cloné dans le plasmide pREP1-EGFP (hors du site de polyclonage). Le plasmide obtenu (nommé pVEN1-*cnx1*⁺) a été transformé chez des cellules *Acnx1*. Tel qu'attendu, le changement de promoteur contrôlant l'expression de *cnx1*⁺ n'affecte pas la survie des cellules. Aussi, des expériences contrôles ont montré que ce plasmide n'induit pas l'état Cin de manière spontanée. Comme ce système permet de détecter les cellules Cin par leur capacité à perdre le plasmide encodant à la fois la calnexine et la EGFP, nous devons être en mesure de distinguer les cellules Cin, qui ne sont plus fluorescentes, des cellules mortes. Pour ce faire, nous effectuons un second marquage à l'aide d'un colorant vital, l'iodure de propidium, qui s'accumule seulement dans les cellules mortes. Nos essais préliminaires confirment que nous sommes en mesure de distinguer les cellules mortes des cellules

vivantes n'exprimant pas de protéine fluorescente par cytométrie de flux. À l'aide de ce double marquage, ce système devrait nous permettre de mesurer la présence du plasmide pVEN1-*cnxI*⁺ et donc de détecter l'état Cin. Les essais préliminaires effectués avec des cellules Cdn ont permis d'identifier des clones présentant une fluorescence forte, stable et bien définie. Nous avons aussi mesuré la fluorescence d'une souche Cin transformée avec pVEN1-*cnxI*⁺. Tel qu'attendu, les cellules Cin + pVEN1-*cnxI*⁺ demeurent fluorescentes si elles poussent en milieu sélectif. En milieu non-sélectif par contre, les cellules Cin perdent progressivement leur fluorescence associée au plasmide pVEN1-*cnxI*⁺, confirmant que ces cellules sont en mesure de survivre sans calnexine plasmidique. Ce résultat prometteur montre que ce système de détection permettrait de suivre *in vivo* la perte du plasmide pVEN1-*cnxI*⁺ et par conséquent, permettrait de mesurer avec précision l'état Cin chez les cellules. Après 6 jours de croissance en milieu non-sélectif, l'analyse de la fluorescence des cellules en culture a montré que 98 % des cellules avaient perdu le plasmide pVEN1-*cnxI*⁺. Par contre, un essai de ségrégation plasmidique classique utilisant le marqueur de sélection *LEU2* du plasmide pVEN1-*cnxI*⁺ fait à partir des mêmes cultures a détecté un taux de perte du plasmide de 48 %. La raison de cette différence est inconnue. On peut penser que la méthode de détection de l'état Cin y joue un rôle : l'unité de base des cultures fluorescentes est la cellule tandis que c'est la colonie (ou encore « l'unité formant une colonie », CFU) dans la méthode classique de ségrégation plasmidique. Or, pour diverses raisons, il est possible qu'une partie des cellules en culture liquide ne forme pas de colonies. Aussi, comme la méthode par cytométrie à fluorescence est plus précise (puisque chaque cellule est évaluée), il est possible que toutes les cellules Cin en culture ne forment pas de colonies pouvant être détectées par la méthode classique de ségrégation plasmidique. Cette hypothèse est supportée par le fait que les cellules Cin poussent plus lentement que les cellules Cdn (Collin et al. 2004). Il faudrait donc refaire de nombreuses expériences pour pouvoir valider la méthode par cytométrie à fluorescence. Par exemple il faudrait évaluer la capacité des cellules Cdn + pVEN1-*cnxI*⁺ à acquérir l'état Cin. Ce système de détection de l'état Cin est très prometteur et devra être optimisé pour pouvoir être utilisé couramment dans l'avenir.

Bibliographie

- Abbas-Terki, T., Donze, O., Briand, P.A., and Picard, D. 2001. Hsp104 interacts with Hsp90 cochaperones in respiring yeast. *Molecular and cellular biology* **21**: 7569-7575.
- Agarwal, M., Sahi, C., Katiyar-Agarwal, S., Agarwal, S., Young, T., Gallie, D.R., Sharma, V.M., Ganesan, K., and Grover, A. 2003. Molecular characterization of rice hsp101: complementation of yeast hsp104 mutation by disaggregation of protein granules and differential expression in indica and japonica rice types. *Plant molecular biology* **51**: 543-553.
- Aguzzi, A., Heikenwalder, M., and Polymenidou, M. 2007. Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nature reviews* **8**: 552-561.
- Aigle, M., and Lacroute, F. 1975. Genetical aspects of [URE3], a non-mitochondrial, cytoplasmically inherited mutation in yeast. *Mol Gen Genet* **136**: 327-335.
- Aksenova, A., Munoz, I., Volkov, K., Arino, J., and Mironova, L. 2007. The HAL3-PPZ1 dependent regulation of nonsense suppression efficiency in yeast and its influence on manifestation of the yeast prion-like determinant [ISP(+)]. *Genes Cells* **12**: 435-445.
- Albanese, V., Yam, A.Y., Baughman, J., Parnot, C., and Frydman, J. 2006. Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells. *Cell* **124**: 75-88.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* **25**: 3389-3402.

- Anfinsen, C.B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science (New York, N.Y)* **181**: 223-230.
- Angers, R.C., Browning, S.R., Seward, T.S., Sigurdson, C.J., Miller, M.W., Hoover, E.A., and Telling, G.C. 2006. Prions in skeletal muscles of deer with chronic wasting disease. *Science (New York, N.Y)* **311**: 1117.
- Aron, R., Higurashi, T., Sahi, C., and Craig, E.A. 2007. J-protein co-chaperone Sis1 required for generation of [RNQ+] seeds necessary for prion propagation. *The EMBO journal* **26**: 3794-3803.
- Bach, S., Talarek, N., Andrieu, T., Vierfond, J.M., Mettey, Y., Galons, H., Dormont, D., Meijer, L., Cullin, C., and Blondel, M. 2003. Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. *Nature biotechnology* **21**: 1075-1081.
- Baglioni, S., Casamenti, F., Bucciantini, M., Luhesi, L.M., Taddei, N., Chiti, F., Dobson, C.M., and Stefani, M. 2006. Prefibrillar amyloid aggregates could be generic toxins in higher organisms. *J Neurosci* **26**: 8160-8167.
- Bagriantsev, S., and Liebman, S. 2006. Modulation of Abeta42 low-n oligomerization using a novel yeast reporter system. *BMC biology* **4**: 32.
- Bagriantsev, S., and Liebman, S.W. 2004. Specificity of prion assembly in vivo. [PSI+] and [PIN+] form separate structures in yeast. *The Journal of biological chemistry* **279**: 51042-51048.
- Bahler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast (Chichester, England)* **14**: 943-951.

- Balguerie, A., Dos Reis, S., Couлары-Salin, B., Chaignepain, S., Sabourin, M., Schmitter, J.M., and Saupe, S.J. 2004. The sequences appended to the amyloid core region of the HET-s prion protein determine higher-order aggregate organization in vivo. *Journal of cell science* **117**: 2599-2610.
- Balguerie, A., Dos Reis, S., Ritter, C., Chaignepain, S., Couлары-Salin, B., Forge, V., Bathany, K., Lascu, I., Schmitter, J.M., Riek, R., et al. 2003. Domain organization and structure-function relationship of the HET-s prion protein of *Podospora anserina*. *The EMBO journal* **22**: 2071-2081.
- Barnett, M.E., Nagy, M., Kedzierska, S., and Zolkiewski, M. 2005. The amino-terminal domain of ClpB supports binding to strongly aggregated proteins. *The Journal of biological chemistry* **280**: 34940-34945.
- Basi, G., Schmid, E., and Maundrell, K. 1993. TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* nmt1 promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene* **123**: 131-136.
- Baskakov, I.V. 2007. The reconstitution of mammalian prion infectivity de novo. *The FEBS journal* **274**: 576-587.
- Beaulieu, H., Elagoz, A., Crine, P., and Rokeach, L.A. 1999. Interaction of mammalian neprilysin with binding protein and calnexin in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Biochemical journal* **340 (Pt 3)**: 813-819.
- Beekes, M., and McBride, P.A. 2007. The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies. *The FEBS journal* **274**: 588-605.
- Beinker, P., Schlee, S., Groemping, Y., Seidel, R., and Reinstein, J. 2002. The N terminus of ClpB from *Thermus thermophilus* is not essential for the chaperone activity. *The Journal of biological chemistry* **277**: 47160-47166.

- Ben-Zvi, A., De Los Rios, P., Dietler, G., and Goloubinoff, P. 2004. Active solubilization and refolding of stable protein aggregates by cooperative unfolding action of individual hsp70 chaperones. *The Journal of biological chemistry* **279**: 37298-37303.
- Benkemoun, L., and Saupe, S.J. 2006. Prion proteins as genetic material in fungi. *Fungal Genet Biol* **43**: 789-803.
- Bieler, S., Estrada, L., Lagos, R., Baeza, M., Castilla, J., and Soto, C. 2005. Amyloid formation modulates the biological activity of a bacterial protein. *The Journal of biological chemistry* **280**: 26880-26885.
- Borchsenius, A.S., Muller, S., Newnam, G.P., Inge-Vechtomov, S.G., and Chernoff, Y.O. 2006. Prion variant maintained only at high levels of the Hsp104 disaggregase. *Current genetics* **49**: 21-29.
- Bosl, B., Grimminger, V., and Walter, S. 2005. Substrate binding to the molecular chaperone Hsp104 and its regulation by nucleotides. *The Journal of biological chemistry* **280**: 38170-38176.
- Bosl, B., Grimminger, V., and Walter, S. 2006. The molecular chaperone Hsp104--a molecular machine for protein disaggregation. *Journal of structural biology* **156**: 139-148.
- Brachmann, A., Baxa, U., and Wickner, R.B. 2005. Prion generation in vitro: amyloid of Ure2p is infectious. *The EMBO journal* **24**: 3082-3092.
- Bradbury, J. 2003. Chaperones: keeping a close eye on protein folding. *Lancet* **361**: 1194-1195.
- 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.

- Bradley, M.E., and Liebman, S.W. 2003. Destabilizing interactions among [PSI(+)] and [PIN(+)] yeast prion variants. *Genetics* **165**: 1675-1685.
- Bucciantini, M., Calloni, G., Chiti, F., Formigli, L., Nosi, D., Dobson, C.M., and Stefani, M. 2004. Prefibrillar amyloid protein aggregates share common features of cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry* **279**: 31374-31382.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C.M., and Stefani, M. 2002. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* **416**: 507-511.
- Bukau, B., Weissman, J., and Horwich, A. 2006. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* **125**: 443-451.
- Burke, J.D., and Gould, K.L. 1994. Molecular cloning and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* his3 gene for use as a selectable marker. *Mol Gen Genet* **242**: 169-176.
- Byrne, L.J., Cox, B.S., Cole, D.J., Ridout, M.S., Morgan, B.J., and Tuite, M.F. 2007. Cell division is essential for elimination of the yeast [PSI+] prion by guanidine hydrochloride. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 11688-11693.
- Caplan, A.J., Mandal, A.K., and Theodoraki, M.A. 2007. Molecular chaperones and protein kinase quality control. *Trends in cell biology* **17**: 87-92.
- Carulla, N., Caddy, G.L., Hall, D.R., Zurdo, J., Gairi, M., Feliz, M., Giralt, E., Robinson, C.V., and Dobson, C.M. 2005. Molecular recycling within amyloid fibrils. *Nature* **436**: 554-558.
- Cashikar, A.G., Schirmer, E.C., Hattendorf, D.A., Glover, J.R., Ramakrishnan, M.S., Ware, D.M., and Lindquist, S.L. 2002. Defining a pathway of communication from the C-

terminal peptide binding domain to the N-terminal ATPase domain in a AAA protein. *Molecular cell* **9**: 751-760.

Castilla, J., Saa, P., Hetz, C., and Soto, C. 2005. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* **121**: 195-206.

Caughey, B., and Baron, G.S. 2006. Prions and their partners in crime. *Nature* **443**: 803-810.

Cecarini, V., Gee, J., Fioretti, E., Amici, M., Angeletti, M., Eleuteri, A.M., and Keller, J.N. 2007. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 93-104.

Chaudhuri, T.K., and Paul, S. 2006. Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *The FEBS journal* **273**: 1331-1349.

Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and Bahler, J. 2003. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Molecular biology of the cell* **14**: 214-229.

Chernoff, Y.O. 2007. Stress and prions: Lessons from the yeast model. *FEBS letters*.

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* **268**: 880-884.

Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., LaCasse, R., Raymond, L., Favara, C., Baron, G., Priola, S., et al. 2005. Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science (New York, N.Y)* **308**: 1435-1439.

Chien, P., Weissman, J.S., and DePace, A.H. 2004. Emerging principles of conformation-based prion inheritance. *Annual review of biochemistry* **73**: 617-656.

- Chiti, F., and Dobson, C.M. 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual review of biochemistry* **75**: 333-366.
- Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G., and Dobson, C.M. 1999. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 3590-3594.
- Chow, I.T., Barnett, M.E., Zolkiewski, M., and Baneyx, F. 2005. The N-terminal domain of Escherichia coli ClpB enhances chaperone function. *FEBS letters* **579**: 4242-4248.
- Collin, P., Beauregard, P.B., Elagoz, A., and Rokeach, L.A. 2004. A non-chromosomal factor allows viability of Schizosaccharomyces pombe lacking the essential chaperone calnexin. *Journal of cell science* **117**: 907-918.
- Coustou-Linares, V., Maddelein, M.L., Begueret, J., and Saupe, S.J. 2001. In vivo aggregation of the HET-s prion protein of the fungus Podospora anserina. *Molecular microbiology* **42**: 1325-1335.
- 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., Ness, F., and Tuite, M. 2003. Analysis of the generation and segregation of propagons: entities that propagate the [PSI⁺] prion in yeast. *Genetics* **165**: 23-33.
- Crist, C.G., Nakayashiki, T., Kurahashi, H., and Nakamura, Y. 2003. [PHI⁺], a novel Sup35-prion variant propagated with non-Gln/Asn oligopeptide repeats in the absence of the chaperone protein Hsp104. *Genes Cells* **8**: 603-618.
- De Virgilio, C., Simmen, U., Hottiger, T., Boller, T., and Wiemken, A. 1990. Heat shock induces enzymes of trehalose metabolism, trehalose accumulation, and

thermotolerance in *Schizosaccharomyces pombe*, even in the presence of cycloheximide. *FEBS letters* **273**: 107-110.

- Deleault, N.R., Harris, B.T., Rees, J.R., and Supattapone, S. 2007. From the Cover: Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 9741-9746.
- 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., Uptain, S.M., Outeiro, T.F., Krishnan, R., Lindquist, S.L., and Liebman, S.W. 2004. Effects of Q/N-rich, polyQ, and non-polyQ amyloids on the de novo formation of the [PSI+] prion in yeast and aggregation of Sup35 in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 12934-12939.
- Diamant, S., Ben-Zvi, A.P., Bukau, B., and Goloubinoff, P. 2000. Size-dependent disaggregation of stable protein aggregates by the DnaK chaperone machinery. *The Journal of biological chemistry* **275**: 21107-21113.
- Diaz-Avalos, R., King, C.Y., Wall, J., Simon, M., and Caspar, D.L. 2005. Strain-specific morphologies of yeast prion amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 10165-10170.

- Dobson, C.M. 1999. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends in biochemical sciences* **24**: 329-332.
- Dobson, C.M. 2003. Protein folding and misfolding. *Nature* **426**: 884-890.
- Dobson, C.M. 2004. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Seminars in cell & developmental biology* **15**: 3-16.
- Dos Reis, S., Couлары-Salin, B., Forge, V., Lascu, I., Begueret, J., and Saupe, S.J. 2002. The HET-s prion protein of the filamentous fungus *Podospora anserina* aggregates in vitro into amyloid-like fibrils. *The Journal of biological chemistry* **277**: 5703-5706.
- Doyle, S.M., Hoskins, J.R., and Wickner, S. 2007a. Inaugural Article: Collaboration between the ClpB AAA+ remodeling protein and the DnaK chaperone system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 11138-11144.
- Doyle, S.M., Shorter, J., Zolkiewski, M., Hoskins, J.R., Lindquist, S., and Wickner, S. 2007b. Asymmetric deceleration of ClpB or Hsp104 ATPase activity unleashes protein-remodeling activity. *Nature structural & molecular biology* **14**: 114-122.
- Eaglestone, S.S., Ruddock, L.W., Cox, B.S., and Tuite, M.F. 2000. Guanidine hydrochloride blocks a critical step in the propagation of the prion-like determinant [PSI(+)] of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 240-244.
- Elagoz, A., Callejo, M., Armstrong, J., and Rokeach, L.A. 1999. Although calnexin is essential in *S. pombe*, its highly conserved central domain is dispensable for viability. *Journal of cell science* **112** (Pt 23): 4449-4460.
- Elble, R. 1992. A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *BioTechniques* **13**: 18-20.

- Elghetany, M.T., and Saleem, A. 1988. Methods for staining amyloid in tissues: a review. *Stain technology* **63**: 201-212.
- Ellgaard, L., and Helenius, A. 2001. ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Current opinion in cell biology* **13**: 431-437.
- Elliott, B., Haltiwanger, R.S., and Futcher, B. 1996. Synergy between trehalose and Hsp104 for thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **144**: 923-933.
- Ellis, R.J., and Minton, A.P. 2006. Protein aggregation in crowded environments. *Biological chemistry* **387**: 485-497.
- Erbse, A., Mayer, M.P., and Bukau, B. 2004. Mechanism of substrate recognition by Hsp70 chaperones. *Biochemical Society transactions* **32**: 617-621.
- Fandrich, M., and Dobson, C.M. 2002. The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *The EMBO journal* **21**: 5682-5690.
- Fandrich, M., Fletcher, M.A., and Dobson, C.M. 2001. Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature* **410**: 165-166.
- Ferreira, P.C., Ness, F., Edwards, S.R., Cox, B.S., and Tuite, M.F. 2001. The elimination of the yeast [PSI⁺] prion by guanidine hydrochloride is the result of Hsp104 inactivation. *Molecular microbiology* **40**: 1357-1369.
- Flechsig, E., Hegyi, I., Enari, M., Schwarz, P., Collinge, J., and Weissmann, C. 2001. Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* **7**: 679-684.
- Fowler, D.M., Koulov, A.V., Alory-Jost, C., Marks, M.S., Balch, W.E., and Kelly, J.W. 2006. Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS biology* **4**: e6.

- Fowler, D.M., Koulov, A.V., Balch, W.E., and Kelly, J.W. 2007. Functional amyloid - from bacteria to humans. *Trends in biochemical sciences* **32**: 217-224.
- Frydman, J. 2001. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annual review of biochemistry* **70**: 603-647.
- Fujita, Y., Tohda, H., Giga-Hama, Y., and Takegawa, K. 2006. Heat shock-inducible expression vectors for use in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS yeast research* **6**: 883-887.
- Gallo, G.J., Prentice, H., and Kingston, R.E. 1993. Heat shock factor is required for growth at normal temperatures in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and cellular biology* **13**: 749-761.
- Gallo, G.J., Schuetz, T.J., and Kingston, R.E. 1991. Regulation of heat shock factor in *Schizosaccharomyces pombe* more closely resembles regulation in mammals than in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **11**: 281-288.
- Gebbink, M.F., Claessen, D., Bouma, B., Dijkhuizen, L., and Wosten, H.A. 2005. Amyloids--a functional coat for microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **3**: 333-341.
- Geny, B., and Popoff, M.R. 2006. Bacterial protein toxins and lipids: role in toxin targeting and activity. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **98**: 633-651.
- Geourjon, C., and Deleage, G. 1995. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci* **11**: 681-684.
- Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L.M., and Anderson, P. 2004. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Molecular biology of the cell* **15**: 5383-5398.

- Glabe, C.G. 2006. Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiology of aging* **27**: 570-575.
- Glabe, C.G., and Kaye, R. 2006. Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis. *Neurology* **66**: S74-78.
- Glover, J.R., and Lindquist, S. 1998. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**: 73-82.
- Godec, M.S., Asher, D.M., Kozachuk, W.E., Masters, C.L., Rubi, J.U., Payne, J.A., Rubi-Villa, D.J., Wagner, E.E., Rapoport, S.I., and Schapiro, M.B. 1994. Blood buffy coat from Alzheimer's disease patients and their relatives does not transmit spongiform encephalopathy to hamsters. *Neurology* **44**: 1111-1115.
- Goldberg, A.L. 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**: 895-899.
- Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T., and Bukau, B. 1999. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 13732-13737.
- Gomez-Puertas, P., Martin-Benito, J., Carrascosa, J.L., Willison, K.R., and Valpuesta, J.M. 2004. The substrate recognition mechanisms in chaperonins. *J Mol Recognit* **17**: 85-94.
- Goudsmit, J., Morrow, C.H., Asher, D.M., Yanagihara, R.T., Masters, C.L., Gibbs, C.J., Jr., and Gajdusek, D.C. 1980. Evidence for and against the transmissibility of Alzheimer disease. *Neurology* **30**: 945-950.
- Grably, M.R., Stanhill, A., Tell, O., and Engelberg, D. 2002. HSF and Msn2/4p can exclusively or cooperatively activate the yeast HSP104 gene. *Molecular microbiology* **44**: 21-35.

- Gregersen, N. 2006. Protein misfolding disorders: pathogenesis and intervention. *Journal of inherited metabolic disease* **29**: 456-470.
- Gregersen, N., Bross, P., Vang, S., and Christensen, J.H. 2006. Protein Misfolding and Human Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**: 103-124.
- Grimminger, V., Richter, K., Imhof, A., Buchner, J., and Walter, S. 2004. The prion curing agent guanidinium chloride specifically inhibits ATP hydrolysis by Hsp104. *The Journal of biological chemistry* **279**: 7378-7383.
- Haass, C., and Selkoe, D.J. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature reviews* **8**: 101-112.
- Hajjar, F., Beauregard, P.B., and Rokeach, L.A. 2007. The 160 N-terminal residues of calnexin define a novel region supporting viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast (Chichester, England)* **24**: 89-103.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**: 557-580.
- Hanson, P.I., and Whiteheart, S.W. 2005. AAA+ proteins: have engine, will work. *Nature reviews* **6**: 519-529.
- Hardesty, B., and Kramer, G. 2001. Folding of a nascent peptide on the ribosome. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **66**: 41-66.
- Harper, J.D., and Lansbury, P.T., Jr. 1997. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annual review of biochemistry* **66**: 385-407.
- Harris, D.A., and True, H.L. 2006. New insights into prion structure and toxicity. *Neuron* **50**: 353-357.

- Harrison, L.B., Yu, Z., Stajich, J.E., Dietrich, F.S., and Harrison, P.M. 2007. Evolution of budding yeast prion-determinant sequences across diverse fungi. *Journal of molecular biology* **368**: 273-282.
- Harrison, P.M., and Gerstein, M. 2003. A method to assess compositional bias in biological sequences and its application to prion-like glutamine/asparagine-rich domains in eukaryotic proteomes. *Genome biology* **4**: R40.
- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurtner, D., and Buchner, J. 2005. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nature structural & molecular biology* **12**: 842-846.
- Haslberger, T., Weibezahn, J., Zahn, R., Lee, S., Tsai, F.T., Bukau, B., and Mogk, A. 2007. M domains couple the ClpB threading motor with the DnaK chaperone activity. *Molecular cell* **25**: 247-260.
- Hattendorf, D.A., and Lindquist, S.L. 2002. Cooperative kinetics of both Hsp104 ATPase domains and interdomain communication revealed by AAA sensor-1 mutants. *The EMBO journal* **21**: 12-21.
- Hennessy, F., Nicoll, W.S., Zimmermann, R., Cheetham, M.E., and Blatch, G.L. 2005. Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. *Protein Sci* **14**: 1697-1709.
- Hinnerwisch, J., Fenton, W.A., Furtak, K.J., Farr, G.W., and Horwich, A.L. 2005. Loops in the central channel of ClpA chaperone mediate protein binding, unfolding, and translocation. *Cell* **121**: 1029-1041.
- Houry, W.A. 2001. Chaperone-assisted protein folding in the cell cytoplasm. *Current protein & peptide science* **2**: 227-244.

- Hubel, A., Brandau, S., Dresel, A., and Clos, J. 1995. A member of the ClpB family of stress proteins is expressed during heat shock in *Leishmania* spp. *Molecular and biochemical parasitology* **70**: 107-118.
- Hung, G.C., and Masison, D.C. 2006. N-terminal domain of yeast Hsp104 chaperone is dispensable for thermotolerance and prion propagation but necessary for curing prions by Hsp104 overexpression. *Genetics* **173**: 611-620.
- Iconomidou, V.A., Vriend, G., and Hamodrakas, S.J. 2000. Amyloids protect the silkworm oocyte and embryo. *FEBS letters* **479**: 141-145.
- Inge-Vechtormov, S., Zhouravleva, G., and Philippe, M. 2003. Eukaryotic release factors (eRFs) history. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **95**: 195-209.
- Inoue, Y., Taguchi, H., Kishimoto, A., and Yoshida, M. 2004. Hsp104 binds to yeast Sup35 prion fiber but needs other factor(s) to sever it. *The Journal of biological chemistry* **279**: 52319-52323.
- Ishikawa, T., Maurizi, M.R., and Steven, A.C. 2004. The N-terminal substrate-binding domain of ClpA unfoldase is highly mobile and extends axially from the distal surface of ClpAP protease. *Journal of structural biology* **146**: 180-188.
- Iwahashi, H., Nwaka, S., Obuchi, K., and Komatsu, Y. 1998. Evidence for the interplay between trehalose metabolism and Hsp104 in yeast. *Applied and environmental microbiology* **64**: 4614-4617.
- Jannatipour, M., Callejo, M., Parodi, A.J., Armstrong, J., and Rokeach, L.A. 1998. Calnexin and BiP interact with acid phosphatase independently of glucose trimming and reglucosylation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemistry* **37**: 17253-17261.

- Jannatipour, M., and Rokeach, L.A. 1995. The Schizosaccharomyces pombe homologue of the chaperone calnexin is essential for viability. *The Journal of biological chemistry* **270**: 4845-4853.
- Jimenez, J.L., Gujjarro, J.I., Orlova, E., Zurdo, J., Dobson, C.M., Sunde, M., and Saibil, H.R. 1999. Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *The EMBO journal* **18**: 815-821.
- Jones, G., Song, Y., Chung, S., and Masison, D.C. 2004. Propagation of Saccharomyces cerevisiae [PSI+] prion is impaired by factors that regulate Hsp70 substrate binding. *Molecular and cellular biology* **24**: 3928-3937.
- Jones, G.W., and Tuite, M.F. 2005. Chaperoning prions: the cellular machinery for propagating an infectious protein? *Bioessays* **27**: 823-832.
- Jung, G., Jones, G., and Masison, D.C. 2002. Amino acid residue 184 of yeast Hsp104 chaperone is critical for prion-curing by guanidine, prion propagation, and thermotolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 9936-9941.
- Kelly, J.W. 1998. The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Current opinion in structural biology* **8**: 101-106.
- Kennaway, C.K., Benesch, J.L., Gohlke, U., Wang, L., Robinson, C.V., Orlova, E.V., Saibil, H.R., and Keep, N.H. 2005. Dodecameric structure of the small heat shock protein AcrI from Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of biological chemistry* **280**: 33419-33425.
- Khurana, R., Coleman, C., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S.A., Krishna, V., Grover, R.K., Roy, R., and Singh, S. 2005. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of structural biology* **151**: 229-238.

- Kicka, S., Bonnet, C., Sobering, A.K., Ganesan, L.P., and Silar, P. 2006. A mitotically inheritable unit containing a MAP kinase module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 13445-13450.
- Kim, H.J., Park, J.E., Jin, S., Kim, J.H., and Song, K. 2006. An isoquinolinium derivative selectively inhibits MAPK Spc1 of the stress-activated MAPK cascade of *Schizosaccharomyces pombe*. *Chemistry & biology* **13**: 881-889.
- Kim, K.K., Kim, R., and Kim, S.H. 1998. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* **394**: 595-599.
- Kim, S., Jeon, T.J., Oberai, A., Yang, D., Schmidt, J.J., and Bowie, J.U. 2005. Transmembrane glycine zippers: physiological and pathological roles in membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 14278-14283.
- Kimura, Y., Koitabashi, S., Kakizuka, A., and Fujita, T. 2001. Initial process of polyglutamine aggregate formation in vivo. *Genes Cells* **6**: 887-897.
- King, C.Y., and Diaz-Avalos, R. 2004. Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature* **428**: 319-323.
- Kiseleva, E.V. 1989. Secretory protein synthesis in *Chironomus* salivary gland cells is not coupled with protein translocation across endoplasmic reticulum membranes. Electron microscopic evidence. *FEBS letters* **257**: 251-253.
- Kleizen, B., and Braakman, I. 2004. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Current opinion in cell biology* **16**: 343-349.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. 1999. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast (Chichester, England)* **15**: 963-972.

- Kocisko, D.A., Come, J.H., Priola, S.A., Chesebro, B., Raymond, G.J., Lansbury, P.T., and Caughey, B. 1994. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* **370**: 471-474.
- Kocisko, D.A., Priola, S.A., Raymond, G.J., Chesebro, B., Lansbury, P.T., Jr., and Caughey, B. 1995. Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 3923-3927.
- Kong, B., Chae, Y., and Lee, K. 2005. Degradation of wild-type alpha-synuclein by a molecular chaperone leads to reduced aggregate formation. *Cell biochemistry and function* **23**: 125-132.
- Kostova, Z., and Wolf, D.H. 2003. For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *The EMBO journal* **22**: 2309-2317.
- Kranenburg, O., Bouma, B., Kroon-Batenburg, L.M., Reijerkerk, A., Wu, Y.P., Voest, E.E., and Gebbink, M.F. 2002. Tissue-type plasminogen activator is a multiligand cross-beta structure receptor. *Curr Biol* **12**: 1833-1839.
- Krawchuk, M.D., and Wahls, W.P. 1999. High-efficiency gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe* using a modular, PCR-based approach with long tracts of flanking homology. *Yeast (Chichester, England)* **15**: 1419-1427.
- Krishnan, R., and Lindquist, S.L. 2005. Structural insights into a yeast prion illuminate nucleation and strain diversity. *Nature* **435**: 765-772.
- 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., and Wickner, R.B. 2007. Nucleotide Exchange Factors for Hsp70s Are Required for [URE3] Prion Propagation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* **18**: 2149-2154.
- Kryndushkin, D.S., Alexandrov, I.M., Ter-Avanesyan, M.D., and Kushnirov, V.V. 2003. Yeast [PSI⁺] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. *The Journal of biological chemistry* **278**: 49636-49643.
- Kurahashi, H., and Nakamura, Y. 2007. Channel mutations in Hsp104 hexamer distinctively affect thermotolerance and prion-specific propagation. *Molecular microbiology* **63**: 1669-1683.
- Kushnirov, V.V., Kochneva-Pervukhova, N.V., Chechenova, M.B., Frolova, N.S., and Ter-Avanesyan, M.D. 2000. Prion properties of the Sup35 protein of yeast *Pichia methanolica*. *The EMBO journal* **19**: 324-331.
- Lacroute, F. 1971. Non-Mendelian mutation allowing ureidosuccinic acid uptake in yeast. *Journal of bacteriology* **106**: 519-522.
- Larson, J.S., Schuetz, T.J., and Kingston, R.E. 1988. Activation in vitro of sequence-specific DNA binding by a human regulatory factor. *Nature* **335**: 372-375.
- Lecker, S.H., Goldberg, A.L., and Mitch, W.E. 2006. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* **17**: 1807-1819.
- Lederkremer, G.Z., and Glickman, M.H. 2005. A window of opportunity: timing protein degradation by trimming of sugars and ubiquitins. *Trends in biochemical sciences* **30**: 297-303.
- Lee, J.O., Jeong, M.J., Kwon, T.R., Lee, S.K., Byun, M.O., Chung, I.M., and Park, S.C. 2006. *Pleurotus sajor-caju* HSP100 complements a thermotolerance defect in hsp104 mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biosciences* **31**: 223-233.

- Lee, S., Choi, J.M., and Tsai, F.T. 2007. Visualizing the ATPase cycle in a protein disaggregating machine: structural basis for substrate binding by ClpB. *Molecular cell* **25**: 261-271.
- Lee, S., Sowa, M.E., Watanabe, Y.H., Sigler, P.B., Chiu, W., Yoshida, M., and Tsai, F.T. 2003. The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell* **115**: 229-240.
- Lee, Y.R., Nagao, R.T., and Key, J.L. 1994. A soybean 101-kD heat shock protein complements a yeast HSP104 deletion mutant in acquiring thermotolerance. *The Plant cell* **6**: 1889-1897.
- Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.O., Riesner, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. 2004. Synthetic mammalian prions. *Science (New York, N.Y)* **305**: 673-676.
- Lesne, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K.H. 2006. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **440**: 352-357.
- Lewandowska, A., Matuszewska, M., and Liberek, K. 2007. Conformational Properties of Aggregated Polypeptides Determine ClpB-dependence in the Disaggregation Process. *Journal of molecular biology* **371**: 800-811.
- Li, J., and Sha, B. 2003. Crystal structure of the E. coli Hsp100 ClpB N-terminal domain. *Structure* **11**: 323-328.
- Li, L., and Lindquist, S. 2000. Creating a protein-based element of inheritance. *Science (New York, N.Y)* **287**: 661-664.
- Liebman, S.W., Bagriantsev, S.N., and Derkatch, I.L. 2006. Biochemical and genetic methods for characterization of [PIN+] prions in yeast. *Methods (San Diego, Calif)* **39**: 23-34.

- Liebman, S.W., and Derkatch, I.L. 1999. The yeast [PSI⁺] prion: making sense of nonsense. *The Journal of biological chemistry* **274**: 1181-1184.
- Lindquist, S. 1986. The heat-shock response. *Annual review of biochemistry* **55**: 1151-1191.
- Lindquist, S., and Craig, E.A. 1988. The heat-shock proteins. *Annual review of genetics* **22**: 631-677.
- Ling, M., Merante, F., and Robinson, B.H. 1995. A rapid and reliable DNA preparation method for screening a large number of yeast clones by polymerase chain reaction. *Nucleic acids research* **23**: 4924-4925.
- Liou, S.T., Cheng, M.Y., and Wang, C. 2007. SGT2 and MDY2 interact with molecular chaperone YDJ1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell stress & chaperones* **12**: 59-70.
- Liu, J.J., Sondheimer, N., and Lindquist, S.L. 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 Suppl 4**: 16446-16453.
- Lum, R., Tkach, J.M., Vierling, E., and Glover, J.R. 2004. Evidence for an unfolding/threading mechanism for protein disaggregation by *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104. *The Journal of biological chemistry* **279**: 29139-29146.
- Mabbott, N.A., and MacPherson, G.G. 2006. Prions and their lethal journey to the brain. *Nat Rev Microbiol* **4**: 201-211.
- Maddelein, M.L., Dos Reis, S., Duvezin-Caubet, S., Couлары-Salin, B., and Saupe, S.J. 2002. Amyloid aggregates of the HET-s prion protein are infectious. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 7402-7407.

- Malato, L., Dos Reis, S., Benkemoun, L., Sabate, R., and Saupe, S.J. 2007. Role of Hsp104 in the Propagation and Inheritance of the [Het-s] Prion. *Molecular biology of the cell* **18**: 4803-4812.
- Marc, D., Mercey, R., and Lantier, F. 2007. Scavenger, transducer, RNA chaperone? What ligands of the prion protein teach us about its function. *Cell Mol Life Sci* **64**: 815-829.
- Marechal, A., Tanguay, P.L., Callejo, M., Guerin, R., Boileau, G., and Rokeach, L.A. 2004. Cell viability and secretion of active proteins in *Schizosaccharomyces pombe* do not require the chaperone function of calnexin. *The Biochemical journal* **380**: 441-448.
- Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., and Estruch, F. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *The EMBO journal* **15**: 2227-2235.
- Mathiason, C.K., Powers, J.G., Dahmes, S.J., Osborn, D.A., Miller, K.V., Warren, R.J., Mason, G.L., Hays, S.A., Hayes-Klug, J., Seelig, D.M., et al. 2006. Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science (New York, N.Y)* **314**: 133-136.
- Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., et al. 2006. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature biotechnology* **24**: 841-847.
- Maundrell, K. 1993. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**: 127-130.
- Mayer, M.P., and Bukau, B. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**: 670-684.

- Meersman, F., and Dobson, C.M. 2006. Probing the pressure-temperature stability of amyloid fibrils provides new insights into their molecular properties. *Biochim Biophys Acta* **1764**: 452-460.
- Meredith, S.C. 2005. Protein denaturation and aggregation: Cellular responses to denatured and aggregated proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1066**: 181-221.
- Mogk, A., Schlieker, C., Strub, C., Rist, W., Weibezahn, J., and Bukau, B. 2003. Roles of individual domains and conserved motifs of the AAA+ chaperone ClpB in oligomerization, ATP hydrolysis, and chaperone activity. *The Journal of biological chemistry* **278**: 17615-17624.
- Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rudiger, S., Roder, D., Langen, H., and Bukau, B. 1999. Identification of thermolabile Escherichia coli proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *The EMBO journal* **18**: 6934-6949.
- Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in enzymology* **194**: 795-823.
- 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.
- Moser, M.J., Lee, S.Y., Klevit, R.E., and Davis, T.N. 1995. Ca²⁺ binding to calmodulin and its role in *Schizosaccharomyces pombe* as revealed by mutagenesis and NMR spectroscopy. *The Journal of biological chemistry* **270**: 20643-20652.
- Mosser, D.D., Ho, S., and Glover, J.R. 2004. *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104 enhances the chaperone capacity of human cells and inhibits heat stress-induced proapoptotic signaling. *Biochemistry* **43**: 8107-8115.

- Motohashi, K., Watanabe, Y., Yohda, M., and Yoshida, M. 1999. Heat-inactivated proteins are rescued by the DnaK.J-GrpE set and ClpB chaperones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 7184-7189.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. 2002. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature biotechnology* **20**: 87-90.
- 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.
- Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., and Chandu, D. 2006. The ubiquitin-proteasome system. *Journal of biosciences* **31**: 137-155.
- Narayanan, S., Bosl, B., Walter, S., and Reif, B. 2003. Importance of low-oligomeric-weight species for prion propagation in the yeast prion system Sup35/Hsp104. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 9286-9291.
- Nelson, R., Sawaya, M.R., Balbirnie, M., Madsen, A.O., Riek, C., Grothe, R., and Eisenberg, D. 2005. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **435**: 773-778.
- Ness, F., Ferreira, P., Cox, B.S., and Tuite, M.F. 2002. Guanidine hydrochloride inhibits the generation of prion "seeds" but not prion protein aggregation in yeast. *Molecular and cellular biology* **22**: 5593-5605.
- Nicotera, P. 2001. A route for prion neuroinvasion. *Neuron* **31**: 345-348.
- Oh, J., Kim, J.G., Jeon, E., Yoo, C.H., Moon, J.S., Rhee, S., and Hwang, I. 2007. Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria. *The Journal of biological chemistry* **282**: 13601-13609.

- Ohnishi, S., and Takano, K. 2004. Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding. *Cell Mol Life Sci* **61**: 511-524.
- Orlowska-Matuszewska, G., and Wawrzycka, D. 2006. A novel phenotype of eight spores asci in deletants of the prion-like Rnq1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications* **340**: 190-193.
- Osherovich, L.Z., Cox, B.S., Tuite, M.F., and Weissman, J.S. 2004. Dissection and design of yeast prions. *PLoS biology* **2**: E86.
- Osherovich, L.Z., and Weissman, J.S. 2001. Multiple Gln/Asn-rich prion domains confer susceptibility to induction of the yeast [PSI(+)] prion. *Cell* **106**: 183-194.
- Outeiro, T.F., and Giorgini, F. 2006. Yeast as a drug discovery platform in Huntington's and Parkinson's diseases. *Biotechnology journal* **1**: 258-269.
- Parsell, D.A., Kowal, A.S., and Lindquist, S. 1994a. *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104 protein. Purification and characterization of ATP-induced structural changes. *The Journal of biological chemistry* **269**: 4480-4487.
- Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A., and Lindquist, S. 1994b. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* **372**: 475-478.
- Patel, B.K., and Liebman, S.W. 2007. "Prion-proof" for [PIN(+)]? Infection with In Vitro-made Amyloid Aggregates of Rnq1p-(132-405) Induces [PIN(+)]. *Journal of molecular biology* **365**: 773-782.
- Peng, G., and Hopper, J.E. 2000. Evidence for Gal3p's cytoplasmic location and Gal80p's dual cytoplasmic-nuclear location implicates new mechanisms for controlling Gal4p activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **20**: 5140-5148.

- Pinheiro, T.J. 2006. The role of rafts in the fibrillization and aggregation of prions. *Chemistry and physics of lipids* **141**: 66-71.
- Podrabsky, J.E., Carpenter, J.F., and Hand, S.C. 2001. Survival of water stress in annual fish embryos: dehydration avoidance and egg envelope amyloid fibers. *American journal of physiology* **280**: R123-131.
- Prusiner, S.B. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science (New York, N.Y)* **216**: 136-144.
- Prusiner, S.B. 1998. Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 13363-13383.
- Prusiner, S.B., McKinley, M.P., Bowman, K.A., Bolton, D.C., Bendheim, P.E., Groth, D.F., and Glenner, G.G. 1983. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* **35**: 349-358.
- Ribeiro, M.J., Reinders, A., Boller, T., Wiemken, A., and De Virgilio, C. 1997. Trehalose synthesis is important for the acquisition of thermotolerance in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular microbiology* **25**: 571-581.
- Ripaud, L., Maillet, L., and Cullin, C. 2003. The mechanisms of [URE3] prion elimination demonstrate that large aggregates of Ure2p are dead-end products. *The EMBO journal* **22**: 5251-5259.
- Ritter, C., Maddelein, M.L., Siemer, A.B., Luhrs, T., Ernst, M., Meier, B.H., Saupe, S.J., and Riek, R. 2005. Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion. *Nature* **435**: 844-848.
- Roberts, B.T., Moriyama, H., and Wickner, R.B. 2004. [URE3] prion propagation is abolished by a mutation of the primary cytosolic Hsp70 of budding yeast. *Yeast (Chichester, England)* **21**: 107-117.

- Roberts, B.T., and Wickner, R.B. 2003. Heritable activity: a prion that propagates by covalent autoactivation. *Genes & development* **17**: 2083-2087.
- Rönicke, V., Graulich, W., Mumberg, D., Müller, R., and Funk, M. 1997. Use of conditional promoters for expression of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in enzymology* **283**: 313-322.
- Sailer, A., Bueler, H., Fischer, M., Aguzzi, A., and Weissmann, C. 1994. No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* **77**: 967-968.
- Sakurai, H., and Takemori, Y. 2007. Interaction between heat shock transcription factors (HSFs) and divergent binding sequences: binding specificities of yeast HSFs and human HSF1. *The Journal of biological chemistry* **282**: 13334-13341.
- Saltsman, K.A., Prentice, H.L., and Kingston, R.E. 1999. Mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* heat shock factor that differentially affect responses to heat and cadmium stress. *Mol Gen Genet* **261**: 161-169.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 3 v.
- Sanchez, Y., and Lindquist, S.L. 1990. HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* **248**: 1112-1115.
- Satpute-Krishnan, P., Langseth, S.X., and Serio, T.R. 2007. Hsp104-dependent remodeling of prion complexes mediates protein-only inheritance. *PLoS biology* **5**: e24.
- Sauer, R.T., Bolon, D.N., Burton, B.M., Burton, R.E., Flynn, J.M., Grant, R.A., Hersch, G.L., Joshi, S.A., Kenniston, J.A., Levchenko, I., et al. 2004. Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. *Cell* **119**: 9-18.
- Sawaya, M.R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M.I., Sievers, S.A., Apostol, M.I., Thompson, M.J., Balbirnie, M., Wiltzius, J.J., McFarlane, H.T., et al. 2007. Atomic

- structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* **447**: 453-457.
- Schaupp, A., Marcinowski, M., Grimminger, V., Bosl, B., and Walter, S. 2007. Processing of proteins by the molecular chaperone hsp104. *Journal of molecular biology* **370**: 674-686.
- Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U., and Moarefi, I. 2000. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**: 199-210.
- Schirmer, E.C., Lindquist, S., and Vierling, E. 1994. An Arabidopsis heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast. *The Plant cell* **6**: 1899-1909.
- Schlee, S., Beinker, P., Akhrymuk, A., and Reinstein, J. 2004. A chaperone network for the resolubilization of protein aggregates: direct interaction of ClpB and DnaK. *Journal of molecular biology* **336**: 275-285.
- Schlieker, C., Tews, I., Bukau, B., and Mogk, A. 2004a. Solubilization of aggregated proteins by ClpB/DnaK relies on the continuous extraction of unfolded polypeptides. *FEBS letters* **578**: 351-356.
- Schlieker, C., Weibezahn, J., Patzelt, H., Tessarz, P., Strub, C., Zeth, K., Erbse, A., Schneider-Mergener, J., Chin, J.W., Schultz, P.G., et al. 2004b. Substrate recognition by the AAA+ chaperone ClpB. *Nature structural & molecular biology* **11**: 607-615.
- 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.

- Seppa, L., Hanninen, A.L., and Makarow, M. 2004. Upregulation of the Hsp104 chaperone at physiological temperature during recovery from thermal insult. *Molecular microbiology* **52**: 217-225.
- Shastry, B.S. 2003. Neurodegenerative disorders of protein aggregation. *Neurochemistry international* **43**: 1-7.
- Sherman, F., Fink, G.R., Hicks, J.B., and Cold Spring Harbor Laboratory. 1981. *Methods in yeast genetics*, 1981 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, pp. 120.
- Shorter, J., and Lindquist, S. 2004. Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers. *Science* **304**: 1793-1797.
- Shorter, J., and Lindquist, S. 2006. Destruction or potentiation of different prions catalyzed by similar Hsp104 remodeling activities. *Molecular cell* **23**: 425-438.
- Si, K., Giustetto, M., Etkin, A., Hsu, R., Janisiewicz, A.M., Miniaci, M.C., Kim, J.H., Zhu, H., and Kandel, E.R. 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., and Kandel, E.R. 2003b. A neuronal isoform of the aplysia CPEB has prion-like properties. *Cell* **115**: 879-891.
- Sigurdson, C.J., and Aguzzi, A. 2006. Chronic wasting disease. *Biochim Biophys Acta*.
- Sikorski, P., and Atkins, E. 2005. New model for crystalline polyglutamine assemblies and their connection with amyloid fibrils. *Biomacromolecules* **6**: 425-432.
- Silveira, J.R., Raymond, G.J., Hughson, A.G., Race, R.E., Sim, V.L., Hayes, S.F., and Caughey, B. 2005. The most infectious prion protein particles. *Nature* **437**: 257-261.

- Smith, C.K., Baker, T.A., and Sauer, R.T. 1999. Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 6678-6682.
- Smith, J.F., Knowles, T.P., Dobson, C.M., Macphee, C.E., and Welland, M.E. 2006. Characterization of the nanoscale properties of individual amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 15806-15811.
- Sondheimer, N., and Lindquist, S. 2000. Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Molecular cell* **5**: 163-172.
- 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.
- Soto, C., Estrada, L., and Castilla, J. 2006. Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates. *Trends in biochemical sciences* **31**: 150-155.
- Soto, C., Saborio, G.P., and Anderes, L. 2002. Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends in neurosciences* **25**: 390-394.
- Sparrer, H.E., Santoso, A., Szoka, F.C., Jr., and Weissman, J.S. 2000. Evidence for the prion hypothesis: induction of the yeast [PSI+] factor by in vitro- converted Sup35 protein. *Science (New York, N.Y)* **289**: 595-599.
- Spiess, C., Miller, E.J., McClellan, A.J., and Frydman, J. 2006. Identification of the TRiC/CCT substrate binding sites uncovers the function of subunit diversity in eukaryotic chaperonins. *Molecular cell* **24**: 25-37.

- Stathopoulos, P.B., Scholz, G.A., Hwang, Y.M., Rumpfolt, J.A., Lepock, J.R., and Meiering, E.M. 2004. Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid. *Protein Sci* **13**: 3017-3027.
- Strub, C., Schlieker, C., Bukau, B., and Mogk, A. 2003. Poly-L-lysine enhances the protein disaggregation activity of ClpB. *FEBS letters* **553**: 125-130.
- Sun, Y., and MacRae, T.H. 2005. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell Mol Life Sci* **62**: 2460-2476.
- Swanton, E., and Bulleid, N.J. 2003. Protein folding and translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Molecular membrane biology* **20**: 99-104.
- Talloczy, Z., Mazar, R., Georgopoulos, D.E., Ramos, F., and Leibowitz, M.J. 2000. The [KIL-d] element specifically regulates viral gene expression in yeast. *Genetics* **155**: 601-609.
- Tam, S., Geller, R., Spiess, C., and Frydman, J. 2006. The chaperonin TRiC controls polyglutamine aggregation and toxicity through subunit-specific interactions. *Nature cell biology* **8**: 1155-1162.
- Tanaka, M., Chien, P., Naber, N., Cooke, R., and Weissman, J.S. 2004a. Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature* **428**: 323-328.
- Tanaka, M., Collins, S.R., Toyama, B.H., and Weissman, J.S. 2006. The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature* **442**: 585-589.
- Tanaka, N., Tani, Y., Hattori, H., Tada, T., and Kunugi, S. 2004b. Interaction of the N-terminal domain of Escherichia coli heat-shock protein ClpB and protein aggregates during chaperone activity. *Protein Sci* **13**: 3214-3221.

- 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.
- Tank, E.M., Harris, D.A., Desai, A.A., and True, H.L. 2007. Prion protein repeat expansion results in increased aggregation and reveals phenotypic variability. *Molecular and cellular biology* **27**: 5445-5455.
- Tatzelt, J., and Schatzl, H.M. 2007. Molecular basis of cerebral neurodegeneration in prion diseases. *The FEBS journal* **274**: 606-611.
- Telling, G.C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. 1995. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* **83**: 79-90.
- Ter-Avanesyan, M., Derkatch, I., Baskakov, I., and Kushnirov, V. 2005. Unraveling prion structures and biological functions. *Genome biology* **6**: 366.
- Tessier, P.M., and Lindquist, S. 2007. Prion recognition elements govern nucleation, strain specificity and species barriers. *Nature* **447**: 556-561.
- Thevelein, J.M., and de Winde, J.H. 1999. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* **33**: 904-918.
- Thomas, B.J., and Rothstein, R. 1989. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**: 619-630.
- Tkach, J.M., and Glover, J.R. 2004. Amino acid substitutions in the C-terminal AAA+ module of Hsp104 prevent substrate recognition by disrupting oligomerization and cause high temperature inactivation. *The Journal of biological chemistry* **279**: 35692-35701.

- Toone, W.M., and Jones, N. 1998. Stress-activated signalling pathways in yeast. *Genes Cells* **3**: 485-498.
- Tribouillard, D., Bach, S., Gug, F., Desban, N., Beringue, V., Andrieu, T., Dormont, D., Galons, H., Laude, H., Vilette, D., et al. 2006. Using budding yeast to screen for anti-prion drugs. *Biotechnology journal* **1**: 58-67.
- True, H.L. 2006. The battle of the fold: chaperones take on prions. *Trends Genet* **22**: 110-117.
- True, H.L., Berlin, I., and Lindquist, S.L. 2004. Epigenetic regulation of translation reveals hidden genetic variation to produce complex traits. *Nature* **431**: 184-187.
- Tuite, M.F. 1994. Genetics. Psi no more for yeast prions. *Nature* **370**: 327-328.
- Tuite, M.F. 2004. Cell biology: the strain of being a prion. *Nature* **428**: 265-267.
- Tuite, M.F., and Cox, B.S. 2003. Propagation of yeast prions. *Nature reviews* **4**: 878-890.
- Tuite, M.F., and Cox, B.S. 2006. The [PSI⁺] prion of yeast: a problem of inheritance. *Methods (San Diego, Calif)* **39**: 9-22.
- Turcotte, C., Roux, A., Beauregard, P.B., Guerin, R., Senechal, P., Hajjar, F., and Rokeach, L.A. 2007. The calnexin-independent state does not compensate for all calnexin functions in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS yeast research* **7**: 196-208.
- Tycko, R. 2003. Insights into the amyloid folding problem from solid-state NMR. *Biochemistry* **42**: 3151-3159.
- Uptain, S.M., and Lindquist, S. 2002. Prions as protein-based genetic elements. *Annual review of microbiology* **56**: 703-741.

- Vacher, C., Garcia-Oroz, L., and Rubinsztein, D.C. 2005. Overexpression of yeast hsp104 reduces polyglutamine aggregation and prolongs survival of a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Human molecular genetics* **14**: 3425-3433.
- van Anken, E., and Braakman, I. 2005. Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **40**: 191-228.
- van Montfort, R.L., Basha, E., Friedrich, K.L., Slingsby, C., and Vierling, E. 2001. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nature structural biology* **8**: 1025-1030.
- Vella, L.J., Sharples, R.A., Lawson, V.A., Masters, C.L., Cappai, R., and Hill, A.F. 2007. Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *The Journal of pathology* **211**: 582-590.
- Vessey, J.P., Vaccani, A., Xie, Y., Dahm, R., Karra, D., Kiebler, M.A., and Macchi, P. 2006. Dendritic localization of the translational repressor Pumilio 2 and its contribution to dendritic stress granules. *J Neurosci* **26**: 6496-6508.
- Vitrenko, Y.A., Gracheva, E.O., Richmond, J.E., and Liebman, S.W. 2007. Visualization of aggregation of the Rnq1 prion domain and cross-seeding interactions with Sup35NM. *The Journal of biological chemistry* **282**: 1779-1787.
- Voellmy, R. 2004. On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells. *Cell stress & chaperones* **9**: 122-133.
- 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-Vechtormov, 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.

- von der Haar, T., Josse, L., Wright, P., Zenthon, J., and Tuite, M.F. 2007. Development of a novel yeast cell-based system for studying the aggregation of Alzheimer's disease-associated Abeta peptides in vivo. *Neuro-degenerative diseases* **4**: 136-147.
- Wadsworth, J.D., and Collinge, J. 2007. Update on human prion disease. *Biochim Biophys Acta*.
- Walter, S., and Buchner, J. 2002. Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angewandte Chemie (International ed)* **41**: 1098-1113.
- Watanabe, Y.H., Motohashi, K., Taguchi, H., and Yoshida, M. 2000. Heat-inactivated proteins managed by DnaKJ-GrpE-ClpB chaperones are released as a chaperonin-recognizable non-native form. *The Journal of biological chemistry* **275**: 12388-12392.
- Wegele, H., Wandinger, S.K., Schmid, A.B., Reinstein, J., and Buchner, J. 2006. Substrate transfer from the chaperone Hsp70 to Hsp90. *Journal of molecular biology* **356**: 802-811.
- 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.
- Weibezahn, J., Tessarz, P., Schlieker, C., Zahn, R., Maglica, Z., Lee, S., Zentgraf, H., Weber-Ban, E.U., Dougan, D.A., Tsai, F.T., et al. 2004. Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB. *Cell* **119**: 653-665.
- Wells, D.R., Tanguay, R.L., Le, H., and Gallie, D.R. 1998. HSP101 functions as a specific translational regulatory protein whose activity is regulated by nutrient status. *Genes & development* **12**: 3236-3251.

- Westermark, P. 2005. Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides. *The FEBS journal* **272**: 5942-5949.
- White, H.E., Orlova, E.V., Chen, S., Wang, L., Ignatiou, A., Gowen, B., Stromer, T., Franzmann, T.M., Haslbeck, M., Buchner, J., et al. 2006. Multiple distinct assemblies reveal conformational flexibility in the small heat shock protein Hsp26. *Structure* **14**: 1197-1204.
- Wickner, R.B. 1994. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science (New York, N.Y)* **264**: 566-569.
- Wickner, R.B., Taylor, K.L., Edskes, H.K., Maddelein, M.L., Moriyama, H., and Roberts, B.T. 1999. Prions in *Saccharomyces* and *Podospora* spp.: protein-based inheritance. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 844-861, table of contents.
- Williams, D.B. 2006. Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science* **119**: 615-623.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., et al. 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**: 871-880.
- Xia, D., Esser, L., Singh, S.K., Guo, F., and Maurizi, M.R. 2004. Crystallographic investigation of peptide binding sites in the N-domain of the ClpA chaperone. *Journal of structural biology* **146**: 166-179.
- Yamada-Inagawa, T., Okuno, T., Karata, K., Yamanaka, K., and Ogura, T. 2003. Conserved pore residues in the AAA protease FtsH are important for proteolysis and its coupling to ATP hydrolysis. *The Journal of biological chemistry* **278**: 50182-50187.
- Yang, W.Y., and Gruebele, M. 2003. Folding at the speed limit. *Nature* **423**: 193-197.

- Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G., and Wuthrich, K. 2000. NMR solution structure of the human prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 145-150.
- Zenthon, J.F., Ness, F., Cox, B., and Tuite, M.F. 2006. The [PSI⁺] prion of *Saccharomyces cerevisiae* can be propagated by an Hsp104 orthologue from *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **5**: 217-225.
- Zietkiewicz, S., Krzewska, J., and Liberek, K. 2004. Successive and synergistic action of the Hsp70 and Hsp100 chaperones in protein disaggregation. *The Journal of biological chemistry* **279**: 44376-44383.
- Zolkiewski, M. 1999. ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation. A novel multi-chaperone system from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **274**: 28083-28086.
- Zolkiewski, M. 2006. A camel passes through the eye of a needle: protein unfolding activity of Clp ATPases. *Molecular microbiology* **61**: 1094-1100.