

Санкт-Петербургский государственный университет

На правах рукописи

Барбитов Юрий Александрович

**Изучение механизмов дифференциальных эффектов шаперона Sis1 на прионы
дрожжей**

Выпускная квалификационная работа аспиранта

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент
Журавлева Галина Анатольевна

Санкт-Петербург

2023

Оглавление

Список сокращений	4
Введение	5
Глава 1. Дифференциальное взаимодействие молекулярных шаперонов и прионов дрожжей (обзор литературы)	9
1.1 Молекулярные шапероны и контроль качества белка	9
1.1.1 История открытия шаперонов	9
1.1.2 Семейства молекулярных шаперонов	11
1.2 Прионы дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
1.2.1 Прионы и амилоиды	19
1.2.2 Разнообразие и свойства прионов дрожжей	21
1.3 Система контроля качества белков и прионы дрожжей	25
1.3.1 Hsp104 — ключевой регулятор поддержания прионов	25
1.3.2 Роль различных Hsp70 в жизненном цикле прионов дрожжей	28
1.3.3 Дифференциальные эффекты Hsp40 на прионы	29
1.4 Заключение	34
Глава 2. Материалы и методы	35
2.1 Штаммы бактерий и дрожжей	35
2.2 Плазмиды	38
2.3 Среды и условия культивирования	40
2.4 Генетические методы	41
2.4.1 Трансформация клеток дрожжей и бактерий	41
2.4.2 Оценка частоты потери приона [<i>URE3</i>]	41
2.5 Флуоресцентная микроскопия	41
2.6 Молекулярно-биологические методы	42
2.6.1 Полимеразная цепная реакция	42
2.6.2 Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции	42
2.6.3 Лигирование ДНК-фрагментов	42
2.6.4 Выделение плазмидной ДНК из бактерий	42
2.6.5 Электрофорез ДНК	43
2.6.6 Выделение и электрофорез белков из клеток дрожжей и бактерий	43
2.6.7 Полуденатурирующий электрофорез в агарозном геле (SDD-AGE)	44
2.7 Получение препаратов дрожжевых шаперонов и амилоидных фибрилл <i>in vitro</i>	44
2.7.1 Оптимизация условий для наработки белков в клетках бактерий	44
2.7.2 Препаративная очистка белков	45
2.7.3 Получение амилоидных фибрилл	47
2.7.4 Оценка активности молекулярных шаперонов <i>in vitro</i>	47
2.8 Электронная микроскопия	48
2.9 Анализ связывания шаперонов с фибриллами	48
2.10 Статистическая обработка данных	49
Глава 3. Результаты	51
3.1 Характеристика дифференциальных эффектов Sis1 на прионы дрожжей	51
3.1.1 Изменение внутриклеточной локализации Sis1 разнонаправлено влияет на прионы дрожжей	51

3.1.2	Изменение локализации Sis1 не влияет на размер и морфологию агрегатов	54
3.1.3	Делеция димеризационного домена Sis1 ослабляет проявление [PSI ⁺]	55
3.2	Анализ связывания Hsp40 с амилоидными фибриллами	57
3.2.1	Подготовка препаратов очищенных шаперонов и амилоидных фибрилл	58
3.2.2	Sis1 эффективно взаимодействует с фибриллами Sup35NM, но не Rnq1	60
3.2.3	Мутации в олигопептидных повторах N-домена Sup35 не влияют на связывание Sis1	62
3.3	Взаимосвязь между связыванием Hsp40 и привлечением других шаперонов к фибрилле	64
3.3.1	Эффективность связывания Hsp40 с фибриллами не оказывает прямого влияния на привлечение Hsp70	64
3.3.2	Sis1 не стимулирует взаимодействие Hsp104 с агрегатами без участия иных кофакторов	67
Глава 4.	Обсуждение	70
4.1	Роль Hsp40 в жизненном цикле прионов дрожжей	70
4.2	Молекулярные механизмы дезагрегации амилоидов	72
4.3	Функциональное значение связывания Sis1 с агрегатами	75
Глава 5.	Выводы	79
	Список литературы	80
	Благодарности	101

Список сокращений

- а.к.о. — аминокислотный остаток;
- АМФ-ФНФ — аденилил-имидодифосфат;
- АТФ — аденозинтрифосфат;
- ГТФ — гуанозинтрифосфат;
- СККБ — система контроля качества белка;
- ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия;
- СТД — C-terminal domain, С-концевой домен;
- CytoQ — cytoplasmic quality (control deposit), цитоплазматический компартмент контроля качества белка;
- DD — dimerization domain, димеризационный домен;
- НТб — последовательность, кодирующая His₆-тэг, сайт TEV-протеазы и содержащая сайт рестриктазы BamHI;
- INQ — intranuclear quality control (deposit), внутриядерный компартмент контроля качества белка;
- IPOD — insoluble protein deposit, компартмент нерастворимых белков;
- IPTG — isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, изопропил-бета-1-тиогалактопиранозид;
- NBD — nucleotide-binding domain, нуклеотид-связывающий домен;
- NLS — nuclear localization signal, сигнал ядерной локализации;
- NES — nuclear export signal, сигнал экспорта из ядра;
- SBD — substrate-binding domain, субстрат-связывающий домен;
- SDD-AGE — semi-denaturing detergent agarose gel electrophoresis (полуденатурирующий электрофорез в агарозном геле);
- SDS-PAGE — polyacrylamid gel electrophoresis with SDS (денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле с SDS);
- w/v — weight/volume, вес к объёму

Введение

Актуальность темы. В течение своей жизни живые организмы сталкиваются с большим количеством разнообразных стрессов. Для выживания в стрессовых условиях клетки приобрели множество различных систем, позволяющих бороться с нежелательными последствиями стрессовых воздействий. Одной из таких систем является система контроля качества белка (СККБ), призванная обеспечить защиту клетки от токсичности, связанной с нарушениями конформации белков.

Пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются удобным модельным объектом для исследования разнообразных процессов, протекающих в эукариотической клетке. Различные компоненты системы контроля качества белка можно изучать в модельной системе прионов дрожжей. Дрожжевые прионы являются инфекционными детерминантами белковой природы, представляющими из себя самовоспроизводящиеся конформационные варианты нативных белков. Прионы дрожжей поддерживаются и распространяются благодаря взаимодействию с различными элементами системы контроля качества белка - молекулярными шаперонами и факторами сортировки белков. Интересно, что различные шапероны по-разному влияют на поддержание наиболее изученных дрожжевых прионов, $[PSI^+]$ и $[URE3]$. Такие дифференциальные эффекты шаперонов на поддержание прионов представляют большой интерес для фундаментальных и прикладных исследований ввиду того, что понимание механизмов взаимодействия шаперонов с белковыми агрегатами может помочь в разработке новых методов диагностики и терапии протеинопатий человека и млекопитающих.

Степень разработанности темы. В литературе описан целый ряд примеров дифференциальных эффектов шаперонов на прионы дрожжей (например, Reidy *et al.*, 2012; Stein, True, 2014; Reidy *et al.*, 2014; Barbitoff *et al.*, 2017). В работах нашей лаборатории также описаны дифференциальные эффекты фактора Cur1 на прионы (Barbitoff *et al.*, 2017), потенциально связанные с изменением внутриклеточного баланса Sis1. В то же время, отсутствуют данные о разнонаправленных эффектах Sis1 на прионы. Также в литературе отсутствуют исследования, посвященные количественному анализу прион-шаперонных взаимодействий, не предложена универсальная модель, объясняющая дифференциальные эффекты шаперонов на поддержание прионов.

Цель работы: изучить молекулярные механизмы дифференциального воздействия шаперона Sis1 на прионы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Охарактеризовать влияние изменения внутриклеточного баланса Sis1 на поддержание прионов дрожжей.
2. Оценить эффективность формирования комплексов Sis1 с амилоидными фибриллами различных белков *in vitro*.
3. Изучить влияние делеции димеризационного домена Sis1 на его взаимодействие с амилоидными фибриллами *in vitro*.
4. Исследовать взаимосвязь между связыванием Sis1 с агрегатами и эффективностью привлечения к ним шаперонов других групп.

Научная новизна работы. В работе впервые показано положительное влияние изменения локализации Sis1 на поддержание приона [PSI^+]. Разработан новый метод анализа связывания молекулярных шаперонов с амилоидными агрегатами в системе *in vitro*. Получены первые количественные оценки эффективности взаимодействия Sis1, Ssa1 и Hsp104 с амилоидными агрегатами дрожжевых прионогенных белков. Обнаружены ранее не описанные эффекты делеции димеризационного домена Sis1 как на поддержание прионов, так и на взаимодействие с амилоидными агрегатами. Предложена новая модель, описывающая дифференциальное взаимодействие шаперонов с прионными агрегатами в клетках дрожжей *S. cerevisiae*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты, полученные в ходе данного исследования, расширяют существующие теоретические представления о механизмах взаимодействия молекулярных шаперонов различных групп с амилоидными агрегатами в клетках эукариот. Предложенная методика анализа взаимодействия шаперонов с белковыми агрегатами может быть в дальнейшем применена для анализа амилоидных агрегатов белков человека и других млекопитающих.

Методология и методы исследования. В ходе выполнения работы был использован целый ряд современных методов исследования, включая методы генетики микроорганизмов, молекулярно-биологические методы работы с нуклеиновыми кислотами и белками, биохимические методы анализа взаимодействия макромолекул, флуоресцентная и электронная микроскопия. Используются различные методы статистической

обработки полученных результатов. В ходе данного исследования разработан и применен новый метод анализа взаимодействия молекулярных шаперонов с амилоидными агрегатами.

Основные положения, выносимые на защиту. Показано, что изменение внутриклеточной локализации молекулярного шаперона Sis1 способно оказывать разнонаправленные эффекты на прионы дрожжей. Эффективность связывания Sis1 с амилоидными фибриллами прионогенного белка Sup35NM в системе *in vitro* выше, чем с фибриллами Rnq1. Мутации в олигопептидных повторах в составе прионного домена белка Sup35 не влияют на взаимодействие Sis1 с амилоидными агрегатами этого белка. Делеция димеризационного домена Sis1 ослабляет его взаимодействие с амилоидными фибриллами различных белков и может приводить к снижению эффективности привлечения Hsp70 к агрегатам.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные результаты работы были доложены и обсуждены на 6 международных конференциях и опубликованы в 5 статьях в рецензируемых научных изданиях:

1. Barbitoff Y. A., Matveenko A. G., Moskalenko S. E., Zemlyanko O. M., Newnam G. P., Patel A. X., Chernova T. A., Chernoff Y. O., Zhouravleva G. A. To CURE or not to CURE? Differential effects of the chaperone sorting factor Cur1 on yeast prions are mediated by the chaperone Sis1 // *Molecular Microbiology*. 2017. Vol. 105, no. 2. P. 242–257
2. Matveenko A. G., Barbitoff Y. A., Jay-Garcia L. M., Chernoff Y. O., Zhouravleva G. A. Differential effects of chaperones on yeast prions: CURrent view // *Current Genetics*. 2018. Vol. 64, no. 2. P. 317–325
3. Drozdova P. B., Barbitoff Y. A., Belousov M. V., Skitchenko R. K., Rogoza T. M., Leclercq J. Y., Kajava A. V., Matveenko A. G., Zhouravleva G. A., Bondarev S. A. Estimation of amyloid aggregate sizes with semi-denaturing detergent agarose gel electrophoresis and its limitations // *Prion*. 2020. Vol. 14, no. 1. P. 118–128
4. Barbitoff Y. A., Matveenko A. G., Bondarev S. A., Maksiutenko E. M., Kulikova A. V., Zhouravleva G. A. Quantitative assessment of chaperone binding to amyloid aggregates identifies specificity of Hsp40 interaction with yeast prion fibrils // *FEMS Yeast Research*. 2020. Vol. 20, no. 4. foaa025

5. Barbitoff Y. A., Matveenko A. G., Zhouravleva G. A. Differential interactions of molecular chaperones and yeast prions // *Journal of Fungi*. 2022. Vol. 8, no. 2. P. 1–18

Объём и структура работы. Выпускная квалификационная работа состоит из введения и пяти глав. Полный объём работы составляет 101 страницу с 21 рисунком и 6 таблицами. Список литературы содержит 211 наименований.

Глава 1. Дифференциальное взаимодействие молекулярных шаперонов и прионов дрожжей (обзор литературы)

1.1. Молекулярные шапероны и контроль качества белка

Процесс укладки (фолдинга) белка является одним из интереснейших в клеточной биологии. Любая протяженная белковая молекула может принять чрезвычайно большое количество пространственных структур (Levinthal, Cyrus, 1968). Тем не менее, белки способны спонтанно восстанавливать свою нативную укладку — явление, обнаруженное Anfinsenom в экспериментах *in vitro* в 1961 г. (Anfinsen *et al.*, 1961). В живой клетке, однако, укладка белковой молекулы зачастую может нарушаться. Нарушение процесса фолдинга может, в свою очередь, приводить к ряду негативных последствий для клетки, включая формирование нежелательных белковых агрегатов (Dobson, 2003). Для противодействия мисфолдингу и агрегации белков в клетке работает система контроля качества белка (СККБ, protein quality control, PQC), ключевыми компонентами которой являются молекулярные шапероны.

1.1.1 История открытия шаперонов

Слово «шаперон» (от фр. *chaperon* — «дама, сопровождающая и наблюдающая за более молодой дамой на публике») впервые было использовано в научной литературе по отношению к белковой молекуле в 1976 г. (Fohlman *et al.*, 1976). В этой работе Фольман использовал этот термин для обозначения белковых β и γ субъединиц белкового нейротоксина из яда австралийских змей тайпанов (тайпоксина), которые, по предположению Фольмана, способствовали стабильности основной части токсина. Через два года после этого, Лэски впервые употребил словосочетание «молекулярный шаперон» для обозначения функции нуклеоплазмина в отношении гистонов при сборке нуклеосомы (Laskey *et al.*, 1978).

Первое предположение о роли белков-шаперонов (или молекулярных шаперонов) в контроле укладки белковых молекул было выдвинуто Пелэмом в 1984 г. (Pelham, 1984). Это предположение было сделано при изучении процессов, происходящих в живых клетках под воздействием высокой температуры (теплового шока). Эффекты теплово-

го воздействия на молекулярные процессы в клетках подробно изучались с 1962 г., когда Ритосса обнаружил, что тепловое воздействие стимулирует экспрессию некоторых генов плодовых мушек *Drosophila melanogaster*. Кодируемые этими генами белки получили впоследствии название белков теплового шока (heat shock proteins, HSP). Пелэм с коллегами исследовали белок теплового шока дрозофилы HSP70, активируемый при тепловом стрессе. Пелэм интерпретировал защитный эффект HSP70 при тепловом стрессе способностью этого белка разрушать белковые комплексы, формируемые неуложенными белковыми молекулами в условиях повышенной температуры (по Morange, 2005). Впоследствии гипотеза Пелэма о функции некоторых белков теплового шока была использована Эллисом, который на основании данных Пелэма и других исследователей заключил, что функция белков-шаперонов в контроле укладки белков может быть общей и жизненно важной для всех живых объектов (Ellis, 1987).

Вскоре после публикации работы Эллиса был предложен термин «шаперонин» для обозначения больших белковых комплексов, играющих роль в сборке олигомерных белковых комплексов. Данный термин был введен после того, как было показано, что белок кишечной палочки *Escherichia coli* GroEL (необходимый для сборки частиц бактериофага λ) гомологичен Рубиско-связывающему белку из хлоропластов растений (именно с этим белком работала лаборатория Эллиса) (Hemmingsen *et al.*, 1988). Позднее представитель группы шаперонинов был найден у пекарских дрожжей, а мутанты по гену *MIF4*, кодирующему этот белок, характеризовались сниженной способностью к импорту белков в митохондрии. Дальнейшее исследование белков группы Hsp60 показало, что эти белки имеют широкую роль в фолдинге белковых цепей. Так, Хартлом с соавторами было показано, что субстрат Hsp60, дигидрофолатредуктаза (DHFR), способная к спонтанному рефолдингу в системе *in vitro*, в живой клетке связывалась с Hsp60 в неуложенном состоянии. Таким образом, белки группы Hsp60 должны были способствовать укладке этого белка, что уже косвенно влияло и на сборку олигомерных белковых комплексов. Эти результаты, опубликованные в 1989 г., и заложили основу парадигмы шаперон-опосредованного фолдинга полипептидной цепи (по Hartl, 2017).

1.1.2 Семейства молекулярных шаперонов

За время изучения молекулярных шаперонов было выделено несколько основных семейств этих белков. Основными семействами являются Hsp60, Hsp70, Hsp90 и Hsp100. Непосредственно за укладку белков отвечают шапероны групп Hsp60 и Hsp70; представители семейства Hsp90 преимущественно участвуют в стабилизации белковых структур и регуляторных процессах, а Hsp100 ответственны за АТФ-зависимый протеолиз и дезагрегацию (см. обзор Saibil, 2013). Далее мы более подробно остановимся на представителях указанных групп шаперонов, преимущественно фокусируясь на системах, работа которых изучается в настоящем исследовании - Hsp70 и Hsp100.

Система Hsp70 и Hsp40. Белки группы Hsp70 играют одну из ключевых ролей в процессах фолдинга белка как у прокариот, так и у эукариот. Hsp70 способствуют ко- или посттрансляционному фолдингу новосинтезированной белковой цепи, транслокации белков через мембраны органелл, а также определяют судьбу неправильно уложенных белковых молекул или белковых агрегатов (Рис. 1, Mayer, Gierasch, 2019). Шапероны этой группы представляют из себя доминирующую фракцию шаперонов в клетке. В геноме большинства живых организмов присутствует несколько паралогичных генов, кодирующих белки этой группы. Так, в геноме человека присутствуют около 17 генов, кодирующих Hsp70, у дрожжей *S. cerevisiae* — 14, а у риса — 26 (Powers, Balch, 2013; Kominek *et al.*, 2013). Как и другие основные группы молекулярных шаперонов, Hsp70 обладают АТФазной активностью. Гидролиз АТФ необходим белкам этой группы для эффективного взаимодействия с белками-клиентами¹.

Белки семейства Hsp70 характеризуются молекулярной массой около 70 кДа и состоят из двух основных доменов — нуклеотид-связывающего (АТФазного) домена (nucleotide-binding domain, NBD) и субстрат-связывающего домена (substrate-binding domain, SBD), а также небольшого С-концевого домена с неизвестной функцией (Vertelsen *et al.*, 2008). NBD отвечает за связывание АТФ и АТФазную активность шаперона, его укладка во многом похожа на укладку других АТФаз, таких как актин или гексокиназа (по Saibil, 2013). SBD непосредственно участвует в связывании белка-

¹Термины «клиент» и «субстрат» часто используются как синонимы по отношению к белкам, на которые направлена активность шаперонов.

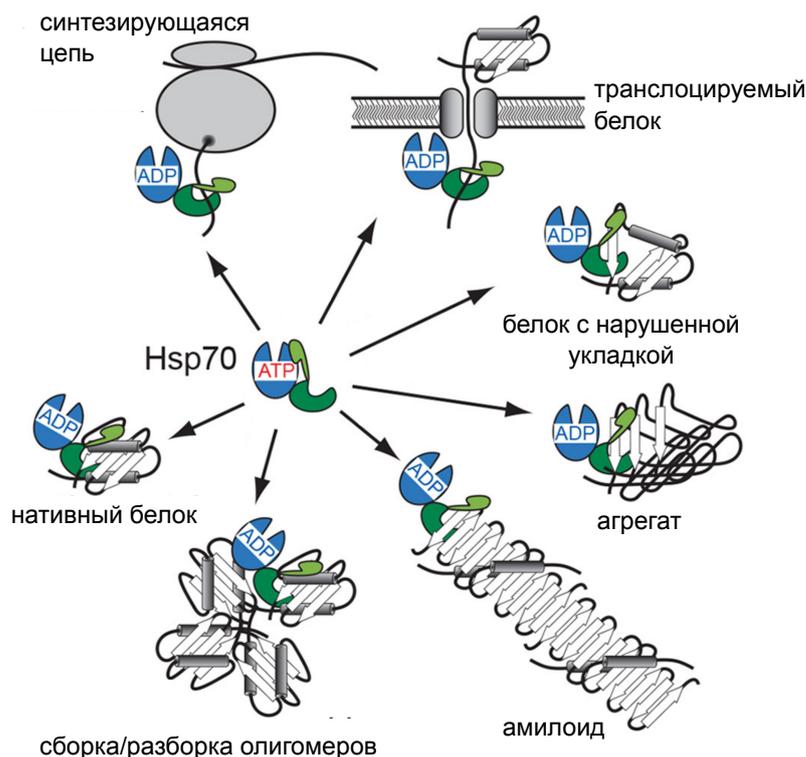


Рисунок 1. Схема процессов, регулируемых молекулярными шаперонами системы Hsp70/Hsp40. Адаптировано из (Mayer, Gierasch, 2019).

клиента, взаимодействие с которым происходит в специальной бороздке (cleft). Структура SBD состоит из двух важных элементов - основная часть домена имеет укладку « β -сэндвича» и обозначается как SBD β , в то время как вторая часть имеет α -спиральную структуру (Zhu *et al.*, 1996). SBD α соединен с SBD β подвижным участком и представляет из себя «крышку» (lid), которая играет важную роль в осуществлении функции Hsp70. При связывании субстрата в бороздке SBD и активации АТФазы Hsp70 происходят конформационные изменения в молекуле шаперона, что приводит к изменению положения крышки относительно SBD и ее «захлопыванию». Этот процесс обеспечивает надежное взаимодействие с субстратом и препятствует его преждевременной диссоциации. Напротив, замена АДФ на АТФ в NBD приводит к высвобождению субстратного белка (Рис. 2).

Гидролиз АТФ при связывании субстрата и высвобождение субстрата при замене нуклеотида регулируется кофакторами Hsp70, J-белками (Hsp40) и факторами обмена нуклеотидов (nucleotide exchange factors, NEF). Hsp40 стимулируют АТФазную активность Hsp70 при взаимодействии с клиентным белком, тем самым делая процесс захва-

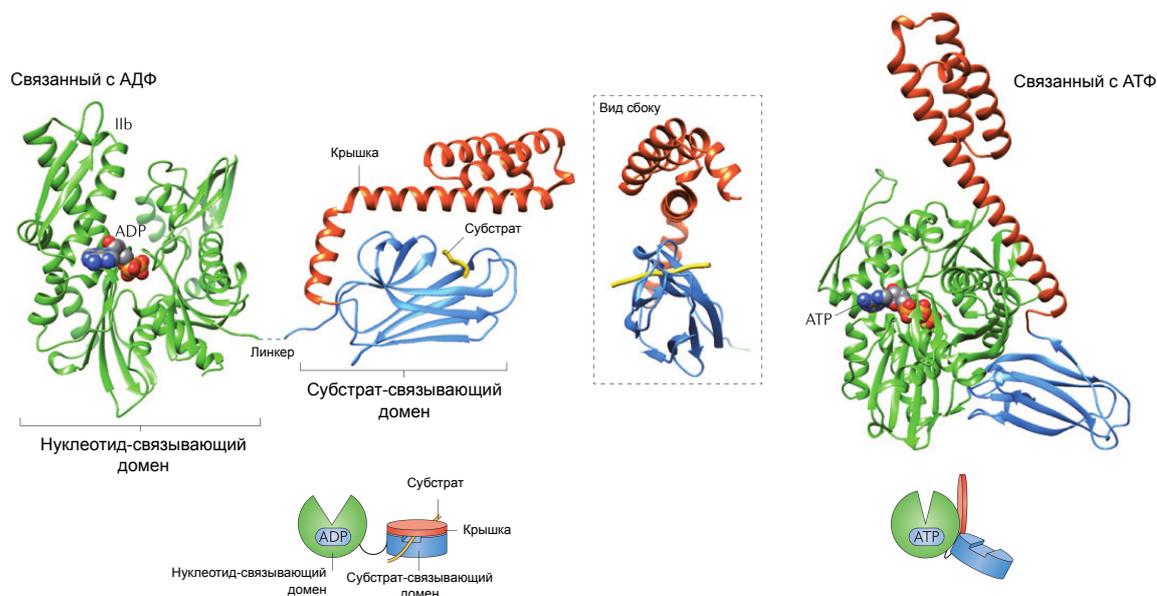


Рисунок 2. Структура шаперонов Hsp70. Показана пространственная структура (вверху) и схематическое изображение (внизу) молекулы Hsp70 в состоянии, связанном с АТФ (справа) или АДФ (слева) (модифицировано из Saibil, 2013).

та клиента более эффективным (Рис. 3А). Белки группы Hsp40 (называемые также белками с J-доменом или J-белками от названия первого охарактеризованного представителя группы Hsp40 - бактериального белка DnaJ) играют важнейшую роль в определении субстратной специфичности шаперонов группы Hsp70 (по Craig, Marszalek, 2017; Kampinga, Craig, 2010). Неудивительно, что количество генов, кодирующих Hsp40, в геномах про- и эукариот значительно превышает количество генов Hsp70 (например, у человека таких генов 41, а у риса — 125 (Powers, Balch, 2013))

Основными доменами, присутствующими в структуре Hsp40, являются вышеупомянутый J-домен и субстрат-связывающий домен. J-домен отвечает за взаимодействие с Hsp70 и активацию АТФазы (Greene *et al.*, 1998); критическую роль в этом процессе играют три высококонсервативных остатка в последовательности J-домена, формирующих HPD-мотив (Tsai, Douglas, 1996). В ходе стимуляции АТФазной активности HPD-мотив взаимодействует с линкером в составе Hsp70, а сам J-домен также взаимодействует с NBD и SBD β (Kityk *et al.*, 2018). В большинстве случаев, J-домен располагается на N-конце белка, а субстрат-связывающий домен - на C-конце, за счет чего часто обозначается как CTD (C-terminal domain). В связи с большим разнообразием J-белков

их разделяют на несколько групп. Согласно одной из распространенных классификаций, J-белки можно разделить на три класса (Рис. 3Б). Белки классов А и В содержат в своей структуре (от N-конца к С-концу) J-домен, домен, богатый глицином и фенилаланином (G/F-домен), два идущих подряд клиент-связывающих домена (CTDI и CTDII,

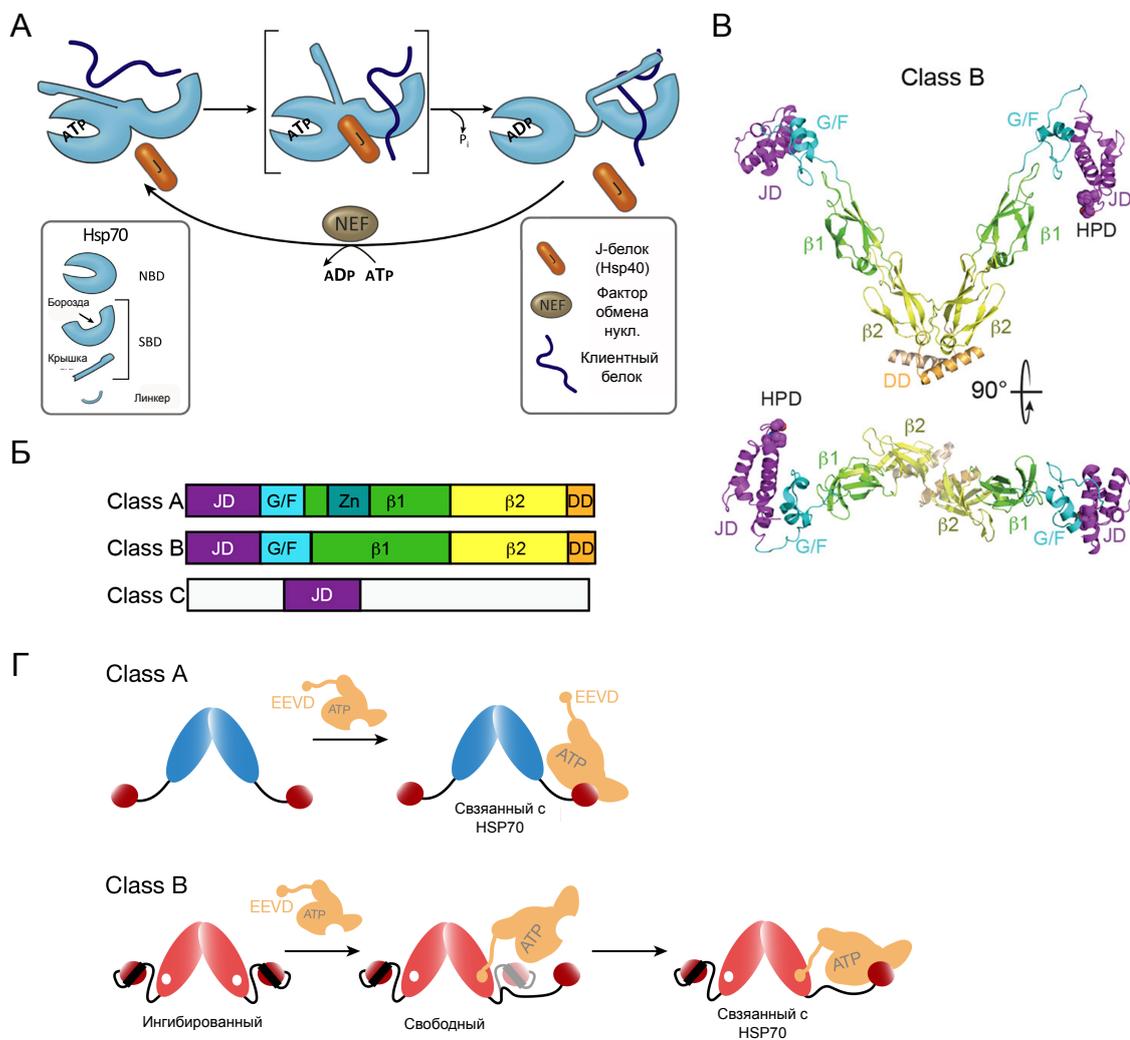


Рисунок 3. Структура и функции кошаперонов группы Hsp40 (J-белков). **А.** Схема, иллюстрирующая цикл активности Hsp70 и участие в нем J-белков (адаптировано из Craig, Marszalek, 2017). **Б.** Доменная структура J-белков трех основных классов (А, В, С). JD - J-домен, G/F - домен, обогащенный глицином и фенилаланином, β_1 и β_2 - клиент-связывающие домены (CTDI и CTDII), DD - димеризационный домен. **В.** Модель трехмерной структуры J-белка класса В. HPD - мотив из аминокислотных остатков гистидина, пролина и аспарагиновой кислоты, критически важный для активности J-домена. (Б, В) адаптировано из Mayer, Gierasch, 2019. **Г.** Схема взаимодействия Hsp70 с Hsp40 класса А (вверху) и класса В (внизу). Для класса В показано высвобождение J-домена от G/F-ингибирования (по Faust *et al.*, 2020).

или β_1 и β_2), а также димеризационный домен (CTD). Белки класса А отличаются от класса В наличием в составе CTDI Zn^{2+} -связывающего региона, а также сравнительно меньшей длиной G/F-домена. Представители третьего класса J-белков (класс С) имеют достаточно разнообразную структуру, причем J-домен в этой структуре может располагаться в различных участках белка, а не на N-конце (Mayer, Gierasch, 2019).

Важным функциональным отличием некоторых белков класса В является наличие особого механизма регуляции, называемом G/F-ингибированием (Faust *et al.*, 2020). При взаимодействии с клиентом J-домен у таких белков остается неспособным активировать АТФазу Hsp70 за счет того, что его взаимодействие с NBD Hsp70 ингибировано G/F-доменом. Для освобождения от этого ингибирования необходимо взаимодействие CTD J-белка с EEVD-мотивом Hsp70 (Рис. 3Г). Только после этого взаимодействия возможно связывание J-домена с Hsp70 и активации АТФазы. Стоит заметить, что процесс G/F-ингибирования важен как для рефолдинга белков, так и для дезагрегации амилоидов (Faust *et al.*, 2020). Это согласуется с данными о том, что EEVD-мотив Hsp70, отвечающий за освобождение от G/F-ингибирования, высококонсервативен, а его изменение негативно влияет на АТФазную активность Hsp70, его связывание с клиентом, а также на способность системы Hsp40/Hsp70 осуществлять рефолдинг (Freeman *et al.*, 1995). Наличие механизма G/F-ингибирования может играть важную роль в обеспечении специфичности J-белков — в частности, в их предпочтительном взаимодействии с амилоидными агрегатами у высших эукариот (пример селективности показан в Scior *et al.*, 2018).

Некоторые исследователи отмечают недостатки такой классификации J-белков (Craig, Marszalek, 2017). Так, многие неродственные по происхождению J-белки, сильно отличающиеся по последовательности, оказываются отнесены к одному классу. В частности, это характерно для третьего класса (С), в котором объединены все белки, не несущие N-концевой J-домен и G/F-богатый домен. В связи с подобными неточностями, присутствует необходимость в разработке иной классификации J-белков. Например, основой для выделения подгрупп может являться наличие характерных структурных элементов, таких как клиент-связывающий домен со структурой β -бочонка (пример структуры такого белка, относящегося к классу В по традиционной классификации, представлен на Рис. 3В). Помимо структуры, для разделения J-белков на группы

можно использовать клиент-специфичность. Например, среди J-белков можно выделить белки с низкой субстратной специфичностью, взаимодействующие с различными клиентами, так и с конкретным белком или группой белков (Kampinga, Craig, 2010; Craig, Marszalek, 2017). Примером J-белка со специфичным клиентом является ауксиллин (Swa2 у дрожжей), участвующий в процессе удаления молекул клатрина с поверхности везикул (Krantz *et al.*, 2013; Rosenzweig *et al.*, 2019).

Успешному протеканию шаперонного цикла Hsp70 также способствуют факторы обмена нуклеотидов (см. обзор Rosenzweig *et al.*, 2019). Эти белки стимулируют высвобождение АДФ, после чего происходит связывание новой молекулы АТФ и диссоциация клиента. NEF можно разделить на четыре основных семейства, характеризующиеся различной структурой и происхождением. У прокариот функции NEF выполняют белки, гомологичные GrpE *E. coli*; у эукариот же NEF представлены тремя семействами: HSP110, Bag и Armadillo. Интересно, что белки группы Hsp110 (Sse1 у дрожжей) являются гомологами шаперонов Hsp70 и имеют похожую пространственную структуру (Liu, Hendrickson, 2007). Замена нуклеотида при взаимодействии Hsp110 и Hsp70 обеспечивается прямым взаимодействием их NBD (Schuermann *et al.*, 2008).

Семейство Hsp100 и их роль в дезагрегации. Белки семейства Hsp100, в отличие от шаперонов иных семейств, специализируются на разворачивании (unfolding) белковых молекул и принимают участие в АТФ-зависимом протеолизе (см. обзор Saibil, 2013). В отличие от белков системы Hsp40/Hsp70, гены, кодирующие Hsp100, есть не у всех организмов и представлены единичными копиями (Powers, Balch, 2013). Hsp100 относятся к суперсемейству AAA+ (АТФаз, ассоциированных с разнообразными клеточными активностями), которое включает в себя большое количество белков, присутствующих у всех организмов (Snider *et al.*, 2008). Хорошо изучены такие представители группы Hsp100 как ClpA, ClpB, HslUV и Hsp104. Примером белков Hsp100, принимающих участие в протеолитической деградации белков, является HslU *E. coli*, а также шапероны ClpA, ClpC и ClpX, работающие в комплексе с протеазой ClpP (Duran *et al.*, 2017). Комплекс HslUV, осуществляющий АТФ-зависимый протеолиз, состоит из двух колец — АТФ-азного, формируемого шапероном HslU, и протеазного, состоящего из молекул HslV (Wang *et al.*, 2001). Кольцо HslU отвечает за разворачивание белковых

молекул перед их взаимодействием с протеазой. Каждое из колец характеризуется гексамерной структурой; такая форма является характерной для белков суперсемейства AAA+ (Snider *et al.*, 2008). В середине кольца располагается центральный канал (пора), выстланный петлевыми доменами шаперона, участвующими во взаимодействии с субстратом.

В отличие от других белков группы Hsp100, участвующих в АТФ-зависимом протеолизе, белки Hsp104 дрожжей *S. cerevisiae* и ClpB бактерий *E. coli* характеризуются уникальной способностью к дезагрегации (см. обзор Shorter, Southworth, 2019). Как и другие представители семейства, ClpB и Hsp104 формируют кольцевые гексамеры, мономеры которых образуют центральную пору шаперона (Duran *et al.*, 2017) (Рис. 4). Мономер дрожжевого Hsp104 состоит из нескольких основных доменов: N-терминальный домен (NTD), первый нуклеотид-связывающий домен (NBD1), средний домен (middle domain, MD), второй нуклеотид-связывающий домен (NBD2) и С-терминальный домен

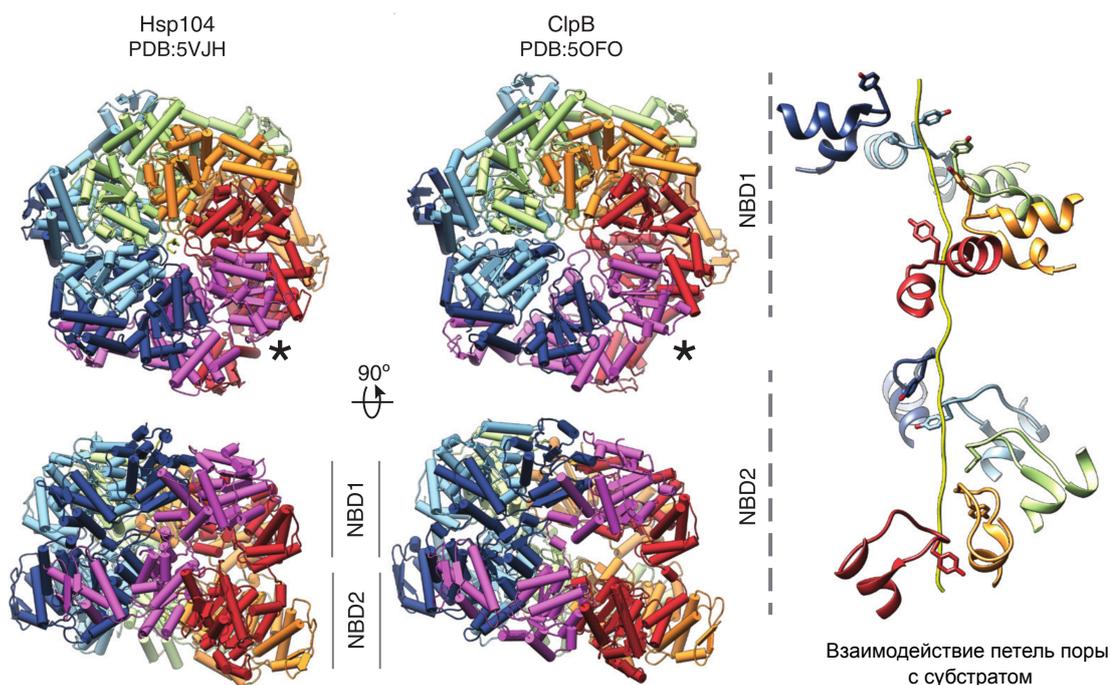


Рисунок 4. Пространственная структура дезагрегаз Hsp104 и ClpB. Показаны модели структуры Hsp104 (слева) и ClpB (в центре). Приведен вид сверху и вид сбоку. NBD1, NBD2 — нуклеотид-связывающие домены 1 и 2. Справа — пространственная структура взаимодействия NBD1 и NBD2 Hsp104 с субстратом в полости центрального канала (модифицировано из Shorter, Southworth, 2019).

(CTD). В составе NBD1 и NBD2 располагаются высококонсервативные мотивы Walker A и B и ряд других структур, необходимых для гидролиза АТФ (Sweeny, Shorter, 2016). NBD1 и NBD2 также формируют и основной канал Hsp104 (Рис. 4, справа). В ходе дезагрегации, гексамер Hsp104 перемещается вдоль белковой цепи за счет скоординированных движений отдельных протомеров. Движение одного из протомеров вниз по оси субстрата сопровождается активацией соседнего протомера и его перемещением вверх по оси субстрата. Аналогичные движения затем совершаются следующей парой протомеров в гексамере (такой механизм получил название «трещотки» (Gates *et al.*, 2017)). Движения являются АТФ-зависимыми и обеспечиваются активностью NBD1. N-концевой домен белков семейства Hsp100, скорее всего, выступает в роли регуляторного элемента («крышки»), способного блокировать доступ в основной канал шаперона после связывания субстрата (такая блокировка показана для ClpB (Deville *et al.*, 2017)). Помимо этого, NTD также принимают участие во взаимодействии Hsp104 и ClpB с шаперонами других групп, в частности, с Hsp70 (Lee *et al.*, 2017). Это указывает на роль NTD в общем контроле взаимодействия шаперона с субстратом. Регуляторная функция характерна и для NTD других представителей семейства Hsp100 — например, ClpA (Cranz-Mileva *et al.*, 2008).

Иные группы шаперонов. Говоря о молекулярных шаперонах и их роли в контроле качества белка, нельзя обойти вниманием представителей двух важных семейств - Hsp60 и Hsp90. Белки группы Hsp60, называемые также шаперонинами, разделяются на две группы, первая из которых включает бактериальные белки GroE, а вторая — эукариотические шаперонины CCT (см. обзор Saibil, 2013). Шаперонины играют важную роль как в фолдинге белков *de novo* и сборке белковых комплексов, так и в рефолдинге поврежденных белков (Hemmingsen *et al.*, 1988; Goloubinoff *et al.*, 1989).

Hsp60, как и Hsp100, формируют комплексы в виде кольца, а каждое кольцо представлено семью и более мономерами. Так, бактериальный Hsp60, GroEL, формирует двойное кольцо молекулярным весом более 800 кДа, которое связывает субстрат в центре кольца. Другая субъединица шаперонинного комплекса, GroES, связывается с GroEL, формируя «крышку» (lid), изолирующую внутреннее пространство и субстрат (Martin *et al.*, 1993). Таким образом, шаперонин формирует изолированное простран-

ство («клетку Анфинсена»), позволяющее субстрату проходить спонтанный процесс фолдинга или оставаться в неуложенном состоянии в полости шаперонина.

В отличие от шаперонинов Hsp60, основной функцией белков группы Hsp90, по-видимому, является не обеспечение фолдинга *de novo* или рефолдинга, а регуляция внутриклеточных процессов за счет стабилизации белковых структур и обеспечения созревания белков-клиентов (см. обзоры Taipale *et al.*, 2010; Saibil, 2013). Количество генов, кодирующих белки семейства Hsp90, у разных организмов значительно ниже, чем для Hsp70 (Powers, Balch, 2013). Hsp90 принимает участие в регуляции передачи сигнала стероидными гормонами за счет взаимодействия с соответствующими рецепторами. Отмечена также функция Hsp90 в стабилизации укладки белков с измененной последовательностью, компенсирующая тем самым негативные эффекты мутаций. Наиболее удивительный пример такой «буферизации» показан в исследованиях потери глаз у пещерных рыб (Rohner *et al.*, 2013).

Цикл активности Hsp90 также сопряжен с гидролизом АТФ. Гидролиз АТФ и замена нуклеотидов сопровождаются значительными конформационными изменениями в молекуле шаперона. Большую роль в выполнении Hsp90 своих функций играют кошапероны, способствующие связыванию клиентов и взаимодействующие с шапероном в различных его участках (Taipale *et al.*, 2010).

1.2. Прионы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

1.2.1 Прионы и амилоиды

Прионы были открыты как инфекционные агенты белковой природы, представляющие из себя самовоспроизводящиеся конформационные варианты нативных белков. Гипотеза о том, что белковые молекулы могут иметь инфекционные свойства, была предложена Прузинером для объяснения механизмов возникновения некоторых заболеваний человека и животных, объединяемых в группу инфекционных губчатых энцефалопатий (Prusiner, 1982). К 1982 г. накопилось достаточно данных, свидетельствующих, что инфекционный агент, вызывающий подобные заболевания, имеет невероятно малые размеры, устойчив к кипячению, обработке нуклеазами и ультрафильтрации, и, следовательно, не является ни бактерией, ни вирусом, ни любым другим известным на тот момент патогеном, а также не содержит нуклеиновых кислот. Для объяснения

наблюдаемой картины Прузинер предложил гипотезу о том, что субстанция, вызывающая такие заболевания как болезнь Крейтцфельда-Якоба, куру или скрэпи, является белковой молекулой (прионом), способной к воспроизведению собственной структуры за счет изменения конформации таких же белковых молекул в заражаемом организме.

Позднее было установлено, что все описанные заболевания связаны с нарушениями конформации одного белка - PrP, а специфическая симптоматика каждого заболевания определяется тем, какую конформацию принимает PrP. Было показано, что в мозге пораженных организмов накапливаются специфические фибриллярные структуры, формируемые белком PrP (Merz *et al.*, 1984). Позднее похожие структуры, формируемые другими белками, были обнаружены при таких нейродегенеративных заболеваниях человека, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона. Эти заболевания не являются инфекционными, но также характеризуются накоплением белковых бляшек в мозге (по Uversky, 2010).

Агрегаты, обнаруженные в мозге больных прионными заболеваниями, имеют амилоидную природу. Амилоиды характеризуются высокоупорядоченной структурой, в которой соседние мономеры белка в агрегате соединены друг с другом за счёт межмолекулярных водородных связей (подробнее см. обзоры Wickner *et al.*, 2013; Iadanza *et al.*, 2018; Matiiv *et al.*, 2022). Мономеры в составе типичной амилоидной фибриллы образуют «стерическую застёжку» — тесно связанную контактную поверхность, сформированную боковыми радикалами аминокислотных остатков. За счет такого плотного контакта мономеров амилоиды также приобретают ряд характерных свойств, такие как устойчивость к обработке детергентами и протеазами. Амилоидные агрегаты также окрашиваются рядом амилоид-специфических красителей, таких как конго красный и тиофлавин Т (см. обзор Matiiv *et al.*, 2020).

Так как и прионные болезни, и вышеупомянутые неинфекционные нейродегенеративные заболевания сопровождаются образованием амилоидных агрегатов все эти болезни были объединены в группу амилоидозов, а соответствующие агрегаты объединяются в группу патологических амилоидов (см. обзор Matiiv *et al.*, 2020). В то же время, за последние годы было охарактеризовано большое количество белков, формирующих амилоидные агрегаты при нормальных условиях; для некоторых из белков была показана функциональная важность таких амилоидных агрегатов (см. обзор

Sergeeva, Galkin, 2020). Одним из примеров может являться белок Fxr1 крысы *Rattus norvegicus*, формирующий амилоиды в мозге. Предполагается, что эти агрегаты регулируют стабильность РНК (Sorova *et al.*, 2019).

На данный момент не существует эффективных методов лечения амилоидозов человека и животных. Кроме того, неизвестны свойства, отличающие патологические амилоидные агрегаты от функциональных. Для решения этой проблемы, а также для создания подходов к терапии амилоидозов, прионы и амилоиды активно изучаются в модельных биологических системах, в том числе, и в дрожжах *S. cerevisiae*. Как и у высших эукариот, у дрожжей обнаружены как прионы, так и неинфекционные функциональные амилоиды (подробнее см. Ryzhova *et al.*, 2018).

1.2.2 Разнообразие и свойства прионов дрожжей

Прионы пекарских дрожжей были обнаружены еще в середине XX века. В отличие от прионов человека и других млекопитающих, прионоподобные детерминанты дрожжей были описаны как цитоплазматические наследственные факторы неизвестной природы, характеризующиеся доминантным неменделевским наследованием (подробнее см. Liebman, Chernoff, 2012; Crow, Li, 2011). Первым таким фактором стал Ψ ($[PSI^+]$), открытый Коксом в 1965 г.. Этот фактор характеризовался омнипотентным нонсенс-супрессорным фенотипом, т.е. способностью подавлять фенотипическое проявление нонсенс-мутаций (Cox, 1965). На тот момент природу данного фактора установить не удалось. Вторым открытым прионом дрожжей стал фактор $[URE3]$, описанный Лакру в 1971 г. (Lacroute, 1971). Клетки, несущие $[URE3]$, могли усваивать бедные источники азота, такие как уреидосукцинат, в присутствии более богатых, например, ионов аммония (NH_4^+).

В 1994 г. Викнер использовал гипотезу Прузинера для объяснения природы факторов Ψ и $[URE3]$ (Wickner, 1994). Викнер сформулировал основные генетические критерии, необходимые для доказательства прионной природы фактора: 1) фенотипическое проявление фактора совпадает с фенотипом делеции его структурного гена или его мутации; 2) фактор подвергается обратимому излечению, т.е. клетка, потерявшая прионный фактор, может вновь приобрести его без внешних воздействий; и 3) временная сверхэкспрессия структурного гена прионного фактора увеличивает частоту его воз-

никновения (Wickner, 2012).

Белки, являющиеся структурными детерминантами прионов [*PSI⁺*] и [*URE3*], давно установлены. Прион [*PSI⁺*] является альтернативным конформационным вариантом фактора терминации трансляции eRF3 дрожжей, Sup35. Нонсенс-супрессия, наблюдаемая при переходе Sup35 в прионную форму, возникает следующим образом: при прионизации Sup35 концентрация его нормальной формы снижается, в результате чего не происходит эффективной стимуляции активности другого фактора терминации, eRF1 (Sup45). Как следствие, понижается эффективность терминации трансляции, что приводит к увеличению частоты прочтения преждевременных стоп-кодонов как значащих. В результате этого процесса увеличивается частота синтеза полноразмерного функционального продукта гена, содержащего нонсенс-мутацию, что ведет к супрессии её фенотипического проявления (по Liebman, Chernoff, 2012). При этом комбинация приона [*PSI⁺*] с определенными миссенс- и нонсенс-мутациями *sup45* приводит к слишком сильным дефектам терминации трансляции, вызывающим синтетическую летальность (Kiktev *et al.*, 2007).

Структурным геном детерминанта [*URE3*] является ген *URE2*, кодирующий фактор катаболитной репрессии. В норме, при наличии в среде богатых источников азота, Ure2 ингибирует активность транскрипционного фактора Gln3, активирующего работу генов ассимиляции уреидосукцината. При переходе Ure2 в прионную форму он не способен препятствовать активности Gln3, что приводит к активации генов ассимиляции уреидосукцината и его потреблению из среды даже при наличии более эффективных источников азота (Wickner, 1994).

Как и соответствующие белки высших эукариот, прионогенные белки дрожжей при переходе в прионную конформацию формируют длинные неразветвленные фибриллы, которые имеют амилоидную структуру и набор характерных свойств. Наличие таких белковых агрегатов можно установить при помощи полуденатурирующего электрофореза в агарозном геле (SDD-AGE) (Kryndushkin *et al.*, 2003), а также по увеличению доли белка в осадочной фракции при дифференциальном центрифугировании клеточных лизатов (Patino *et al.*, 1996; Kushnirrov *et al.*, 2006). Скопления агрегированного белка можно также наблюдать при флуоресцентной микроскопии (Patino *et al.*, 1996). Важно, что для агрегации структурного белка прионного детерминанта чаще всего необ-

ходим не весь белок, а его участок, называемый также прионным доменом (Ross *et al.*, 2005). В белке Sup35 этот домен, носящий название N-домена, находится на N-конце полипептидной цепи (Ter-Avanesyan *et al.*, 1993; Ter-Avanesyan *et al.*, 1994; Paushkin *et al.*, 1996). Помимо N-домена, в структуре Sup35 имеются также еще два домена, заряженный М-домен (middle, средний домен) и С-домен (С-концевой). М-домен является линкерным и не принимает участие в непосредственном формировании остова амилоидной фибриллы. Физиологической функцией М-домена, по-видимому, является регуляция формирования обратимых жидких скоплений Sup35 при изменении рН или солевого состава цитоплазмы (Franzmann *et al.*, 2018). С-домен является единственным жизненно важным участком Sup35. Именно С-домен ответственен за функционирование Sup35 как фактора терминации трансляции (Zhouravleva *et al.*, 1995; Stansfield *et al.*, 1995). Сверхпродукции только N-домена Sup35 достаточно для индукции [*PSI*⁺] (Derkatch *et al.*, 1996). Аналогичным образом, сверхэкспрессия фрагмента гена *URE2*, соответствующего прионному домену белка Ure2, приводит к увеличению частоты образования [*URE3*] (Masison, Wickner, 1995). Интересной структурной особенностью большинства известных прионных доменов дрожжевых белков является их обогащенность остатками аспарагина (N) и глутамина (Q) (Alberti *et al.*, 2009). Критическая роль этих остатков в формировании прионных агрегатов была обнаружена еще в 1998 г. (DePace *et al.*, 1998). Такой аминокислотный состав способствует формированию межмолекулярных водородных связей, необходимых для образования параллельной суперскладчатой β -структуры амилоидных фибрилл (см. обзор Matiiiv *et al.*, 2022). Заметим, однако, что описанные в литературе мутации, влияющие на поддержание дрожжевых прионов, располагаются как в прионных доменах соответствующих белков, так и далеко за их пределами (например, Kumar *et al.*, 2020).

Третьим по степени изученности можно считать прион [*PIN*⁺] (Derkatch *et al.*, 1997), образованный амилоидной формой белка Rnq1 (Sondheimer, Lindquist, 2000, Derkatch *et al.*, 2001). Единственным фенотипическим проявлением [*PIN*⁺] является его способность индуцировать [*PSI*⁺]: присутствие [*PIN*⁺] в клетке дрожжей повышает частоту появления приона [*PSI*⁺] (Derkatch *et al.*, 1997). В отличие от описанных выше прионных факторов, физиологическая функция белка Rnq1 неизвестна, а мутация или делеция гена *RNQ1* не приводит к увеличению частоты индукции [*PSI*⁺] (Derkatch

et al., 2001). Еще один известный прион дрожжей - $[SWI^+]$, прионная форма субъединицы комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF, Swi1 (Du *et al.*, 2008). Фенотипически наличие приона $[SWI^+]$ характеризуется сниженной способностью дрожжей к росту на средах с сахарами, отличными от глюкозы (например, с раффинозой), но в комбинации с прионом $[PIN^+]$, $[SWI^+]$ способен, так же как и $[PSI^+]$, приводить к усилению нонсенс-супрессии на определенном генетическом фоне (Nizhnikov *et al.*, 2016). Интересной чертой приона $[SWI^+]$ является его непосредственное влияние на конформацию взаимодействующих с ним транскрипционных факторов, что, в свою очередь, регулирует экспрессию генов в зависимости от $[SWI^+]$ -статуса клетки. Такой прион-зависимой регуляции подвержены, например, гены, ответственные за флокуляцию и инвазивный рост дрожжевых колоний (Du *et al.*, 2015). Появление приона $[SWI^+]$ приводит к глобальным изменениям транскриптома (Malovichko *et al.*, 2019). Помимо описанных выше, открыты также и другие прионы и прионоподобные факторы дрожжей, обладающие не менее интересными свойствами. Одним из интересных примеров является фактор $[GAR^+]$, который не имеет амилоидной структуры (по Crow, Li, 2011). Появление фактора $[GAR^+]$ обусловлено возрастанием в среде концентрации молочной кислоты, происходящее, например, при совместном росте культур дрожжей и бактерий (Garcia *et al.*, 2016).

Важным свойством дрожжевых прионов является существование так называемых штаммов, или вариантов приона (см. обзор Kushnirov *et al.*, 2022). Наличие разнообразных вариантов не является уникальной особенностью прионов дрожжей — варианты охарактеризованы, например, для белка PrP млекопитающих (см. обзор Ghaemmaghami, 2017). Разные варианты приона характеризуются различной силой фенотипического проявления, связанной со специфической конформацией белка в составе амилоидных фибрилл, а также различной кинетикой их образования и фрагментации (Derkatch *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 2004). Различия в структуре агрегатов вариантов приона проявляются и при анализе протеазо-устойчивого кора фибриллы при помощи масс-спектрометрии (Kushnirov *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2021). Для приона $[PSI^+]$ известно более 20 различных вариантов (Huang, King, 2020). Наиболее часто различают так называемые «сильные» (strong) и «слабые» (weak) варианты, обозначаемые как $[PSI^+]^S$ и $[PSI^+]^W$, соответственно (Derkatch *et al.*, 1996). Установлено, что более силь-

ное проявление фенотипа $[PSI^+]^S$ связано с усиленной конверсией растворимого белка в прионную изоформу и включение его в агрегаты. Это происходит, в том числе, за счет большего количества амилоидных фибрилл в клетке и их меньшего размера. Слабый вариант $[PSI^+]^W$ имеет, напротив, большую среднюю длину агрегатов в совокупности с меньшим их количеством. Как следствие, доля белка в растворимой фракции в клетках $[PSI^+]^W$ заметно выше и достигает 20%, по сравнению с 3-5% в случае $[PSI^+]^S$ (Derdowski *et al.*, 2010). Высказано предположение, что прионы дрожжей существуют в виде динамического «облака вариантов», т.е. в клетке одновременно присутствует ряд агрегатов различной структуры, хотя данная концепция не является общепринятой (Bateman, Wickner, 2013).

1.3. Система контроля качества белков и прионы дрожжей

Поддержание и распространение прионов дрожжей невозможно без нескольких ключевых процессов: постоянной конверсии новых мономеров и их включения в состав существующих агрегатов, фрагментации агрегатов с формированием новых прионных «семян» (пропагонов), а также передачи прионных семян в дочерние клетки (Kushnirov, Ter-Avanesyan, 1998; Inoue, 2009; Chernova *et al.*, 2014; Barbitoff *et al.*, 2022). Совокупность этих процессов формирует жизненный цикл приона (Рис. 5А). Все процессы, входящие в жизненный цикл приона, в той или иной степени опосредованы взаимодействием приона с системой молекулярных шаперонов или иными компонентами системы контроля качества белка. Данные, полученные как *in vivo*, так и *in vitro*, свидетельствуют о роли шаперонов как в процессе формирования прионных агрегатов и прионной конверсии, так и в фрагментации амилоидных фибрилл (Chernoff *et al.*, 1999; Kushnirov *et al.*, 2000; Shorter, Lindquist, 2004; Krzewska, Melki, 2006; Shorter, Lindquist, 2006; Savistchenko *et al.*, 2008; Shorter, Lindquist, 2008; Kiktev *et al.*, 2015). Далее мы детально рассмотрим роль основных шаперонов в поддержании прионов дрожжей.

1.3.1 Hsp104 — ключевой регулятор поддержания прионов

Основным элементом системы молекулярных шаперонов, необходимым для поддержания дрожжевых прионов, является Hsp104, катализирующий фрагментацию прионных агрегатов. Участие Hsp104 в процессе «размножения» дрожжевого приона

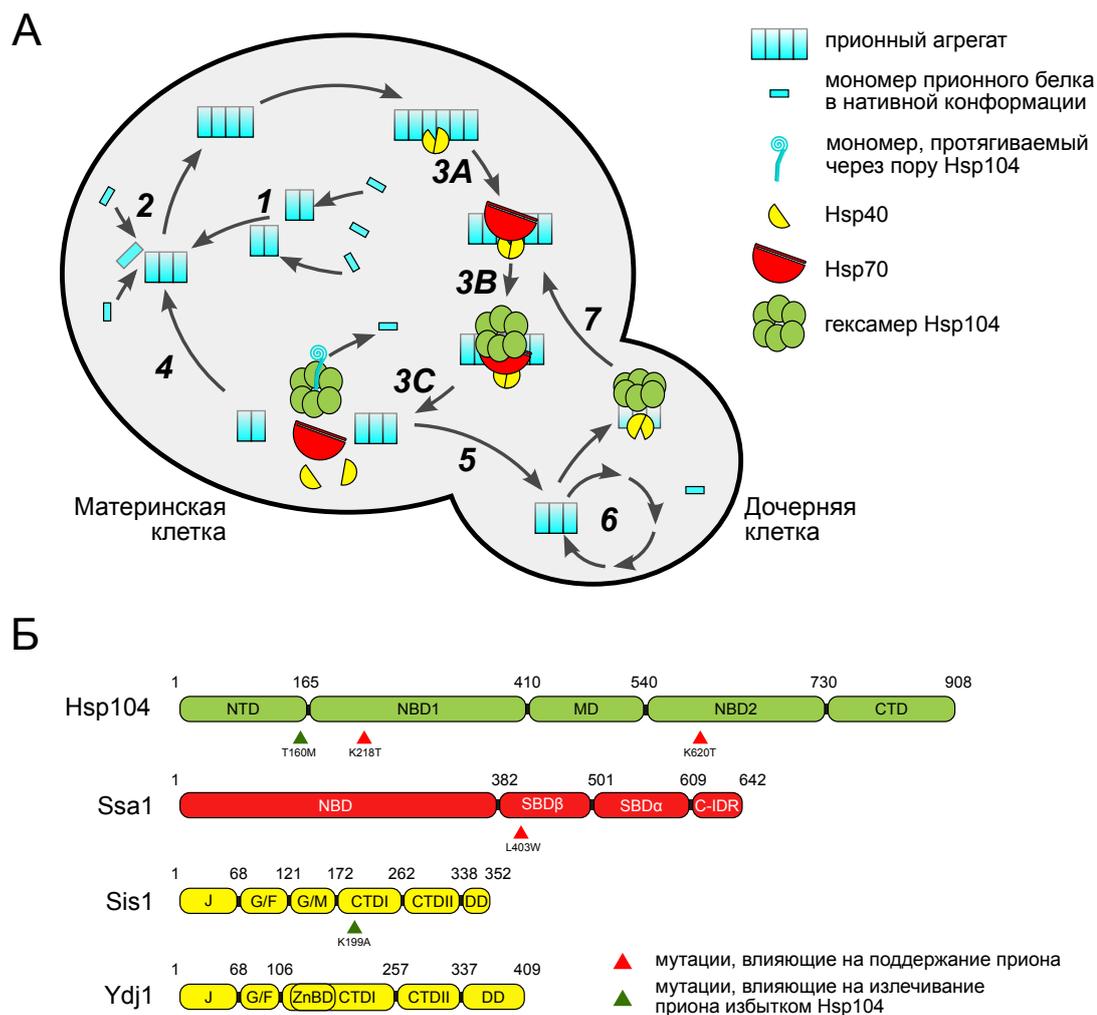


Рисунок 5. Жизненный цикл прионов дрожжей и его контроль системой молекулярных шаперонов. **А.** Схема процессов, формирующих жизненный цикл приона. 1—формирование прионного агрегата *de novo*, 2—конверсия новых мономеров и их включение в существующие прионные агрегаты, 3—шаперон-опосредованная фрагментация агрегатов, 4—продолжение цикла в материнской клетке, 5—передача прионных семян в дочерние клетки, 6—повторение цикла в дочерней клетке, 7—ретроградный транспорт пропагонов или их удержание в материнской клетке. **Б.** Схематичное изображение основных шаперонов, вовлеченных в контроль поддержания приона, и их доменной структуры. Красными стрелками обозначены мутации, нарушающие поддержание приона, зелёными — мутации, препятствующие излечению приона сверхэкспрессией *HSP104* (адаптировано из Barbitoff *et al.*, 2022).

[*PSI*⁺] было продемонстрировано Черновым с соавторами в 1995 г. (Chernoff *et al.*, 1995). Делеция *Hsp104*, экспрессия доминантно негативной аллели *Hsp104KT*, а также ингибирование АТФ-азной активности *Hsp104* при помощи гидрохлорида гуани-

дина, приводит к потере всех амилоидных дрожжевых прионов (Chernoff *et al.*, 1995; Moriyama *et al.*, 2000; Sondheimer, Lindquist, 2000; Wegrzyn *et al.*, 2001). При сверхэкспрессии Hsp104 также наблюдается изгнание прионов, однако это изгнание достаточно эффективно только для [*PSI*⁺] (Chernoff *et al.*, 1995; Sharma, Masison, 2008a; Matveenko *et al.*, 2018).

Механизм излечения прионов при сверхэкспрессии *HSP104* являлся предметом большого количества исследований. Показано, что делеция N-домена *HSP104* препятствует изгнанию приона при сверхэкспрессии этого шаперона, но не препятствует поддержанию приона при нормальных уровнях Hsp104 (Hung, Masison, 2006; Winkler *et al.*, 2012b). Кроме того, мутация T160M, располагающаяся в N-домене *HSP104* (Рис. 5Б), приводит к сходным эффектам; более того, варианты приона [*PSI*⁺], полученные *de novo* на фоне такой мутации, излечиваются даже нормальными уровнями Hsp104 (Gorkovskiy *et al.*, 2017). Предложены три основные модели излечения приона при сверхэкспрессии *HSP104*. Первая модель предполагает, что сверхпродукция Hsp104 искажает соотношение концентраций шаперонов разных групп в цитозоле, что приводит к некорректному взаимодействию Hsp104 с прионным агрегатом (Winkler *et al.*, 2012a). Альтернативная модель предполагает наличие у Hsp104 способности к отщеплению («триммингу») мономеров с конца фибриллы, проявляющейся при его сверхпродукции и ведущей к быстрой разборке прионных агрегатов (Paushkin *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2014). Наконец, третья модель предполагает, что сверхпродукция Hsp104 приводит к нарушению сегрегации пропагонов между материнской и дочерней клетками (Ness *et al.*, 2017; Cox, Tuite, 2018). Существуют, однако, данные, свидетельствующие о потенциальной механистической общности процессов фрагментации агрегатов и излечения приона при избытке Hsp104. В частности, вышеупомянутая мутация T160M способна дестабилизировать некоторые варианты [*PSI*⁺] и нарушать фрагментацию прионных агрегатов (Huang *et al.*, 2021). Наряду с этим, делеция сайта связывания Hsp104 в M-домене Sup35 (участок 129—148 а.к.о.) приводит как к потере чувствительности [*PSI*⁺] к избытку Hsp104, так и к его дестабилизации (Helsen, Glover, 2012).

Интересно также отметить эффекты замены Hsp104 на химерные белки, содержащие некоторые домены Hsp104 и ClpB. Некоторые такие белки эффективно поддержи-

вают прионы дрожжей, но для этого обязательно присутствие М-домена Hsp104 (Reidy *et al.*, 2012). Особый интерес представляет химерный белок 444В, содержащий NBD2 C1pB вместо аналогичного домена Hsp104. Такой вариант способствует поддержанию большинства прионов, но может излечивать только некоторые их варианты при сверхэкспрессии (Zhao *et al.*, 2017).

1.3.2 Роль различных Hsp70 в жизненном цикле прионов дрожжей

Шапероны группы Hsp70 также играют важную роль в поддержании прионов дрожжей (Newnam *et al.*, 1999). У дрожжей Hsp70 представлены несколькими семействами генов, наиболее активными являются белки групп SSA и SSB (Boorstein *et al.*, 1994; Kominek *et al.*, 2013; Lotz *et al.*, 2019). Наибольшую роль в жизненном цикле прионов играют белки группы SSA (Winkler *et al.*, 2012b). У дрожжей существует четыре гомологичных гена, кодирующих шапероны данной группы: *SSA1*, *SSA2*, *SSA3* и *SSA4*. Все эти гены являются взаимозаменяемыми, а их специфичность к различным клеточным процессам изучена слабо (Sharma *et al.*, 2009). Мажорным шапероном группы SSA у дрожжей является белок Ssa2 (Boorstein *et al.*, 1994).

Ssa1, как и другие белки группы Ssa, при своей сверхпродукции повышает частоту индукции $[PSI^+]$ *de novo* и препятствует излечиванию $[PSI^+]$ избытком Hsp104 (Newnam *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2005). Описана доминантно негативная мутация *SSA1*, *SSA1-21*, которая способствует изгнанию приона $[PSI^+]$ (Jones, Masison, 2003), но не влияет на общие функции Ssa1 (Needham, Masison, 2008). Мутация *SSA1-21* располагается в SBD β (Рис. 5Б) и, вероятно, влияет на возможность Hsp70 связываться с клиентом. Эффекты этой мутации на прион, однако, являются вариант-специфическими, так как экспрессия этой аллели не приводит к изменению фенотипа в некоторых штаммах $[PSI^+]$ (Barbitoff *et al.*, 2022). В то же время, было обнаружено, что сверхпродукция Ssa1, но не Ssa2, способствует изгнанию приона $[URE3]$ (Kushnirov *et al.*, 2000; Schwimmer, Masison, 2002). В нашей лаборатории, однако, сверхэкспрессия *SSA2*, но не *SSA1*, ослабляла фенотип $[URE3]$ (Matveenko *et al.*, 2018).

Помимо Ssa, в жизненном цикле прионов дрожжей играют роль и другие Hsp70, такие как Ssb1/2 и Ssz1. И Ssb1, и Ssz1 активно участвуют в фолдинге белка при трансляции и связаны с рибосомой. Ssz1 является частью рибосом-ассоциированного ша-

перонного комплекса (ribosome-associated chaperone complex, RAC). Сверхэкспрессия *SSB1* приводит к усилению дестабилизации [*PSI*⁺]; показано, что данный эффект обусловлен конкуренцией *Ssb* и *Ssa* за связывание прионных агрегатов (Chernoff, Kiktev, 2016). Дисбаланс в количестве *Hsp70* и *Hsp104* на ранних стадиях кратковременного теплового шока приводит к дестабилизации приона [*PSI*⁺] (Newnam *et al.*, 2011). Делеция *SSB1* снижает эффективность дестабилизации приона при тепловом шоке, в то время как делеция *SSZ1* усиливает её (Howie *et al.*, 2019).

Было высказано предположение, что разнонаправленные эффекты шаперонов групп SSA, SSB и SSZ связаны с их различной ролью в процессах фолдинга синтезируемой цепи в ходе трансляции, а также во фрагментации агрегатов. Согласно одной из моделей, белки группы SSB не способны эффективно участвовать во фрагментации прионных агрегатов, а делеция компонентов RAC одновременно приводит к усилению конверсии и нарушению процесса фрагментации прионных агрегатов (Kiktev *et al.*, 2015).

1.3.3 Дифференциальные эффекты Hsp40 на прионы

В дрожжах охарактеризовано 22 различных J-белка, каждый из которых имеет специфическую локализацию в клетке и выполняет определенные функции (Walsh *et al.*, 2004). Наиболее изученными являются мажорные цитозольные шапероны этой группы, *Sis1* и *Ydj1*. *Ydj1* относится к первому (А) классу J-белков, в то время как *Sis1* является представителем второго класса (класса В) (Рис. 5Б). И *Ydj1*, и *Sis1* вовлечены в поддержание прионов дрожжей; помимо этого, показано влияние нескольких других J-белков — *Arj1*, *Swa2* и *Zuo1* — на различные прионы.

Sis1. Ген *SIS1* является жизненно важным для дрожжей, а его продукт участвует во множестве процессов, связанных с синтезом и контролем качества белков. Белок *Sis1* имеет характерную для J-белков II класса доменную структуру. Он содержит N-концевой J-домен, глицин-богатый домен (подразделяемый на G/F-богатый и G/M-богатые регионы); два C-концевых домена (CTD1/2); и димеризационный домен (DD) (Рис. 5Б) (Cheetham, Caplan, 1998). Разные прионы имеют различные потребности в количестве и функциональности *Sis1*. Так, прион [*PSI*⁺] очень устойчив к изменениям

количества Sis1 или его мутациям, хотя сильное снижение количества Sis1 в клетке все же ведет к потере приона через большое количество поколений (Higurashi *et al.*, 2008). Другой же прион, [URE3], наоборот, очень чувствителен к изменениям уровня Sis1, и быстро теряется при снижении экспрессии соответствующего гена (Higurashi *et al.*, 2008). Прион [PIN⁺] имеет промежуточную зависимость от Sis1 (Aron *et al.*, 2007; Higurashi *et al.*, 2008), хотя разные варианты этого приона характеризуются различными потребностями в его активности (Stein, True, 2014). Наиболее чувствительным к изменению в количестве или активности Sis1 дрожжевым прионом является прион [SWI⁺], который элиминируется даже при небольших колебаниях уровней Sis1 (Hines *et al.*, 2011). Чувствительность к уровню активности Sis1 отличается и между вариантами прионов — так, экспрессия различных вариантов Sis1 может влиять на конкуренцию прионных вариантов (Yu, King, 2019).

Помимо общего уровня Sis1, поддержание приона зависит от функциональности отдельных доменов этого белка. Так, G/F-регион критически важен для поддержания [URE3] и многих вариантов [PIN⁺] (Sondheimer *et al.*, 2001; Reidy *et al.*, 2014; Stein, True, 2014). Сильные варианты [PSI⁺], однако, могут поддерживаться даже при отсутствии G/F-домена Sis1 (Kirkland *et al.*, 2011; Reidy *et al.*, 2014; Harris *et al.*, 2014). Сверхэкспрессия Sis1 усиливает изгнание приона [PSI⁺] при сверхэкспрессии Hsp104 (Kryndushkin *et al.*, 2011), что может свидетельствовать о роли Sis1 в стимуляции функции Hsp104, отвечающей за препятствование переносу прионных агрегатов в дочернюю клетку. Это предположение подтверждается тем, что делеция димеризационного домена Sis1 препятствует изгнанию [PSI⁺] при сверхэкспрессии HSP104, но не приводит к потере приона при нормальном уровне Hsp104 (Kirkland *et al.*, 2011; Harris *et al.*, 2014). Более того, делеция димеризационного домена *SIS1* приводит к стабилизации приона на фоне мутации *SSA1-21* (Kirkland *et al.*, 2011). Сходные, но менее выраженные эффекты наблюдаются при замене аминокислотного остатка лизина в 199 положении Sis1 на аланин. Эта мутация находится в одном из субстрат-связывающих регионов Sis1 и напрямую влияет на его взаимодействие с клиентом (Lee *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006).

Показано, что Sis1 способствует понижению прионной токсичности приона [PIN⁺], а также токсичности, связанной со сверхэкспрессией Q-богатых районов мутантного белка хантингтина, и токсичности приона [PSI⁺] при сверхэкспрессии генов *SFP1* и

SUP35 (Gokhale *et al.*, 2005; Douglas *et al.*, 2008; Matveenko *et al.*, 2016). Недавно было также продемонстрировано, что токсичность, наблюдающаяся при замене нормальной аллели *SIS1* на вариант, содержащий только J- и G/F-домены в клетках, несущих прион [*PSI*⁺], вызывается избыточной агрегацией Sup35 и компенсируется только Sis1 с интактным CTD и димеризационным доменом (Kumar *et al.*, 2021).

Помимо непосредственного участия в поддержании прионов, Sis1 вовлечен во множество других процессов в клетке. Он является основным кошапероном, стимулирующим сольюбилизацию белков, входящих в состав так называемых Р-телец и стресс-гранул у дрожжей (Kroschwald *et al.*, 2015). Помимо этого, Sis1 осуществляет транспорт определенных субстратов внутрь ядра для деградации их на внутриядерных протеасомах (Park *et al.*, 2013). Sis1 также способен связывать олигомерные формы склонных к агрегации белков, делая их агрегаты более растворимыми (Klaips *et al.*, 2020). Таким образом, Sis1 является важнейшим элементом СККБ, который, в том числе, необходим и для поддержания прионов.

Ydj1 и иные Hsp40. Наиболее интенсивно продуцируемым Hsp40 дрожжей, однако, является другой белок, Ydj1. Он принадлежит к первому классу Hsp40 (классу А) и, в отличие от Sis1, не является жизненно важным. Ydj1 также вовлечен в поддержание прионов дрожжей. Однако, сверхэкспрессия *YDJ1* излечивает прион [*URE3*] и усиливает прион [*PSI*⁺] (Moriyama *et al.*, 2000; Barbitoff *et al.*, 2017). При этом для обеспечения специфического эффекта Ydj1 достаточно исключительно его J-домена. Вероятно, одного взаимодействия J-домена Ydj1 достаточно для определения специфичности работы молекулярных шаперонов Hsp70 и Hsp90, что в свою очередь может влиять на функциональность Hsp104 и на эффективность работы последнего как дезагрегазы (Harris *et al.*, 2014; Reidy *et al.*, 2014).

Помимо основных цитозольных Hsp40 в поддержании прионов задействованы еще три представителя семейства J-белков: Arj1, Swa2 и Zuo1. Zuo1 является компонентом упомянутого ранее RAC, и его влияние на прионы сходно с таковым для Hsp70-Ssz1. Делеция гена *ZUO1* увеличивает частоту индукции [*PSI*⁺] и способствует излечиванию приона при тепловом шоке (Amor *et al.*, 2015; Kiktev *et al.*, 2015; Howie *et al.*, 2019). Arj1 способствует изгнанию [*PSI*⁺] при сверхэкспрессии *HSP104*, а его делеция пре-

пятствует этому процессу, но только в случае сильного варианта [PSI^+] (Astor *et al.*, 2018). *Apj1* содержит в своей структуре особый QS-домен, характеризующийся структурной неупорядоченностью. Именно этот домен, но не CTD *Apj1*, необходим для излечения прионов избытком Hsp104 (Berger *et al.*, 2020). *Swa2*, дрожжевой гомолог ауксалина, необходим для поддержания приона [*URE3*], который дестабилизируется при делеции соответствующего гена (Higurashi *et al.*, 2008; Troisi *et al.*, 2015).

Hsp40 и сортировка белков. Помимо основной роли в регуляции активности и субстратной специфичности Hsp70, J-белки также участвуют в процессах сортировки белков и белковых агрегатов в эукариотических клетках. Процессы сортировки предполагают распределение агрегатов по различным клеточным компартментам контроля качества белка. В клетке эукариот существует несколько таких компартментов, однако, их конкретная роль и количество до сих пор является предметом исследований. Основными местами скопления неправильно уложенных белков считаются три компартмента: внутриядерный компартмент (INtranuclear Quality control deposit, INQ, ранее считавшийся околядерным (JUxtaNuclear Quality control deposit, JUNQ)), и два цитозольных: периферическое депо нерастворимых белков (Insoluble PrOtein Deposit, IPOD), а также более лабильные цитоплазматические включения, называемые Q-тельцами или CytoQ (Kaganovich *et al.*, 2008; Escusa-Toret *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2015a; Miller *et al.*, 2015b).

IPOD считается местом скопления белков, укладка которых необратимо нарушена — в частности, в IPOD наблюдаются скопления дрожжевых прионогенных белков, в особенности при их сверхпродукции (Kaganovich *et al.*, 2008). INQ и CytoQ, напротив, являются местами скопления аморфных, неструктурированных белковых агрегатов и выполняют функцию временной изоляции неправильно сложенных белков. В соответствии с этой моделью, INQ и CytoQ формируются в первую очередь в стрессовых условиях (Miller *et al.*, 2015b). В последние годы накопление белков в CytoQ, INQ и IPOD стало рассматриваться как один из основных сценариев работы системы контроля качества белков, помогающий клетке справиться с избытком неправильно уложенных белков. В соответствии с этой гипотезой, было показано, что изоляция белков в CytoQ/INQ позволяет поддерживать функциональность системы Hsp70 при стрессе (Ho *et al.*, 2019). Сортировка в каждый из компартментов осуществляется с помо-

щью различных шаперонов и факторов сортировки белков, основные из которых — Btn2 и Hsp42 — также именуется агрегазами. Контроль транспортировки агрегатов в JUNQ/INQ осуществляется при помощи белка Btn2, в этом процессе принимает активное участие Sis1 (Malinovska *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2015a); Hsp42 контролирует перенос белков в цитоплазматические компартменты — IPOD и CytoQ (Specht *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2015a).

Известно, что сверхпродукция Hsp42 и Btn2 приводит к изгнанию приона [*URE3*] (Kryndushkin *et al.*, 2008; Wickner *et al.*, 2014), а сверхэкспрессия *BTN2* способна также изгонять искусственный прион [*NRPIC*⁺], образованный химерным белком, состоящим из прионного домена белка Nrp1 и С-концевого домена Sup35 (Malinovska *et al.*, 2012). Помимо этого, сверхпродукция Hsp42 приводит к усилению прионного фенотипа [*PSI*⁺], хотя молекулярные механизмы этого эффекта остаются слабо изученными (Barbitoff *et al.*, 2017).

Ген *CURI* (от англ. Curing of [*URE3*]) является паралогом гена *BTN2*, возникшим в результате полногеномной дупликации в эволюции дрожжей (Byrne, Wolfe, 2005). В 2008 г. была впервые продемонстрирована способность *CURI* излечивать дрожжевой прион [*URE3*] при сверхэкспрессии (Kryndushkin *et al.*, 2008). Аналогичный эффект наблюдался и для искусственного приона [*NRPIC*⁺] (Malinovska *et al.*, 2012) и для приона [*PSI*⁺] (Zhao *et al.*, 2018). Сверхэкспрессия *CURI* приводит к изменению внутриклеточной локализации Sis1 (Malinovska *et al.*, 2012); такой антиприонный эффект изменения локализации Sis1 является ожидаемым ввиду зависимости всех прионов от уровня этого Hsp40 (см. выше). Позднее было показано, что Cur1 и Btn2 изгоняют некоторые варианты [*URE3*] даже без искусственной сверхэкспрессии (Wickner *et al.*, 2014).

В ходе исследований в нашей лаборатории ген *CURI* был выявлен при скрининге геномной библиотеки дрожжей как ген, усиливающий синтетическую летальность мутаций *sup45* с прионом [*PSI*⁺] (Kiktev *et al.*, 2011). В дальнейшем было показано, что сверхэкспрессия *CURI* специфически усиливает фенотип [*PSI*⁺]. Таким образом, сверхэкспрессия *CURI* противоположным образом влияет на различные прионы дрожжей. Тем не менее, для штаммов, несущих как [*PSI*⁺], так и [*URE3*], показано изменение внутриклеточной локализации Sis1 при сверхпродукции Cur1 (Barbitoff *et al.*, 2017). Это наблюдение говорит о том, что изменение внутриклеточного баланса Sis1

и снижение его цитозольной концентрации может положительно сказываться на поддержании и распространении некоторых прионов (например, $[PSI^+]$). Данная гипотеза, однако, требует дальнейшей проверки.

1.4. Заключение

За время, прошедшее с момента открытия молекулярных шаперонов, были описаны различные классы этих белков. Исследования в области структурной биологии позволили детально расшифровать цикл работы даже таких сложных молекулярных машин, как дезагрегазы Hsp104 и ClpB. В то же время, увеличение количества информации о различных шаперонах и других элементах системы контроля качества белка привело к рождению концепции «шаперонной сети» или «сети протеостаза» — сложной системы, большое количество компонентов которой работают сообща для поддержания протеостаза (Balch *et al.*, 2008).

Учитывая общую сложность устройства шаперонных сетей, неудивительно, что молекулярные шапероны разных групп оказывают существенное влияние на прионы дрожжей, причем как способствуя их поддержанию, так и препятствуя ему. В то же время, слабо охарактеризованы механизмы, лежащие в основе дифференциальных эффектов шаперонов на прионы. Как было указано выше, такие дифференциальные эффекты убедительно показаны для Ydj1 и фактора сортировки белков Cur1, чьи эффекты опосредуются Sis1. Принимая во внимание центральную роль J-белков в субстратной специфичности Hsp70, можно предположить, что наблюдаемые разнонаправленные эффекты отражают роль J-белков в определении судьбы белковых агрегатов в эукариотических клетках. Таким образом, изучение механизмов наблюдаемых эффектов поможет понять принципы взаимодействия шаперонных сетей с амилоидными агрегатами и разработать подходы к терапии амилоидозов высших эукариот.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Штаммы бактерий и дрожжей

Список использованных в работе штаммов *E. coli* представлен в таблице 1. Штамм DH5 α был использован для наработки плазмид, штаммы BL21 (DE3), NiCo21 (DE3), Rosetta (DE3) и Zeta - для наработки и очистки дрожжевых белков. Штамм Zeta является производным от Rosetta (DE3). Генетические отличия штаммов Zeta и Rosetta (DE3) не охарактеризованы; в то же время, штамм Zeta демонстрирует отличающиеся от исходного штамма характеристики роста и продукции белков.

Список использованных в работе штаммов дрожжей *S. cerevisiae* представлен в таблице 2. Штамм дрожжей 2-prb1 Δ O-P-74-D694 был использован для наработки и очист-

Таблица 1. Штаммы бактерий *E. coli*, использованные в работе

Название штамма	Генотип	Происхождение
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (ϕ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA</i>	Hanahan, 1983
BL21 (DE3)	<i>F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5])</i>	Studier, Moffatt, 1986
NiCo21 (DE3)	<i>ompT gal [dcm] [lon] ΔhsdS glms6Ala arnA::CBD slyD::CBD can::CBD fhuA2 (λ DE3) λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	NEB #C2529H
Rosetta (DE3)	<i>F- ompT hsdSB(RB- mB-) gal dcmλ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5]) pRARE (CamR)</i>	Novagen #70954 (предоставлен К.В. Волковым)
Zeta	<i>F- ompT hsdSB(RB- mB-) gal dcmλ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5]) pRARE (CamR)</i>	потомок Rosetta (DE3), штамм предоставлен В.Е. Твороговой

Таблица 2. Штаммы дрожжей *S. cerevisiae*, использованные в работе

Название штамма	Генотип	Происхождение
OT56	<i>MATa ade1-14 trp1-289 his3-Δ200 leu2-3,112 ura3-52 [PSI⁺]^S [PIN⁺]</i>	Derkatch <i>et al.</i> , 1997
OT520	<i>MATa leu2 trp1 ura3 P_{DAL5}ADE2 P_{DAL5}CAN1 kar1-1 [URE3-1] [PIN⁺]</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 2005
OT55	<i>MATa ade1-14 trp1-289 his3-Δ200 leu2-3,112 ura3-52 [PSI⁺]^W [PIN⁺]</i>	Derkatch <i>et al.</i> , 1997
P-74-D694	<i>MATa ade1-14 his3Δ200 ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 [PSI⁺]^S [PIN⁺]</i>	Drozdova <i>et al.</i> , 2016
2-prb1Δ0-P-74-D694	<i>MATa ade1-14 trp1-289(UAG) ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 prb1Δ0 [psi⁻] [pin⁻]</i>	Agaphonov, Alexandrov, 2014
U-T-P ^T -YAL2171	<i>MATa leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 ade1-14 can1-100 [PSI⁺]^T [PIN⁺] sup35::hygB [pRS314-SUP35] sis1::kanMX [YCplac33-SIS1]</i>	Данная работа
L-T-P ^T -YAL2171	<i>MATa leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 ade1-14 can1-100 [PSI⁺]^T [PIN⁺] sup35::hygB [pRS314-SUP35] sis1::kanMX [YCplac111-SIS1]</i>	Данная работа
LΔ-T-P ^T -YAL2171	<i>MATa leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 ade1-14 can1-100 [PSI⁺]^T [PIN⁺] sup35::hygB [pRS314-SUP35] sis1::kanMX [YCplac111-SIS1ΔDD]</i>	Данная работа

ки белков. Данный штамм является производным широко используемого штамма 74-D694. Данный штамм несет делецию гена *PRB1*, кодирующего вакуолярную протеазу Б (Moehle *et al.*, 1987). Штамм U-T-P^T-YAL2171 был получен при помощи замещения плазмиды pRS315-SIS1 в штамме T-P^T-YAL2171 (Barbitoff *et al.*, 2022) на плазмиду YCplac33-SIS1. Штаммы L-T-P^T-YAL2171 и LΔ-T-P^T-YAL2171 были получены замещением плазмиды YCplac33-SIS1 в штамме U-T-P^T-YAL2171 на плазмиду YCplac111-

Таблица 3. Плазмиды, использованные в данной работе

Плазмида	Описание	Происхождение
pPROEX-HTb-RNQ1	AmpR, <i>HTb-RNQ1</i>	Данная работа
pID129	AmpR, <i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P_{RNQ1}-RNQ1</i>	Kadnar <i>et al.</i> , 2010
pET-20b-SUP35NM	AmpR, <i>SUP35NM-His₆</i>	Allen <i>et al.</i> , 2005
pET-20b-SUP35NM-M1	AmpR, <i>SUP35NM-M1-His₆</i>	Бондарев, 2014
pET-20b-SUP35NM-M2	AmpR, <i>SUP35NM-M2-His₆</i>	Бондарев, 2014
pET-20b-SUP35NM-M4	AmpR, <i>SUP35NM-M4-His₆</i>	Бондарев, 2014
pET-20b-SUP35NM-M5	AmpR, <i>SUP35NM-M5-His₆</i>	Бондарев, 2014
pET-20b-SUP35NM Δ BS	AmpR, <i>SUP35NMΔBS-His₆</i>	Данная работа
pPROEX-HTb-Sis1	AmpR, <i>HTb-SIS1</i>	Shorter, Lindquist, 2004
pPROEX-HTb-Sis1 Δ DD	AmpR, <i>HTb-sis1ΔDD</i>	Данная работа
pPROEX-HTb-HSP104	AmpR, <i>HTb-HSP104</i>	Данная работа
pGPD-HSP104	AmpR, 2μ , <i>URA3</i> , <i>P_{TDH3}-HSP104</i>	А.А. Рубель, не опубликована
pPROEX-HTb-HSP104 Δ N	AmpR, <i>HTb-HSP104ΔN</i>	Данная работа
pTEF-SSA1	AmpR, <i>CEN</i> , <i>URA3</i> , <i>P_{TEF1}-His₆-Xpress-SSA1</i>	James <i>et al.</i> , 1997
pTEF-SSA1-21	AmpR, <i>CEN</i> , <i>URA3</i> , <i>P_{TEF1}-His₆-Xpress-SSA1-21</i>	Данная работа
pRS426	2μ , <i>URA3</i>	Christianson <i>et al.</i> , 1992
pRS426-CUR1	2μ , <i>URA3</i> , <i>P_{CUR1}-CUR1</i>	Barbitoff <i>et al.</i> , 2017
pRS426-cur1 Δ 3-22	2μ , <i>URA3</i> , <i>P_{CUR1}-cur1Δ3-22</i>	Barbitoff <i>et al.</i> , 2017
pRS315	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i>	Sikorski, Hieter, 1989
YCplac111	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i>	Gietz, Sugino, 1988
pRS315-SIS1	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P_{SIS1}-SIS1</i>	Gokhale <i>et al.</i> , 2005
YCplac111-SIS1	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P_{SIS1}-SIS1</i>	Данная работа
YCplac111-SIS1 Δ DD	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P_{SIS1}-sis1ΔDD</i>	Данная работа
pAG415ADH1-Sis1-EGFP	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P_{ADH1}-SIS1-EGFP</i>	Malinovska <i>et al.</i> , 2012
pAG415ADH1-NLS-Sis1-EGFP	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P_{ADH1}-NLS-SIS1-EGFP</i>	Malinovska <i>et al.</i> , 2012
pAG415ADH1-NES-Sis1-EGFP	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P_{ADH1}-NES-SIS1-EGFP</i>	Malinovska <i>et al.</i> , 2012
pAG415ADH1-Sis1 Δ DD-EGFP	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P_{ADH1}-sis1ΔDD-EGFP</i>	Malinovska <i>et al.</i> , 2012
pR16CUP-SUP35NM-yTagRFP-T	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P_{CUP1}-SUP35NM-yTagRFP-T</i>	А.Г. Матвеевко, не опубликовано

SIS1 или YCplac111-SIS1 Δ DD, соответственно.

2.2. Плазмиды

Плазмиды, использованные в работе, представлены в таблице 3. Последовательности праймеров, использованных при конструировании плазмид, указаны в таблице 4. Для создания плазмид pPROEX-НТb-RNQ1 и pPROEX-НТb-HSP104 (Рис. 6А-Б) мы клонировали фрагменты плазмид pID129 (Kadnar *et al.*, 2010) и pGPD-HSP104 (А. Рубель, не опубликовано), полученные при обработке рестриктазами BamHI и SacI, в обработанный этими же рестриктазами остов плазмиды pPROEX-НТb-Sis1 (Shorter, Lindquist, 2004). Для создания конструкции, несущей мутантный вариант Sis1 без димеризационного домена (Sis1 Δ DD) (Рис. 6В) мы амплифицировали соответствующий фрагмент гена *SIS1* из конструкции pPROEX-НТb-Sis1 при помощи праймеров M13rev(-48)20-mer и Sis1-deltaDD-SacI-End-R. Полученный амплифицированный фрагмент обрабатывали рестриктазами BamHI и SacI, после чего лигировали в обработанный этими же рестриктазами остов плазмиды pPROEX-НТb-Sis1 (Barbitoff *et al.*, 2020). Полученные плазмиды проверяли при помощи рестрикционного анализа с использованием рестриктаз BamHI и SacI.

Конструкция pPROEX-НТb-HSP104 Δ N была получена при помощи амплификации фрагмента последовательности гена *HSP104*, не содержащего N-домен, при помощи праймеров Hsp104-delN147-BamHI и Hsp104CloneRS с последующей обработкой полученного ПЦР-продукта рестриктазами BamHI и SacI и лигированием в обработанный этими же рестриктазами остов исходной плазмиды.

Плазида YCplac111-SIS1 была получена при помощи клонирования фрагмента плазмиды pRS315-SIS1, полученного при ее обработке рестриктазами BamHI и SalI, в обработанный этими же ферментами остов вектора YCplac111. Для получения конструкции YCplac111-SIS1 Δ DD мы произвели замену фрагмента плазмиды YCplac111-SIS1, содержащего 3' участок гена *SIS1*, на соответствующий участок из плазмиды pPROEX-НТb-Sis1 Δ DD при помощи рестриктаз XhoI и SacI.

Получение плазмид pET-20b-SUP35NM Δ BS (А. Михайличенко, не опубликовано) и pTEF-SSA1-21 (Рис. 6г) (Barbitoff *et al.*, 2022) производили с использованием методики сайт-направленного мутагенеза. Для этого производили амплификацию соответ-

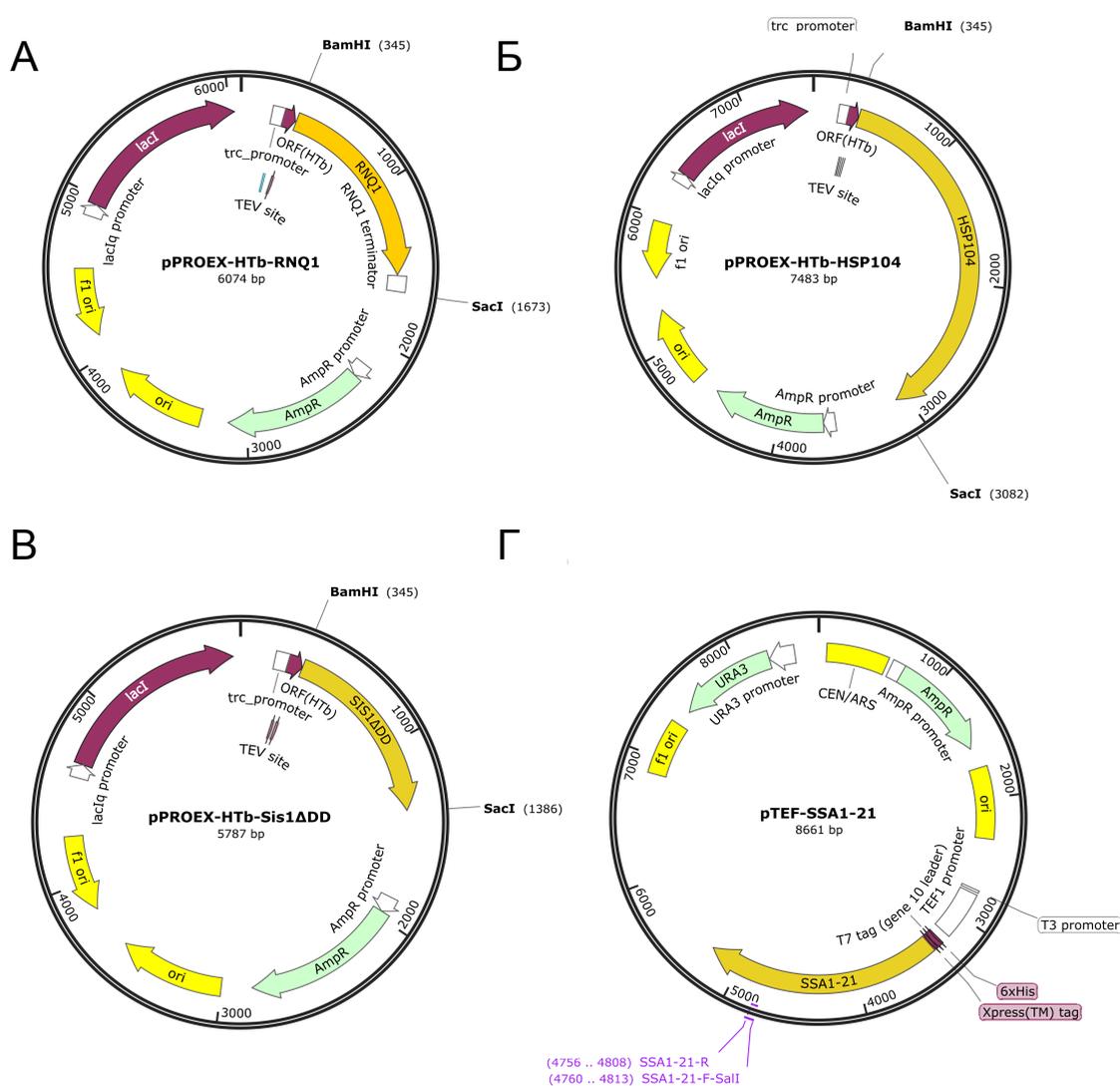


Рисунок 6. Некоторые плазмидные конструкции, полученные в ходе данной работы Карты плазмид pPROEX-HTb-RNQ1 (A), pPROEX-HTb-HSP104 (Б), pPROEX-HTb-Sis1 Δ DD (B) и pTEF-SSA1-21 (Г). На картах отмечены сайты рестрикции и праймеры, использованные для конструирования.

ствующей плазмиды (pET-20b-SUP35NM или pTEF-SSA1) с использованием высокоточной полимеразы AccuPrimeTM Pfx (Invitrogen, #12344-024) и соответствующей пары праймеров (supa1_R и supa2_F для pET-20b-SUP35NM Δ BS или SSA1-21-F-SalI и SSA1-21-R в случае pTEF-SSA1-21).

Все полученные плазмидные конструкции проверяли секвенированием по Сэнгеру в РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного Парка СПбГУ

Таблица 4. Праймеры для ПЦР, использованные в данной работе

Праймер	Последовательность (5' → 3')
M13rev(-48)20-mer	agcggataacaatttcacac
Sis1-deltaDD-SacI-End-R	cgtcGAGCTCTCAatattggatagtcacattt
Hsp104-delN147-BamHI	agctGGATCCatgcgtggaactagaattgact
Hsp104CloneRS	gactcgagctcttaatctaggtcatcatcaatttc
supa1_R	ggaactggagacaagcttcaaaagcttttgctttgaaagtcgttca
supa2_F	atgtctttgaacgactttcaaaagcaaaagactttgaagcttgctcca
SSA1-21-F-SalI	tttcgatgctgacttaacggatttGaatgttccgccgtcgaaaagggtac
SSA1-21-R	cttttcgacggcggaaacattcCaataccgtagagtcgacatcgaaagtga

Заглавными буквами выделены вносимые в амплифицируемую последовательность сайты рестрикции (в праймерах Hsp104-delN147-BamHI и Sis1-deltaDD-SacI-End-R) и стоп-кодон (в случае Sis1-deltaDD-SacI-End-R).

2.3. Среды и условия культивирования

Бактерии культивировали в чашках Петри при 37° С на стандартной бактериальной среде LB (Sambrook *et al.*, 1989) с добавлением ампициллина в концентрации 100 мкг/мл при необходимости.

Для получения суспензионных культур бактерий использовали среды LB или 2TY (Sambrook *et al.*, 1989) с добавлением ампициллина в концентрации 100 мкг/мл при необходимости. Среда 2TY с добавлением ампициллина использовалась для культивирования бактерий, продуцирующих гетерологичные белки.

Дрожжи культивировали на стандартных дрожжевых средах: YEPD (Kaiser *et al.*, 1994), 1/2 YEPD (Brachmann *et al.*, 2005), 1/4 YEPD (Eaglestone *et al.*, 2000) и SC (Kaiser *et al.*, 1994). Дрожжи инкубировали при 30° С, в некоторых экспериментах - при повышенной температуре (34° С) для повышения активности молекулярных шаперонов.

Дрожжи, несущие плазмиду для очистки целевого белка, культивировали при температуре 30° С в стандартной дрожжевой среде SC (Kaiser *et al.*, 1994) без добавления урацила в течение ночи, после чего ночную культуру разводили чистой средой до конечного значения OD₆₀₀ = 0.1. Клетки выращивали до OD₆₀₀ = 2.0, после чего собирали при помощи центрифугирования.

2.4. Генетические методы

2.4.1 Трансформация клеток дрожжей и бактерий

Трансформацию клеток дрожжей проводили при помощи стандартной методики с использованием ацетата лития и балластной ДНК (Gietz *et al.*, 1992).

Трансформацию клеток штаммов *E. coli* BL21 (DE3), NiCo21 (DE3), Rosetta (DE3) и Zeta плазмидами для продукции гетерологичных белков производили по стандартному протоколу с применением хлорида кальция (Sambrook, Russell, 2006). Компетентные клетки штамма DH5 α , использованные при получении и наработке плазмидных конструкций, трансформировали по стандартной методике (Sambrook *et al.*, 1989) для компетентных клеток.

2.4.2 Оценка частоты потери приона [*URE3*]

Для подсчета частоты потери [*URE3*] использовали ранее описанный метод (Krupdushkin *et al.*, 2008). Штамм OT520 трансформировали плазмидами для сверхэкспрессии изучаемых генов. Полученных трансформантов по прошествии пяти дней с момента трансформации инокулировали в среду YEPD. Культуру выращивали до оптической плотности $OD_{600} = 0,75$ и высевали на твердую среду 1/2 YEPD. Частоту потери оценивали подсчетом количества красных и белых колоний при помощи ImageJ. Для каждой конструкции анализировали по меньшей мере 4 независимых трансформанта.

2.5. Флуоресцентная микроскопия

При проведении флуоресцентной микроскопии клетки выращивали в соответствующей селективной жидкой среде до $OD_{600} = 0,7$. Клетки осаждали центрифугированием, после чего разводили в небольшом количестве среды, переносили 5 мкл клеточной суспензии на предметное стекло и смешивали с 5 мкл 50% глицерина. Полученные препараты анализировали на широкопольном флуоресцентном микроскопе Zeiss Axioscope A1. Для получения изображений использовали камеру ZEISS AxioCam 506 color и программное обеспечение ZEN от производителя. Обработка изображений производилась при помощи программы ImageJ и GIMP v. 2.10.18.

2.6. Молекулярно-биологические методы

2.6.1 Полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в объеме 10 мкл с помощью амплификатора T100 (BIO-RAD) по протоколу, рекомендованному производителем ДНК-полимеразы. Праймеры, использованные для проведения ПЦР в данной работе, представлены в таблице 4. Для амплификации целевых фрагментов при клонировании использовали ДНК-полимеразу Phusion (Thermo Fisher Scientific, F530S). Для сайт-направленного мутагенеза использовали полимеразу AccuPrimeTM Pfx (Invitrogen, #12344-024).

2.6.2 Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции

Рестрикцию плазмидной ДНК или ПЦР-фрагмента проводили в объеме 10 мкл на реакцию. Для рестрикции использовали рестриктазы BamHI, SalI, SacI (Thermo Fisher Scientific). Условия реакции выбирали в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем фермента.

2.6.3 Лигирование ДНК-фрагментов

Лигирование фрагментов ДНК по липким концам производили при помощи лигазы фага T4 (Thermo Fisher Scientific). Фрагменты ДНК смешивали в молярном соотношении 1:5 (остов плазмиды:встраиваемый фрагмент). Лигирование производили в течение ночи при комнатной температуре, после чего инактивировали фермент при помощи инкубации смеси при температуре 70° С в течение 5 минут.

2.6.4 Выделение плазмидной ДНК из бактерий

Выделение плазмидной ДНК из бактерий производили с использованием набора реагентов GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) согласно инструкции, прилагаемой к набору. Оценку концентрации и чистоты выделенной ДНК производили при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

2.6.5 Электрофорез ДНК

Для электрофоретического разделения ДНК-фрагментов использовали агарозный гель (1% агарозы (w/v) на 0,5x TBE). Электрофорез проводили в камере для горизонтального электрофореза (BIO-RAD) при напряжении 90 В в течение 45 минут. Окрашивание ДНК производили при помощи инкубации в растворе бромистого этидия в течение 15 минут. 1kb ladder (SibEnzyme #M12) был использован в качестве маркера молекулярного веса ДНК.

2.6.6 Выделение и электрофорез белков из клеток дрожжей и бактерий

Для анализа уровней белков в клетках дрожжей при помощи денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) выделение белка из клеток дрожжей производили по методу щелочного лизиса (Kushnirov, 2000, Zhang *et al.*, 2011). Для приготовления лизата использовали 1,5 мл культуры с оптической плотностью $OD_{600} = 0,75$.

Для анализа уровней продукции белков в клетках бактерий с помощью SDS-PAGE к бактериальным клеткам, полученным при осаждении 1 мл суспензионной культуры, добавляли 100 мкл буфера для нанесения со стандартным составом (Sambrook *et al.*, 1989) и кипятили в течение 5 минут. После кипячения лизат центрифугировали в течение 5 минут при скорости 13200 об/мин для удаления остатков клеток.

SDS-PAGE проводили по стандартной методике (Laemmli, 1970). В качестве маркера молекулярного веса использовали PageRuler+ Prestained Protein Ladder (BIORAD) или Spectra BR Prestained Protein Ladder (BIO-RAD). После прохождения электрофореза гель подвергали окрашиванию Кумасси или осуществляли полусухой перенос белков на PVDF (поливинилиденфторид) мембрану (GE Healthcare) при помощи прибора BIO-RAD TransBlot Turbo по стандартному протоколу (использованное напряжение - 25 В, время переноса - 30 минут).

Для проведения вестерн-блоттинга мембрану инкубировали в течение 15 минут в 1% (w/v) растворе blocking agent (GE Healthcare) в буфере TTBS (на 1 литр - 9 г NaCl, 15 мл 1 М Трис-НСl (рН 7,6), 0,5 мл Tween 20). После инкубации мембраны с соответствующими первичными антителами (Таблица 5) и вторичными антителами

ми (GE Healthcare) производили детекцию результатов с использованием инструмента GeneGnome (SynGene) и набора реагентов ECL Select Western Blot Detection Reagent (GE Healthcare).

2.6.7 Полуденатурирующий электрофорез в агарозном геле (SDD-AGE)

SDD-AGE (Kryndushkin *et al.*, 2003) проводили в соответствии с описанной методикой (Halfmann, Lindquist, 2008; Drozdova *et al.*, 2020). Лизис клеток дрожжей для SDD-AGE проводили по протоколу с использованием стеклянных шариков (Drozdova *et al.*, 2020). Электрофорез проводили при напряжении 30 В во льду. Перенос белков на PVDF-мембрану (GE Healthcare) осуществляли при помощи технологии капиллярного переноса, описанной в Halfmann, Lindquist, 2008. В отдельных случаях при проведении SDD-AGE использовали маркер молекулярного веса ДНК 1kb ladder (SibEnzyme #M12), который использовали для оценки размера амилоидных агрегатов по методике AGECalibratoR (Drozdova *et al.*, 2020).

2.7. Получение препаратов дрожжевых шаперонов и амилоидных фибрилл *in vitro*

2.7.1 Оптимизация условий для наработки белков в клетках бактерий

Оптимальные условия продукции белков подбирали при помощи анализа количества белка в клеточных лизатах разных штаммов при разных температурах культивирования. Бактерии, трансформированные сконструированными плазмидами, выращивали в течение ночи, после чего ночную культуру разводили в 100 раз и индуцировали экспрессию целевого белка добавлением IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Пробы, отобранные из культур в начале эксперимента, а также через 2 и 5 часов после

Таблица 5. Первичные антитела, использованные в данной работе

Название антител	Антиген(-ы)	Разведение	Происхождение
anti-Hsp104	Hsp104	1:1000	Abcam, #ab69549
SE4290	Sup35, Sup35NM	1:1000	Chabelskaya <i>et al.</i> , 2004
SS2	Sis1	1:750	Barbitoff <i>et al.</i> , 2017
anti-His ₆	His ₆	1:4000	GE Healthcare, #27-4710-01

культивирования в присутствии IPTG, анализировали при помощи SDS-PAGE с последующим окрашиванием геля Кумасси G250 или вестерн-блот гибридизацией. Оптимальные уровни продукции наблюдались в следующих штаммах: BL21 (DE3) - для Rnq1 и Sis1 Δ DD, NiCo21 (DE3) - для Sup35NM и его вариантов, Rosetta (DE3) - для Sis1.

2.7.2 Препаративная очистка белков

Для очистки дрожжевых прионогенных белков мы трансформировали клетки соответствующего штамма *E. coli* плазмидой для продукции целевого белка. Полученных трансформантов выращивали в среде 2TY с добавлением ампициллина до OD₆₀₀ = 0.3, после чего добавляли IPTG до конечной концентрации 1мМ и инкубировали при оптимальных условиях для конкретного целевого белка. Для проведения хроматографической очистки белка в денатурирующих условиях к осажденным клеткам добавляли лизирующий буфер А, содержащий 20 мМ Трис-НСl (рН 8,0) и 8 М мочевины из расчета 3 мл буфера на 1 г клеток, и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После этого полученный лизат осветляли при помощи центрифугирования при скорости 30,000 g в течение 20 минут. Для проведения очистки использовали надосадочную фракцию.

При очистке молекулярных шаперонов в неденатурирующих условиях к осажденным из культуры клеткам добавляли лизирующий буфер Б (состав буфера: 20 мМ Tris-НСl, 500 мМ NaCl, 10% глицерина, 20 мМ имидазола) (Krzewska, Melki, 2006) (3 мл на 1 г клеток) и лизоцим (800 мкг на 1 г клеток), после чего инкубировали на льду в течение 30 минут. После этого добавляли к суспензии дезоксихолат натрия из расчета 4 мг на 1 г клеток и инкубировали еще 30 минут на льду. Обработанные таким образом клетки разрушали при помощи обработки ультразвуком (8 циклов по 15 секунд при мощности 80%). Лизат осветляли по методике, аналогичной описанной выше для амилоидогенных белков.

Для очистки белков из клеток дрожжей *S. cerevisiae* клетки, трансформированные плазмидой для продукции соответствующего белка, выращивали при 30° С в среде SC (Kaiser *et al.*, 1994) без добавления урацила до OD₆₀₀ = 2.0, после чего осаждали при помощи центрифугирования. Для выделения белка к осадку клеток добавляли лизиру-

юший буфер Б с добавлением ингибиторов протеаз (Sigma) (20 мкл на 1 мл буфера). Буфер добавляли из расчёта 1 мл буфера на 1 г клеток. Лизис проводили с использованием стеклянных шариков и гомогенизатора по стандартной процедуре (Drozdova *et al.*, 2020).

Для препаративной очистки белков использовали колонку с Ni-NTA агарозой объемом 5 мл (GE Healthcare) и хроматографическую систему NGC (BIO-RAD). Очистку проводили при скорости тока 5 мл/мин. Промывку колонки после нанесения клеточного лизата проводили при помощи соответствующего лизирующего буфера (объем буфера для промывки равнялся 10 объемам колонки). Элюцию проводили при помощи линейного градиента концентрации имидазола (от 20 до 250 мМ), объем элюата равнялся 10 объемам колонки. Фракции собирали при помощи автоматического коллектора фракций (BIO-RAD). Первичную оценку количества белка во фракциях производили по изменению поглощения ультрафиолетового излучения с длиной волны $\lambda = 280$ нм. Отобранные фракции дополнительно анализировались при помощи SDS-PAGE.

Пиковые фракции элюата, содержащие дрожжевые амилоидогенные белки, объединяли и добавляли к ним 4 объема 100 % метанола. Полученный раствор инкубировали в течение ночи при 4°C , после чего центрифугировали в течение 30 минут на скорости 7000 g для осаждения денатурировавшего белка. Осажденный белок собирали в микропробирки, добавляли 200 мкл чистого метанола и снова центрифугировали в течение 30 минут при скорости 14000 g. Препарат белка хранили при температуре -80°C .

После проведения препаративной очистки белков в нативных условиях белки концентрировали и производили замену буфера на центрифужных концентраторах AmiCon Ultra-15 с отсечкой молекулярного веса 3 кДа (Merck (Millipore)). Для хранения препаратов очищенных шаперонов использовали буферы следующего состава: для Sis1 и Sis1 Δ DD - 20 мМ Tris-HCl, pH 7.6, 150 мМ KCl, 5 мМ БМЭ, 10% глицерина; для Ssa1 - 20 мМ Tris-HCl, pH 7.6, 50 мМ KCl, 5 мМ БМЭ, 10% глицерина, для Hsp104 - 50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 200 мМ NaCl, 5 мМ БМЭ, 0.01% Triton X-100, 5% глицерина. Сконцентрированные белки в соответствующем буфере замораживали при помощи жидкого азота, после чего сохраняли при температуре -80°C .

2.7.3 Получение амилоидных фибрилл

При получении амилоидных фибрилл амилоидогенные белки, сохраненные в метаноле, осаждали при помощи центрифугирования, после чего высушивали осадок при помощи вакуумного концентратора (20 минут при скорости вращения 2000 об/мин). Полученный сухой осадок растворяли небольшим объемом (5-20 мкл) буфера, содержащим 6 М ГГХ, 20 мМ Tris-HCl, pH 8.0, а также 150 мМ NaCl. Концентрацию белка измеряли на основе спектра поглощения ультрафиолетового излучения при помощи прибора NanoDrop 2000 (ThermoFisher). Затем белок разводили буфером для получения фибрилл до необходимой конечной концентрации в буфере необходимого состава. Состав раствора для получения фибрилл был следующим: 150 мМ NaCl, 5 мМ KPO₄ (pH = 7.4). Для фибриллизации Rnq1 буфер также содержал 4 М мочевины. Для проверки наличия детергент-устойчивых агрегатов в растворе проводили SDS-PAGE анализ проб до и после кипячения в присутствии SDS.

Для дополнительной проверки полученных SDS-устойчивых агрегатов оценивали связывание агрегатов с амилоид-специфическим красителем тиофлавином Т. Для проведения такого анализа 100 мкл препарата белка смешивали с 5 мкл раствора тиофлавина Т (2,5 мМ в 5 мМ KPO₄ pH = 7.4). Спектр флуоресценции детектировали при помощи системы CLARIOstar plus (BMG Labtech).

2.7.4 Оценка активности молекулярных шаперонов *in vitro*

Для оценки активности очищенных дрожжевых шаперонов использовали методику, основанную на восстановлении активности денатурированной светлячковой люциферазы (Glover, Lindquist, 1998). Рекombинантную люциферазу светлячка (abcam, #ab100961) растворяли в реакционном буфере (25 мМ Tris-HCl pH 7.6, 50 мМ KCl, 8 мМ MgSO₄, 8 мМ дитиотреитола (ДТТ), 0,1 мМ ЭДТА, 10% глицерина, 0.25% Triton X-100) (модифицировано из (Schumacher *et al.*, 1996) и разводили мочевиной до конечной концентрации люциферазы 10 мкМ и конечной концентрации мочевины 4 М. Денатурированный таким образом фермент разводили в 100 раз реакционным буфером, содержащим соответствующую комбинацию очищенных дрожжевых шаперонов (использованные концентрации шаперонов - 1 μ М Hsp40 и 1 μ М Hsp70). Смесь агре-

готов люциферазы и шаперонов инкубировали в течение 60 минут при 26 ° С. Активность люциферазы измеряли при помощи набора реактивов Luciferase Assay System (Promega, #E1500) и системы CLARIOstar Plus (BMG Labtech). Измерение интенсивности люминесценции производили в 3 независимых технических повторностях.

2.8. Электронная микроскопия

Для приготовления препаратов для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) 5 мкл раствора фибрилл наносили на медную сеточку с формваровой пленкой (Ted Pella, Inc.) (с дополнительным углеродным напылением в случае наличия в буферном растворе высоких концентраций детергентов). После высыхания окрашивали препарат раствором уранил ацетата в концентрации 1% (w/v) в течение 30 секунд или 10 минут (для негативного и позитивного контрастирования, соответственно). Краситель удаляли, полученный препарат промывали водой и высушивали. Электронную микроскопию проводили на платформе РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного Парка СПбГУ.

Анализ микрофотографий производился вручную с использованием программного пакета ImageJ. За длину фибриллы принимали расстояние по ее оси от видимой точки начала до видимой точки конца фибриллы.

2.9. Анализ связывания шаперонов с фибриллами

Анализ взаимодействия шаперонов с фибриллами проводили по разработанной нами методике (Barbitoff *et al.*, 2020). На первом этапе раствор, содержащий полученные *in vitro* амилоидные фибриллы соответствующего белка, центрифугировали в течение 30 минут при скорости 14000 g, после чего удаляли буфер и растворяли осадок в 50-100 мкл реакционного буфера 20 mM Tris-HCl (pH = 8.0), 200 mM NaCl, 5% глицерина, 5 mM БМЭ, 10 mM MgCl₂ (Krzewska, Melki, 2006). После этого полученный раствор фибрилл в высокой концентрации смешивали с очищенными шаперонами в объеме 50 мкл; конечная концентрация фибрилл составляла от 4 до 40 μM, концентрация шаперонов - от 1 до 4 μM в зависимости от эксперимента (см. главу 3). Для экспериментов с добавлением Hsp70 и Hsp104 в смесь также добавляли 5 mM АТФ или 5 mM негидролизуемого аналога АТФ, АМФ-ФНФ. В отдельных экспериментах также использовали 5 mM

ГТФ и АТФ-регенерирующую систему (100 мкг/мл креатинфосфокиназы (Sigma), 10 mM креатинфосфата). Смесь шаперонов и фибрилл в реакционном буфере инкубировали в течение 1 часа с перемешиванием при комнатной температуре, после чего фракционировали смесь центрифугированием скорости 14000 об/мин в течение 20 минут. Надосадочную фракцию отбирали в отдельную микропробирку, полученный осадок ресуспендировали в аналогичном объеме реакционного буфера. Распределение белков по фракциям анализировали при помощи SDS-PAGE. Каждый эксперимент проводили как минимум в 3 технических повторностях.

Для оценки констант связывания Hsp40 и Hsp70 с амилоидными фибриллами оценивали количество целевого белка в осадочной и надосадочной фракциях при помощи анализа изображений окрашенных гелей после SDS-PAGE посредством программного пакета ImageJ, после чего вычисляли долю целевого белка в осадочной фракции (f_p).

Константу диссоциации затем оценивали при помощи модификации стандартной регрессионной модели для анализа связывания:

$$f_p = \frac{(1 - a) \times [F]}{[F] + K_D} + a$$

, где $[F]$ - концентрация белка в составе фибрилл, а K_D - оцениваемая константа диссоциации (Motulsky, Neubig, 2010), a - поправочный коэффициент, отражающий ошибку метода (фоновый уровень осаждения целевого белка). Концентрацию белка в составе фибрилл ($[F]$) оценивали по соотношению белка в надосадочной и осадочной фракциях при центрифугировании исходного препарата фибрилл.

Достоверность рассчитанного значения K_D оценивали при помощи t -критерия. В случае, если p -значение превышало порог значимости ($\alpha = 0.05$), взаимодействие шаперона с фибриллами считали неэффективным.

2.10. Статистическая обработка данных

Статистический анализ производили с использованием языка программирования R (R Core Team, 2014), для визуализации данных использовали пакет 'ggplot2' (Wickham, 2016). Сравнение количественных показателей проводили с использованием критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Статистическое сравнение констант диссоциации проводи-

ли по t -критерию (определение статистики для сравнения регрессионных моделей дано в Clogg *et al.*, 1995). Поправку на множественные сравнения осуществляли по методу Бенджамини-Хохберга. Скрипты, использованные для анализа данных в работе, могут быть найдены по адресу: https://github.com/mrbarbitoff/phd_2022.

Глава 3. Результаты

3.1. Характеристика дифференциальных эффектов *Sis1* на прионы дрожжей

3.1.1 Изменение внутриклеточной локализации *Sis1* разнонаправленно влияет на прионы дрожжей

В ходе предыдущих исследований, проводимых нашей научной группой, было обнаружено дифференциальное влияние сверхэкспрессии фактора *CUR1* на прионы дрожжей (Barbitoff *et al.*, 2017). Сверхэкспрессия гена *CUR1* сопровождается выраженным изменением внутриклеточной локализации *Sis1* с цитоплазматической на внутриядерную. Эти наблюдения позволили сформулировать гипотезу, согласно которой именно изменение локализации *Sis1* и снижение его цитозольной концентрации приводит к наблюдаемым эффектам — усилению фенотипа [*PSI*⁺] и излечиванию [*URE3*]. Данная гипотеза противоречит литературным данным, согласно которым снижение концентрации *Sis1* влечет за собой потерю [*PSI*⁺] и [*URE3*] (Higurashi *et al.*, 2008). В связи с этим, на первом этапе нашей работы необходимо было получить строгое доказательство того, что релокализация *Sis1* может дифференциально влиять на прионы дрожжей.

Для того, чтобы получить такое доказательство, мы проверили эффекты *Cur1*-независимых изменений в локализации *Sis1* на прионы [*PSI*⁺] и [*URE3*]. С этой целью мы использовали варианты *Sis1*, слитые с сигналом ядерного экспорта (NES) или сигналом ядерной локализации (NLS). Сверхпродукция таких химерных белков должна иметь доминантное проявление за счет димеризации *Sis1*. Мы трансформировали клетки штаммов OT520, OT56 и OT55 плазмидами для дополнительной продукции *Sis1*, NLS-*Sis1* и NES-*Sis1*. В соответствии с нашими ожиданиями, продукция NLS-*Sis1* приводила к усилению [*PSI*⁺] и изгнанию [*URE3*] (Рис. 7А), причем эффект на прионный фенотип [*PSI*⁺]^S был сильнее выражен в условиях повышенной температуры.

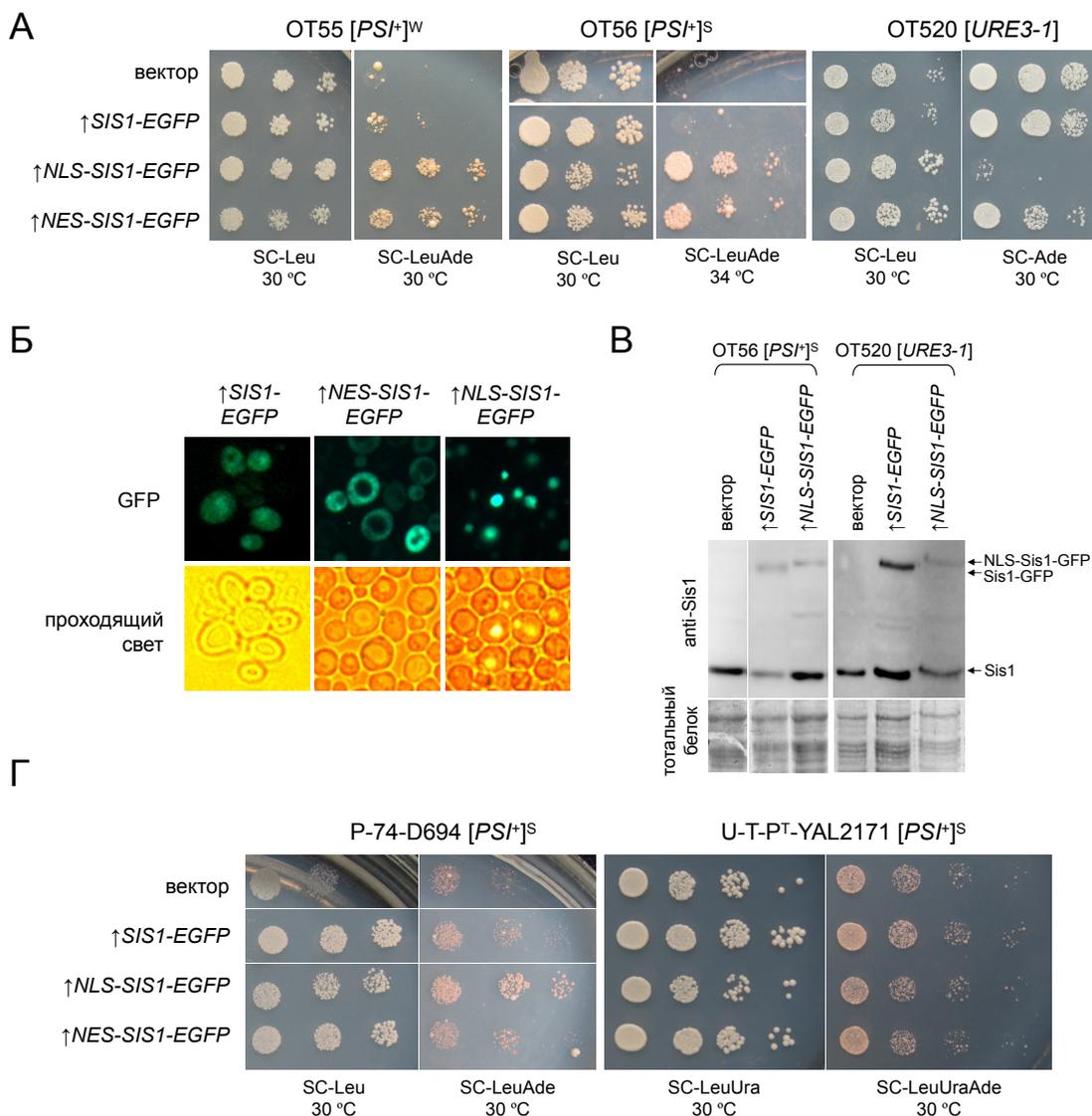


Рисунок 7. Изменение внутриклеточной локализации Sis1 дифференциально влияет на прионы дрожжей и их варианты. **А.** Десятикратные серийные разведения репрезентативных клонов OT55 [*PSI*⁺]^W, OT56 [*PSI*⁺]^S или OT520 [*URE3-1*], трансформированных pRS315CG, pAG415ADH1-Sis1-EGFP, pAG415ADH1-NLS-Sis1-EGFP и pAG415ADH1-NES-Sis1-EGFP. **Б.** Характерная картина распределения Sis1-EGFP, NES-Sis1-EGFP и NLS-Sis1-EGFP в клетках OT56, наблюдаемая при помощи флуоресцентной микроскопии. **В.** Сравнение уровней белка Sis1-GFP и NLS-Sis1-GFP в штаммах OT56 [*PSI*⁺]^S и OT520 [*URE3-1*] при помощи вестерн-блот гибридизации. В качестве контроля использовалась окраска тотального белка Кумасси R250. Плазмиды для экспрессии аналогичны перечисленным в (А). Детекцию целевого белка производили антителами SS2. **Г.** Десятикратные разведения репрезентативных клонов штамма P-74-D694 и U-T-PT-YAL2171, трансформированных вектором (pRS315), а также плазмидами pAG415ADH1-Sis1-EGFP, pAG415ADH1-NLS-Sis1-EGFP и pAG415ADH1-NES-Sis1-EGFP.

Однако, мы также обнаружили, что дополнительная продукция NES-Sis1 действует в том же направлении, что и NLS-Sis1: изгоняет [*URE3*] и усиливает [*PSI*⁺] (Рис. 7А). Интересно отметить, что несмотря на относительно неярко выраженный эффект дополнительной продукции NES-Sis1 на фенотип [*URE3*], наблюдаемый при посеве с разведением (Рис. 7А), частота потери [*URE3*] была высокой при дополнительной продукции как NLS-Sis1-EGFP, так и NES-Sis1-EGFP (доля [*ure-0*] колоний — 98,8% и 88,6%, соответственно).

Для доказательства того, что наблюдаемые эффекты связаны именно с изменением локализации Sis1, мы проверили локализацию белков NLS-Sis1-EGFP и NES-Sis1-EGFP в клетке дрожжей и не нашли отклонений от ранее описанного характера их локализации (Рис. 7Б). Более того, мы проверили уровень различных вариантов белка Sis1 в клетках, сверхэкспрессирующих *SIS1-EGFP* или *NLS-SIS1-EGFP*. Количество белка Sis1-EGFP и NLS-Sis1-EGFP не отличалось (Рис. 7Г), что свидетельствует о том, что эффекты химерной конструкции *NLS-SIS1* не связаны с увеличенной продукцией белка.

Далее мы проверили, воспроизводятся ли наблюдаемые эффекты NLS-Sis1 и NES-Sis1 в штаммах с иным генетическим фоном и вариантами [*PSI*⁺]. Для этого мы использовали штамм P-74-D694, содержащий другой сильный вариант приона [*PSI*⁺] и принадлежащий к Петергофским генетическим линиям, и штамм U-T-P^T-YAL2171, несущий ген *SIS1* на центромерной плазмиде и являющийся производным широко используемого штамма W303. Мы обнаружили, что NLS-Sis1 сохраняет свой эффект на фенотип [*PSI*⁺] в штамме P-74-D694, но не U-T-P^T-YAL2171, в то время как NES-Sis1 не оказывает никакого эффекта на [*PSI*⁺] ни в одном из штаммов (Рис. 7Г). Заметим, однако, что эффект NLS-Sis1 может быть маскирован высокой токсичностью данного варианта белка при его дополнительной продукции.

Таким образом, мы показали, что релокализация Sis1 в ядро за счет дополнительной продукции NLS-Sis1 приводит к разнонаправленным эффектам на различные прионы дрожжей, а сила этих эффектов на прионы носит штамм-специфичный характер.

3.1.2 Изменение локализации *Sis1* не влияет на размер и морфологию агрегатов

Наблюдаемые эффекты релокализации *Sis1* на прионы дрожжей могут объясняться изменениями активности какого-либо из двух важнейших процессов — фрагментации агрегатов или наследования прионных семян в делениях. Для оценки эффективности фрагментации на следующем этапе работы мы проанализировали размер и морфологию агрегатов в клетках различных штаммов [*PSI*⁺], сверхпродуцирующих различные варианты *Sis1*. Для этого мы провели анализ размера агрегатов Sup35 в клетках штаммов OT56, P-74-D694 и U-T-P^T-YAL2171, сверхпродуцирующих *Sis1*-EGFP, NLS-*Sis1*-EGFP или NES-*Sis1*-EGFP. Анализ размера агрегатов при помощи SDD-AGE показал, что дополнительная экспрессия *Sis1*-EGFP приводит к уменьшению агрегатов во всех изученных штаммах. В то же время, размер агрегатов в клетках, сверхпродуцирующих NLS-*Sis1*-EGFP и NES-*Sis1*-EGFP, не отличался от клеток, сверхпродуцирующих *Sis1*-EGFP без дополнительных сигналов внутриклеточной локализации (Рис. 8А).

Отсутствие различий в размере агрегатов в клетках с различной внутриклеточной локализацией *Sis1* говорит о том, что влияние релокализации *Sis1* на прионы, скорее всего, не связано с изменением кинетики фрагментации агрегатов. На следующем этапе мы также проверили, влияет ли изменение локализации *Sis1* на морфологию агрегатов, наблюдаемых при помощи флуоресцентной микроскопии. Для проведения такой проверки мы трансформировали клетки штаммов OT56 и P-74-D694 плазмидами для сверхэкспрессии различных вариантов *SIS1* совместно с плазмидой для контролируемой сверхпродукции фрагмента белка Sup35, содержащего прионный N-домен и заряженный M-домен (Sup35NM), слитый с флуоресцентным белком TagRFP-T. В клетках, продуцирующих белок Sup35NM-TagRFP-T, наблюдалось одно или несколько крупных скоплений данного белка (Рис. 8Б) независимо от сверхпродуцируемого варианта *Sis1*-EGFP.

Таким образом, мы можем сделать вывод о том, что изменение внутриклеточной локализации *Sis1* под действием дополнительной продукции NLS-*Sis1* или NES-*Sis1* не приводит к видимому изменению размера или морфологии прионных агрегатов. Этот результат, в свою очередь, говорит о том, что наблюдаемые эффекты на фенотип приона с наибольшей вероятностью связаны не с изменениями во фрагментации агрегатов.

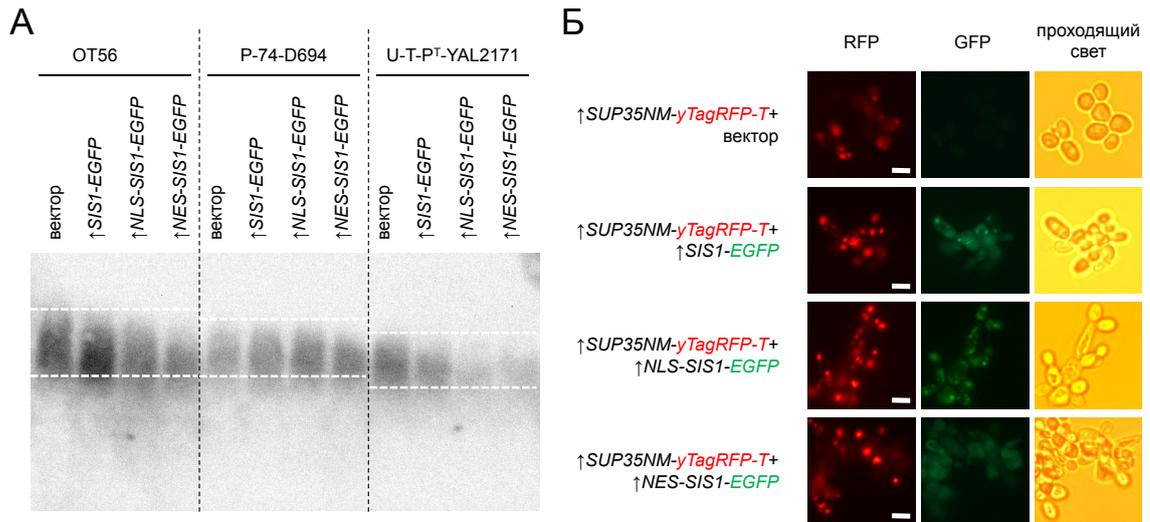


Рисунок 8. Дополнительная продукция NLS-Sis1 и NES-Sis1 не влияет на размер и морфологию агрегатов Sup35 А. Результаты анализа размера агрегатов $[PSI^+]$ в клетках штаммов OT56, P-74-D694 и U-T-P^T-YAL2171, трансформированных вектором или конструкциями для сверхэкспрессии *SIS1-EGFP*, *NLS-SIS1-EGFP* и *NES-SIS1-EGFP*, при помощи SDD-AGE. Детекция проводилась при помощи антител SE4290. Белые пунктирные линии соответствуют области, в которой располагаются агрегаты Sup35 у клеток, несущих пустой вектор. **Б.** Флуоресцентная микроскопия клеток P-74-D694, продуцирующих химерный белок Sup35NM-TagRFP-T и различные варианты Sis1 (*Sis1-EGFP*, *NLS-Sis1-EGFP*, *NES-Sis1-EGFP*). Показаны репрезентативные группы клеток. Масштабная линейка соответствует 5 мкм.

3.1.3 Делеция димеризационного домена *Sis1* ослабляет проявление $[PSI^+]$

Влияние релокализации *Sis1* на прионы дрожжей, наблюдаемое при сверхпродукции фактора Cur1 или химерного белка NLS-Sis1, зависит от димеризации *Sis1* (Malinowska *et al.*, 2012). В соответствии с этими данными, дополнительная экспрессия варианта *Sis1* без димеризационного домена должна эффективно компенсировать влияние изменения локализации *Sis1*.

Для проверки этой гипотезы мы проанализировали фенотип клеток штаммов OT56 $[PSI^+]^S$ и OT520 $[URE3]$, экспрессирующих *CUR1* совместно с нормальным вариантом *SIS1* (*SIS1-EGFP*) и вариантом с делецией С-терминального димеризационного домена (*sis1 Δ DD-EGFP*). Вопреки ожиданию, дополнительная экспрессия *sis1 Δ DD-EGFP* менее эффективно компенсировала эффекты сверхпродукции Cur1 как на $[PSI^+]$, так и на $[URE3]$ (Рис. 9А). Так, дополнительная экспрессия полноразмерного варианта

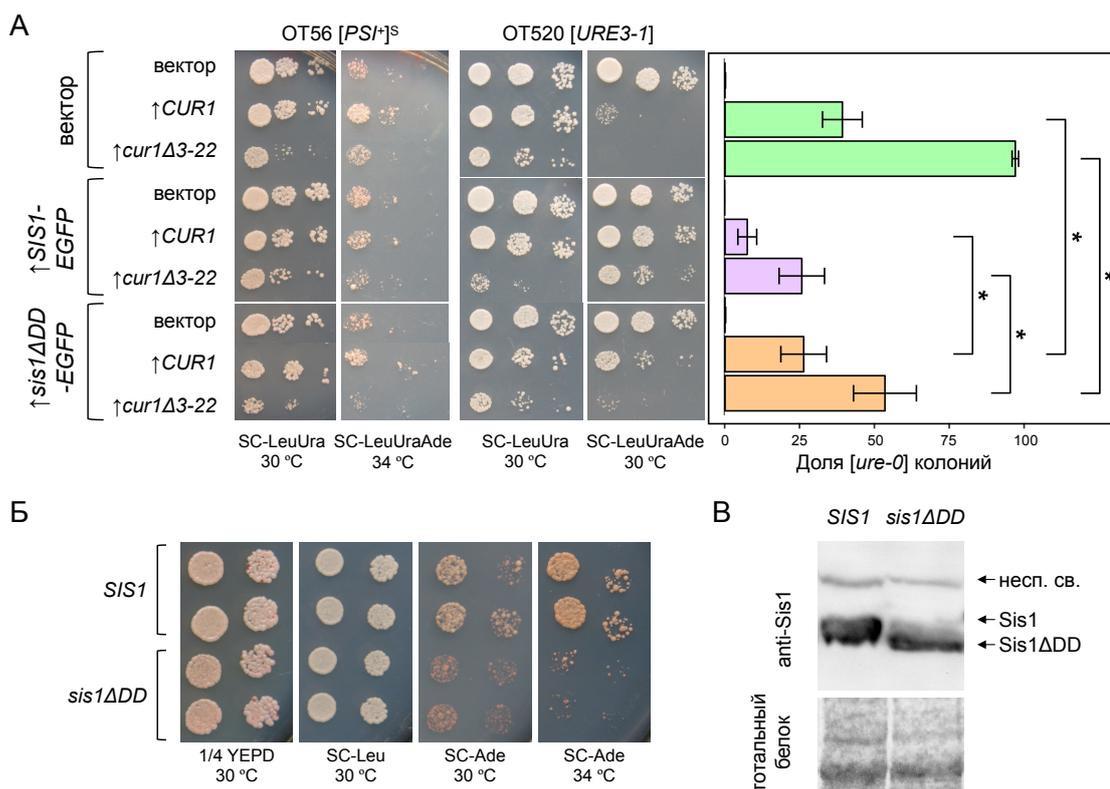


Рисунок 9. Делеция димеризационного домена *Sis1* ослабляет проявление [*PSI*⁺].

А. Слева, десятикратные серийные разведения репрезентативных клонов OT56 и OT520, трансформированных pRS426, pRS426-*CUR1* или pRS426-*cur1Δ3-22* в комбинации с вектором, pAG415ADH-*SIS1*-EGFP или pAG415ADH-*Sis1ΔDD*-EGFP. Справа, количественный анализ потери приона [*URE3*] при сверхэкспрессии вариантов *CUR1* и *SIS1* или *sis1ΔDD*. Показаны средние значения и 95 %-ные доверительные интервалы для средних. *, $p < 0.05$ согласно *U*-критерию Вилкоксона-Манна-Уитни. **Б.** Двадцатикратные серийные разведения репрезентативных клонов штаммов L-T-P^T-YAL2171 (*SIS1*) и LΔ-T-P^T-YAL2171 (*sis1ΔDD*). **В.** Сравнение уровней белка *Sis1* дикого типа и *Sis1ΔDD* в штаммах L-T-P^T-YAL2171 и LΔ-T-P^T-YAL2171, соответственно, при помощи вестерн-блот гибридизации. В качестве контроля использовалась окраска общего белка Кумасси R250. Детекцию целевого белка производили антителами SS2. «несп. св.» - неспецифическое связывание антител.

SIS1-EGFP снижала частоту потери приона [*URE3*] в клетках, сверхпродуцирующих протеолитически стабильный вариант *Cur1Δ3-22*, с 97.2% до 25.7%. В то же время, дополнительная сверхпродукция *sis1ΔDD*-EGFP приводила к менее выраженной компенсации влияния *Cur1Δ3-22* (частота потери [*URE3*] составляла 53.5%).

Меньшая способность *Sis1ΔDD* компенсировать эффекты релокализации *Sis1* на прионы может объясняться тем, что такой вариант менее эффективно способствует

фрагментации прионных агрегатов в клетке. В соответствии с этой гипотезой, делеция димеризационного домена дестабилизирует $[URE3]$ (Reidy *et al.*, 2014). В то же время, негативное влияние делеции димеризационного домена на $[PSI^+]$ ранее не было продемонстрировано. Для проверки того, может ли делеция димеризационного домена *Sis1* ослаблять фенотипическое проявление $[PSI^+]$, нами был сконструирован штамм, несущий *sis1 Δ DD* на плазмиде в качестве единственного эндогенного источника *Sis1* (L Δ -T-P^T-YAL2171). Сравнение эффективности нонсенс-супрессии в этом штамме со штаммом L-T-P^T-YAL2171, несущим полноразмерный вариант *SIS1*, подтвердило выраженное ослабление фенотипического проявления $[PSI^+]$ (Рис. 9Б). Различия в эффективности супрессии были значительно более очевидны при культивировании дрожжей в условиях повышенной температуры. Важно заметить, что различия в силе фенотипического проявления $[PSI^+]$ в штаммах L-T-P^T-YAL2171 и L Δ -T-P^T-YAL2171 не связаны с различным уровнем продукции белка (Рис. 9В).

Таким образом, мономерная форма не способна полностью компенсировать эффекты изменения внутриклеточной локализации *Sis1* на прионы дрожжей. Это явление, наиболее вероятно, связано с тем, что такая форма имеет сниженную активность в поддержании прионов дрожжей.

3.2. Анализ связывания Hsp40 с амилоидными фибриллами

Приведенные в предыдущем подразделе результаты говорят о том, что *Sis1* не только в разной степени необходим для поддержания прионов, но и может как ослаблять, так и усиливать проявление приона при изменении своей локализации. Остается, однако, неясным что определяет направление и силу влияния релокализации *Sis1* на прион. Учитывая, что *Sis1* необходим как для фрагментации амилоидных фибрилл (Tipton *et al.*, 2008; Shorter, Lindquist, 2008), так и для излечения прионов сверхэкспрессией *HSP104* (Kirkland *et al.*, 2011), можно предположить, что направление эффектов определяется балансом этих двух активностей *Sis1*. В свою очередь, это может объясняться особенностями взаимодействия *Sis1* с различными амилоидными агрегатами.

Для проверки этой гипотезы нами был разработан метод для количественной оценки эффективности связывания шаперонов с амилоидными фибриллами (Рис. 10). Предложенный нами метод основан на фракционировании смеси очищенных молекулярных

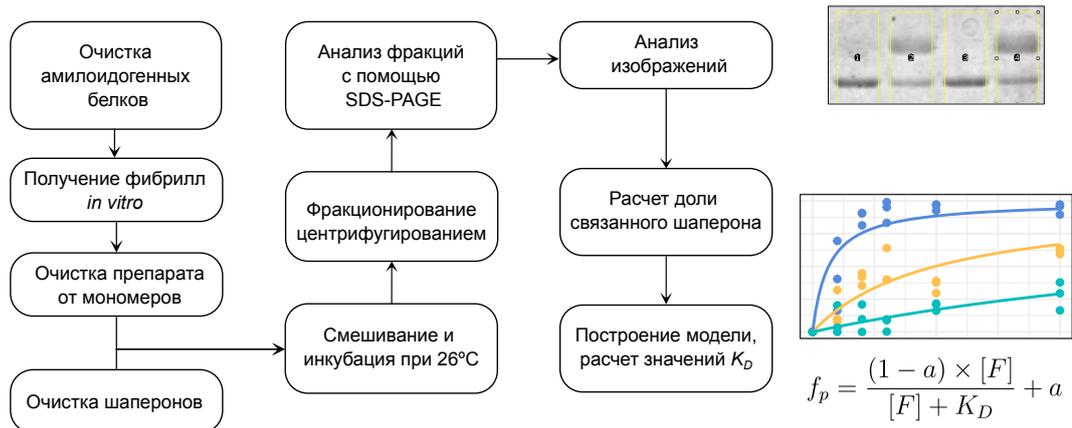


Рисунок 10. Количественная оценка констант связывания Hsp40 с амилоидными фибриллами. Показана схема проведения эксперимента для анализа эффективности связывания шаперона и амилоидных агрегатами (Barbitoff *et al.*, 2020).

шаперонов с фибриллами в системе *in vitro* при помощи центрифугирования. При центрифугировании амилоидные фибриллы вместе со связанными молекулярными шаперонами локализуются в осадочной фракции, что позволяет рассчитать долю связанных молекул шаперона при анализе осадочной и надосадочной фракций при помощи SDS-PAGE.

3.2.1 Подготовка препаратов очищенных шаперонов и амилоидных фибрилл

Для изучения параметров взаимодействия шаперонов с амилоидными фибриллами нами был получен необходимый набор очищенных дрожжевых шаперонов и фибрилл дрожжевых прионогенных белков. Ввиду сложностей с получением амилоидных фибрилл Ure2 мы сосредоточились на работе с фибриллами двух белков — Sup35NM и Rnq1, структурного детерминанта приона $[PIN^+]$. Использование фибрилл Rnq1, но не Ure2, обусловлено сложностью получения и работы с амилоидными фибриллами Ure2 *in vitro*. При этом, $[PIN^+]$ характеризуется значительно более выраженной зависимостью от внутриклеточного уровня Sis1 по сравнению с $[PSI^+]$ (Higurashi *et al.*, 2008).

Мы получили амилоидные фибриллы очищенных белков Sup35NM-His₆ и His₆-Rnq1. Sup35NM характеризовался значительно более эффективным формированием агрегатов уже через сутки инкубации (Рис. 11А), в то время как формирование амилоида Rnq1 занимало значительно более долгое время. Для проверки того, что полученные

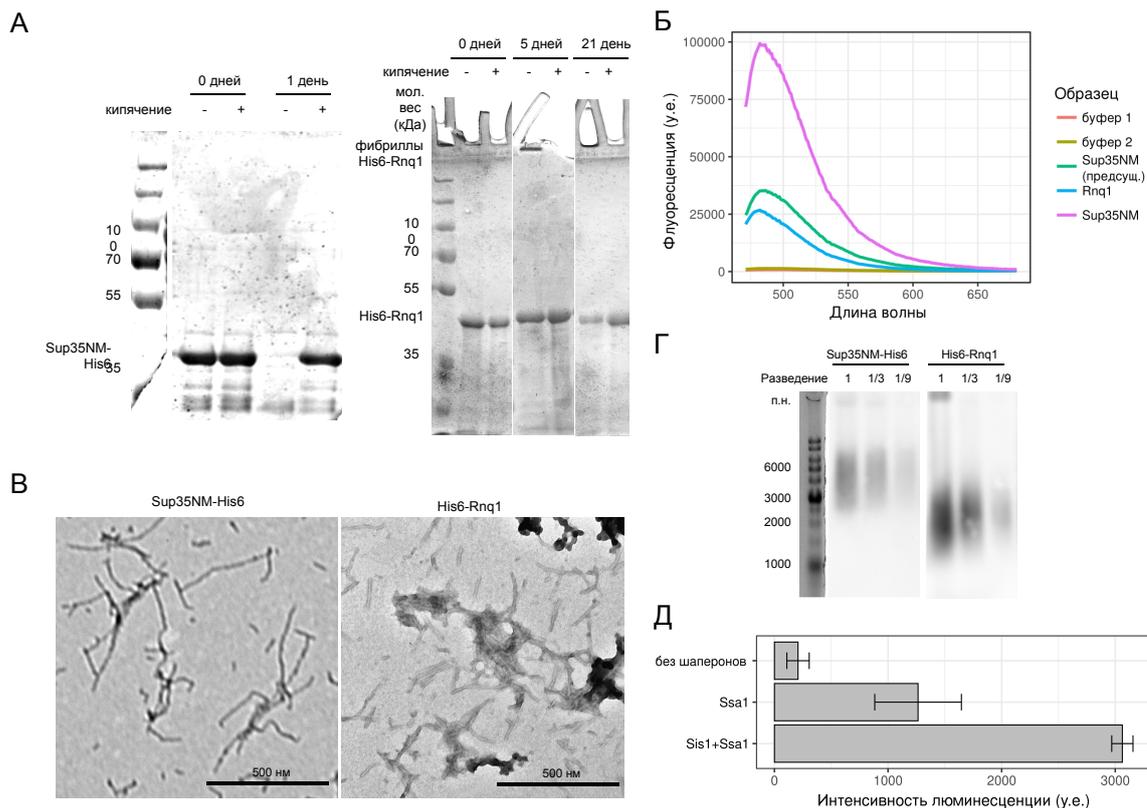


Рисунок 11. Полученные препараты дрожжевых шаперонов и амилоидных фибрилл обладают характерным набором свойств. А. SDS-PAGE анализ препаратов белка, инкубированных в буфере для образования фибрилл соответствующего состава в течение указанного количества дней. Об образовании фибрилл свидетельствует снижение уровня мономерного белка в пробах, не подвергавшихся кипячению с SDS. **Б.** Окрашивание полученных фибрилл амилоид-специфическим красителем тиофлавином Т. Кривые на графике соответствуют спектрам флуоресценции двух буферных растворов (аналогичных использованным для получения фибрилл Sup35NM и Rnq1, соответственно), предшествующих фибрилл Sup35NM, а также полученных в ходе работы фибрилл Sup35NM и Rnq1. **В.** Электронные микрофотографии препаратов амилоидных фибрилл Sup35NM и Rnq1. **Г.** Анализ размера амилоидных фибрилл из препаратов на (В) с помощью SDD-AGE. Маркер молекулярного веса ДНК приведен для оценки массы агрегатов. **Д.** Интенсивность люминесценции денатурированной люциферазы светлячка после инкубации с указанными комбинациями молекулярных шаперонов. Показаны средние значения и стандартные отклонения для трёх технических повторностей эксперимента.

агрегаты характеризуются ожидаемыми структурными особенностями амилоидов, мы проверили связывание агрегатов с амилоид-специфическим красителем тиофлавином Т. Данный анализ подтвердил, что агрегаты и Sup35NM, и Rnq1 взаимодействуют с тиофлавином Т, что можно наблюдать по характерному изменению спектра флуорес-

ценции (Рис. 11Б). Далее мы проанализировали морфологию полученных агрегатов при помощи ТЭМ с негативным контрастированием. На электронных микрофотографиях наблюдались характерные фибриллярные структуры, медианная длина которых составляла 347 нм в случае Sup35NM и 146 нм в случае Rnq1 (Рис. 11В). Анализ препаратов полученных фибрилл при помощи SDD-AGE также показал сходные различия в молекулярной массе агрегатов (Рис. 11Г), причем оцененный по данным SDD-AGE молекулярный вес фибрилл хорошо соответствовал оценкам по данным ТЭМ (Drozdova *et al.*, 2020). На основе полученных результатов мы заключили, что полученные нами агрегаты Sup35NM и Rnq1 обладают характерным набором амилоидных свойств.

Для проверки активности полученных препаратов очищенных дрожжевых шаперонов мы воспользовались методом, основанным на восстановлении активности люциферазы (см. «Материалы и методы», Glover, Lindquist, 1998). Результаты эксперимента показали, что очищенный Hsp70-Ssa1 способствует восстановлению люминесценции денатурированной люциферазы, при этом его активность значительно возрастает при добавлении Hsp40-Sis1 (Рис. 11Д). Таким образом, полученные препараты очищенных дрожжевых шаперонов сохраняют характерную функциональность.

3.2.2 Sis1 эффективно взаимодействует с фибриллами Sup35NM, но не Rnq1

На первом этапе работы с полученными препаратами амилоидных фибрилл и дрожжевых шаперонов мы проанализировали эффективность связывания Sis1 с амилоидными фибриллами Sup35NM и Rnq1. Для проведения такого анализа мы смешивали очищенный полноразмерный Sis1 или Sis1 Δ DD в концентрации 4 μ M с фибриллами, варьируя их концентрацию (в расчете на мономерный белок в составе агрегатов) от 4 до 40 μ M.

Мы обнаружили, что Sis1 эффективно связывается с фибриллами Sup35NM. Так, количество Sis1 в осадочной фракции превышало 50% уже при концентрации фибрилл в 20 μ M ($K_D = 16.8 \pm 2.3 \mu$ M, $p < 0.001$ согласно t -критерию). Напротив, взаимодействие с фибриллами Rnq1 было крайне слабым, а большая часть молекул шаперона оставалась в надосадочной фракции даже при концентрации фибрилл 40 μ M (Рис. 12) ($K_D = 158.3 \pm 81.7 \mu$ M, $p > 0.05$). При этом делеция димеризационного домена Sis1 приводила к ослаблению его взаимодействия с амилоидными агрегатами Sup35NM ($K_D =$

$76.1 \pm 23.9 \mu\text{M}$, p -значение при сравнении с полноразмерным белком < 0.05). Взаимодействие варианта $\text{Sis1}\Delta\text{DD}$ с фибриллами Rnq1 не наблюдалось в наших экспериментах (Рис. 12).

Высокая эффективность связывания Sis1 с фибриллами Sup35NM может свидетельствовать о формировании детергент-устойчивых комплексов шаперона с фибрилой. Свидетельства такого детергент-устойчивого взаимодействия ранее наблюдались в экспериментах по протеомному скринингу амилодогенных белков дрожжей (Nizh-

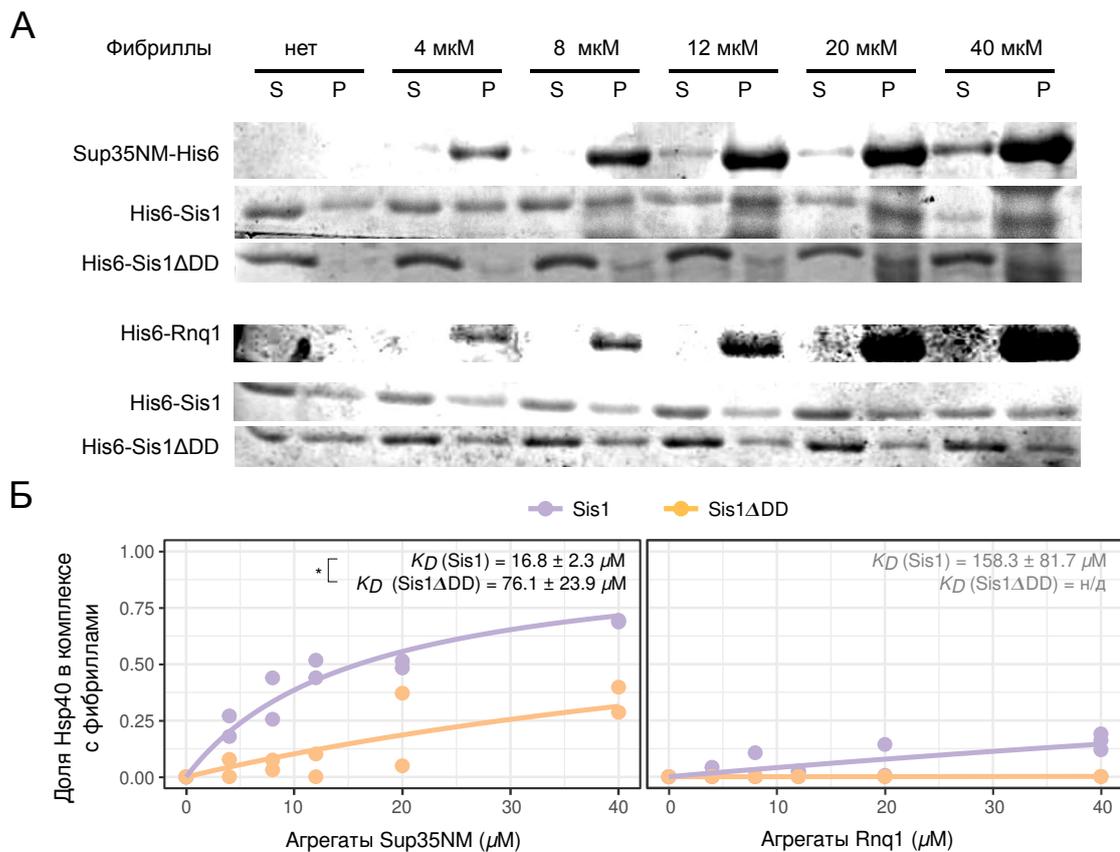


Рисунок 12. Sis1 эффективно взаимодействует с фибриллами Sup35NM , но не Rnq1 , а делеция димеризационного домена снижает сродство Sis1 к фибриллам. А. Распределение Hsp40 по надосадочной и осадочной фракциям при добавлении в смесь амилоидных фибрилл соответствующего белка в указанной концентрации. Приведена одна репрезентативная техническая повторность для каждой комбинации белков. Показаны результаты анализа SDS-PAGE с окрашиванием геля Кумасси R250. Вверху, Sup35NM ; внизу, Rnq1 . **Б.** Результаты количественного анализа экспериментов, представленных на (А). Представлены доли связанного Hsp40 после поправки на уровень осаждения без добавления фибрилл. Каждая точка соответствует одной повторности эксперимента с указанными концентрациями белков. Кривые соответствуют оптимальным регрессионным моделям для каждого из случаев. * - $p < 0.05$ согласно t -критерию

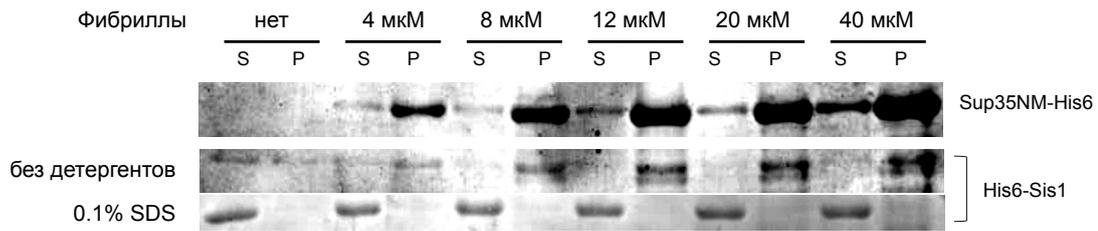


Рисунок 13. Комплексы Sis1 с фибриллами Sup35NM не устойчивы к обработке детергентами. Распределение белков по надосадочной и осадочной фракции при центрифугировании смеси Sis1 с фибриллами Sup35NM без предварительного добавления детергентов или с добавлением 0,1% SDS. S — надосадочная фракция, супернатант; P — осадочная фракция. Окрашивание полиакриламидных гелей Кумасси R250.

nikov *et al.*, 2014; 2016). Для проверки того, обладают ли наблюдаемые нами комплексы устойчивостью к обработке детергентами, мы инкубировали смесь Sis1 с фибриллами Sup35NM с детергентами (0,1% SDS или 0,3% саркозилат натрия) и проанализировали долю шаперона в комплексе с агрегатами после такой обработки. Результаты эксперимента показали, что комплексы Sis1 с фибриллами полностью диссоциируют после добавления детергентов (Рис. 13). Этот результат свидетельствует о том, что присутствие Sis1 в детергент-устойчивой фракции в протеомных экспериментах не объясняется силой его взаимодействия с фибриллой.

3.2.3 Мутации в олигопептидных повторах N-домена Sup35 не влияют на связывание Sis1

На следующем этапе работы мы проанализировали влияние мутаций в N- и M-доменах Sup35 на взаимодействие Sis1 с фибриллами Sup35NM. Для исследования нами были использованы 5 мутаций (Рис. 14А). Четыре из использованных мутаций локализируются в олигопептидных повторах в N-доме Sup35 (*sup35-M1*, *sup35-M2*, *sup35-M4*, *sup35-M5*) (Bondarev *et al.*, 2013). Эти мутации представляют собой замены полярных остатков на заряженные в 1-ом, 2-ом, 4-ом и 5-ом олигопептидных повторах, соответственно. Замена аллели *SUP35* дикого типа у дрожжей на мутантные аллели *sup35-M1* и *sup35-M2* приводит к потере приона [*PSI*⁺], в то время как мутации *sup35-M4* и *sup35-M5* способны поддерживать преобладающий вариант приона (Bondarev

et al., 2013). Все 4 мутации по своей природе должны значительно изменять укладку мономера в составе фибриллы. Также нами были получены амилоидные фибриллы варианта Sup35NM с делецией участка 131—140 а.к.о. в М-домене, соответствующего сайту связывания Hsp104 (Helsen, Glover, 2012). Схожая делеция, затрагивающая участок 129—148 а.к.о., препятствует излечиванию $[PSI^+]$ сверхэкспрессией *HSP104*.

Анализ связывания Sis1 с фибриллами, сформированными вышеуказанными вариантами Sup35NM, производили по методике, аналогичной использованной для оценки K_D Sis1 с фибриллами Sup35NM дикого типа. Мы обнаружили, что эффективность взаимодействия Sis1 с фибриллами была сходной для всех изученных мутантных ва-

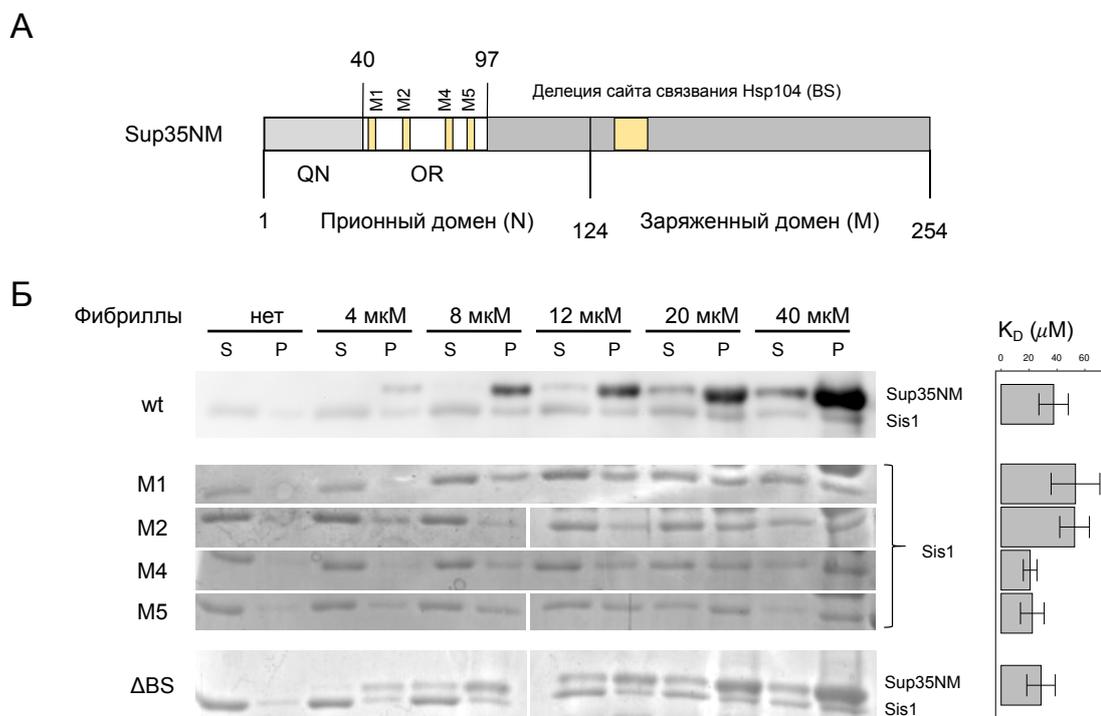


Рисунок 14. Мутации в олигопептидных повторах N-домена Sup35 и делеция сайта связывания Hsp104 не влияют на взаимодействие с Sis1 **А.** Схема расположения изученных мутаций в структуре Sup35NM. QN - участок N-домена, богатый аспарагином и глутамином. OR - участок N-домена, содержащий олигопептидные повторы. **Б.** Распределение Sis1 по надосадочной и осадочной фракциям при добавлении в смесь амилоидных фибрилл указанных вариантов Sup35NM в указанной концентрации. Приведена одна репрезентативная техническая повторность для каждой комбинации белков. Показаны результаты анализа SDS-PAGE с окрашиванием геля Кумасси R250. Справа показаны результаты количественной оценки K_D комплексов Sis1 с фибриллами указанных вариантов Sup35NM.

Таблица 6. Значения K_D комплексов Sis1 с фибриллами вариантов Sup35NM

Вариант	K_D	p-значение [†]
Sup35NM	37.1 ± 8.8	
Sup35NM-M1	40.8 ± 13.9	0.22
Sup35NM-M2	57.3 ± 9.8	0.07
Sup35NM-M4	24.1 ± 4.2	0.10
Sup35NM-M5	26.1 ± 7.3	0.17
Sup35NM Δ BS	32.1 ± 9.1	0.35

[†] - p-значение согласно *t*-критерию при сравнении K_D для фибрилл мутантного варианта и фибрилл белка дикого типа.

риантов Sup35NM (Рис. 14Б), а оцененные при помощи нашего метода значения K_D не демонстрировали значимых различий (значения K_D приведены в таблице 6).

3.3. Взаимосвязь между связыванием Hsp40 и привлечением других шаперонов к фибрилле

3.3.1 Эффективность связывания Hsp40 с фибриллами не оказывает прямого влияния на привлечение Hsp70

Далее мы изучили влияние обнаруженных различий в связывании Hsp40 с амилоидными фибриллами на эффективность привлечения к фибриллам молекулярных шаперонов других групп (Hsp70 и Hsp104). Сначала мы изучили формирование комплексов Hsp70-Ssa1 с фибриллами Sup35NM и Rnq1 без добавления Hsp40 и в присутствии Sis1 или Sis1 Δ DD. Для этого мы смешивали Ssa1 и Hsp40 в концентрации $4 \mu\text{M}$ с фибриллами, варьируя их концентрацию от 4 до $40 \mu\text{M}$. Анализ проводили в присутствии 5 мМ АТФ и АТФ-регенерирующей системы (100 мкг/мл креатинфосфокиназы и 10 мМ креатинфосфата) для поддержания уровня АТФ в пробе. Анализ доли связанного Ssa1 показал, что эффективное взаимодействие наблюдается только с фибриллами Rnq1 в присутствии полноразмерного варианта Sis1 (Рис. 15), ($K_D = 55.7 \pm 15.1 \mu\text{M}$, $p < 0.001$). Делеция димеризационного домена Sis1 приводила к полной потере способности привлекать Ssa1 к фибриллам Rnq1 (Рис. 15А). При анализе привлечения Ssa1 к фибриллам Sup35NM мы не наблюдали достоверного связывания ни в одном из случаев ($p > 0.05$) несмотря на незначительное увеличение количества Ssa1 в осадочной фракции при большой концентрации фибрилл (Рис. 15).

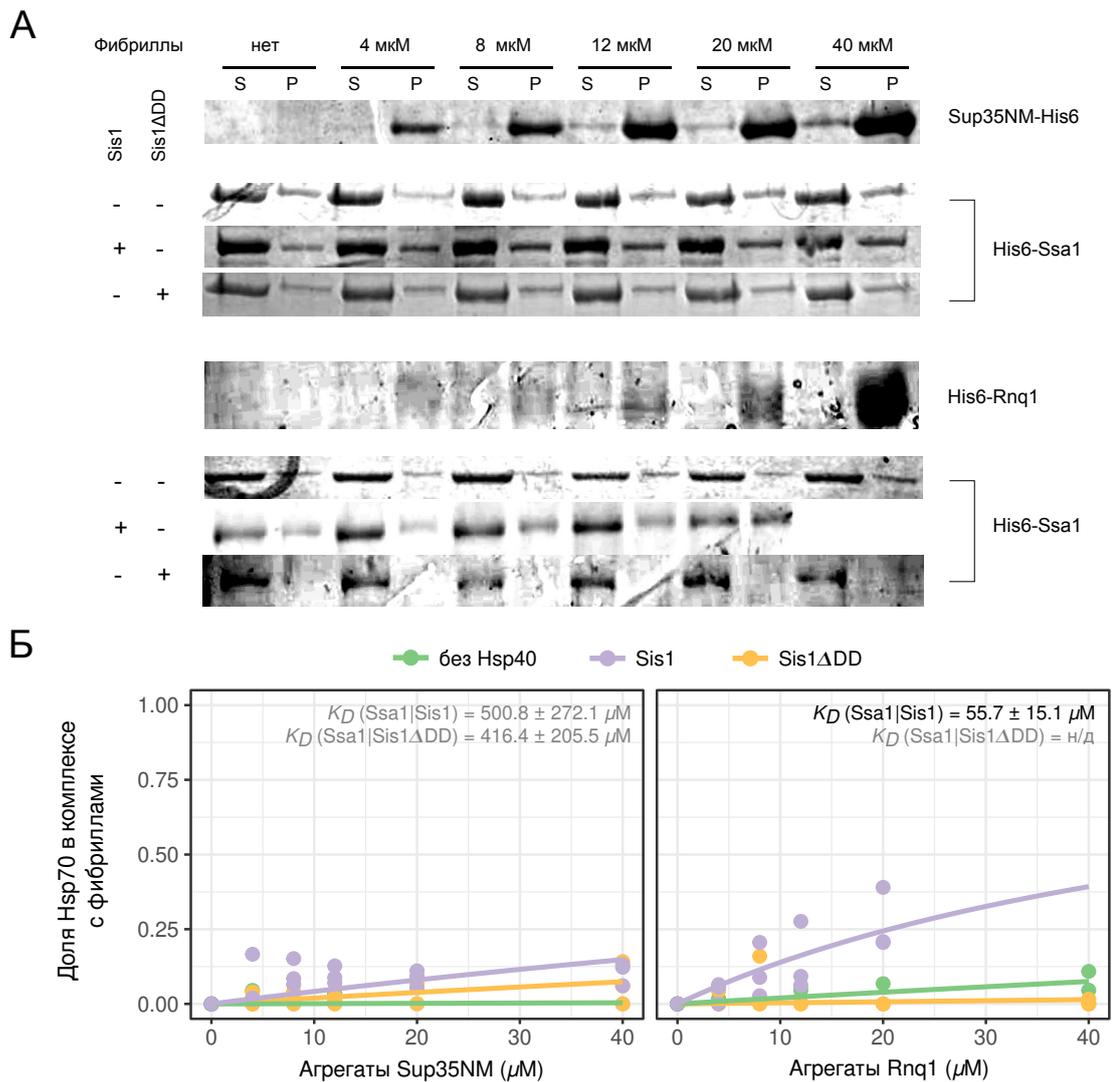


Рисунок 15. Эффективное связывание Ssa1 наблюдается только с фибриллами Rnq1 в присутствии полноразмерного Sis1. А. Распределение Hsp70-Ssa1 по надосадочной и осадочной фракциям при добавлении в смесь амилоидных фибрилл соответствующего белка в указанной концентрации и указанных Hsp40. Приведена одна репрезентативная техническая повторность для каждой комбинации белков. Показаны результаты анализа SDS-PAGE с окрашиванием геля Кумасси R250. Вверху, Sup35NM; внизу, Rnq1. Б. Результаты количественного анализа экспериментов, представленных на (А). Приведены доли связанного Hsp70-Ssa1 после поправки на уровень осаждения без добавления фибрилл. Каждая точка соответствует одной повторности эксперимента с указанными концентрациями белков. Кривые соответствуют оптимальным регрессионным моделям для каждого из случаев. Значения K_D приведены для комплексов Ssa1 с фибриллами в присутствии Sis1 или Sis1 Δ DD. Комбинации, для которых полученные значения K_D недостоверны ($p > 0.05$) отмечены серым шрифтом.

Для подтверждения того, что Ssa1 способен привлекаться и к фибриллам Sup35NM в нашей системе мы проанализировали взаимодействие Ssa1 с фибриллами при большем избытке агрегатов. Для этого мы снизили используемую концентрацию Ssa1 до 1 μ M и изучили его связывание с фибриллами в концентрации 40 μ M. Также в этих экспериментах мы отказались от использования АТФ-регенерирующей системы. Мы обнаружили, что Ssa1 действительно взаимодействует с фибриллами Sup35NM, причем это взаимодействие наблюдается именно при наличии в смеси Hsp40 (Рис. 16А). Количественная оценка доли Ssa1 в осадочной фракции подтвердила наличие достоверного увеличения доли связанного Ssa1 при добавлении в смесь Sis1 (Рис. 16Б). Заметим, что вариант Sis1, лишенный димеризационного домена, также способствовал значительному привлечению Ssa1 к агрегатам. Медианная доля Ssa1 в осадочной фракции была незначительно снижена по сравнению с полноразмерным Sis1, но наблюдаемые различия были статистически недостоверны ($p = 0.11$ по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни). Мы также доказали, что взаимодействие Ssa1 с агрегатами зависит от его АТФ-Фазной активности. Для этого мы проанализировали долю Ssa1 в осадочной фракции при добавлении в смесь негидролизуемого аналога АТФ, АМФ-ФНФ. В этом эксперименте добавление Hsp40 не влияло на связывание Ssa1 с фибриллами, а доля Ssa1 в осадочной фракции оставалась на фоновом уровне (Рис. 16)

Мы также исследовали привлечение Hsp70 с агрегатами Sup35NM при использовании мутантного варианта Ssa1, Ssa1-21. Мутация *SSA1-21* характеризуется доминантно негативным эффектом на поддержание некоторых вариантов приона [*PSI*⁺] (Jung *et al.*, 2000; Jones, Masison, 2003; Barbitoff *et al.*, 2022). Мутантный белок Ssa1-21 также связывался с фибриллами Sup35NM, более того, доля Ssa1-21 в осадочной фракции достигала 49,7% даже без добавления Hsp40 (в случае белка дикого типа это значение было достоверно ниже, 27,8% ($p < 0.01$)). При этом эффективность связывания Ssa1-21 с фибриллами при добавлении Sis1 была сравнима с Ssa1 дикого типа (Рис. 16Б, $p = 0.69$). Интересно, что эффективность привлечения Ssa1-21 к агрегатам Sup35NM при наличии в смеси Sis1 Δ DD была достоверно ниже, чем при добавлении полноразмерного Sis1 ($p < 0.01$).

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют об отсутствии прямой взаимосвязи между связыванием Hsp40 с фибриллами и привлечением к ним

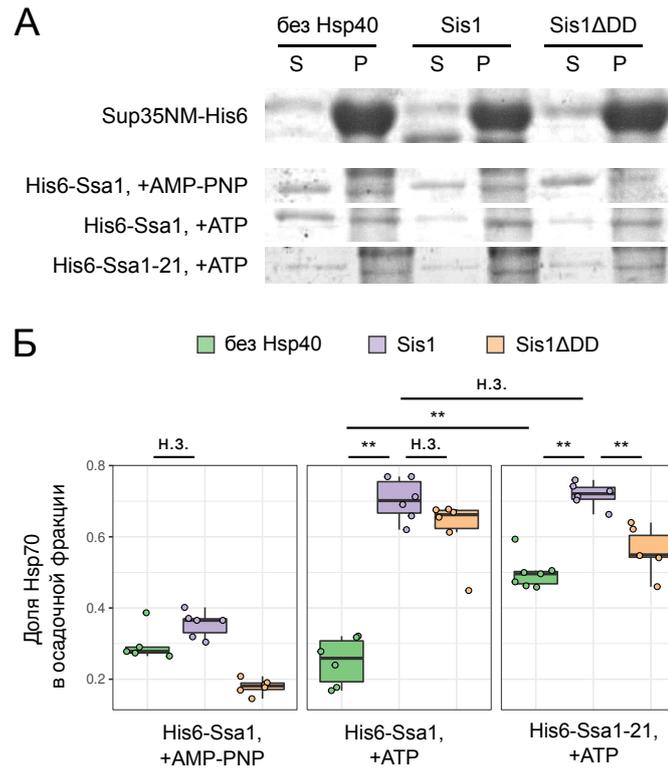


Рисунок 16. Привлечение Ssa1 к амилоидным агрегатам Sup35NM зависит от Sis1 и АТФ-азной активности Ssa1. А. SDS-PAGE анализ распределения Hsp70 (Ssa1 или Ssa1-21) по надосадочной (S) и осадочной (P) фракциям после инкубации с 40-кратным избытком фибрилл Sup35NM и обозначенными Hsp40. Показана единичная репрезентативная повторность эксперимента. Окрашивание геля Кумасси R250. **Б.** Доля Hsp70 в осадочной фракции при добавлении указанных комбинаций Hsp40 и АТФ или АМФ-ФНФ. ** - $p < 0.01$, н.з. - $p > 0.05$ в тесте Вилкоксона-Манна-Уитни

Hsp70. Так, Sis1 эффективно формирует комплексы с Sup35NM и характеризуется более низкой эффективностью рекрутирования Hsp70 к агрегатам Sup35NM по сравнению с агрегатами Rnq1, несмотря на значительно более низкое сродство к этим агрегатам. В то же время, делеция димеризационного домена Sis1 ослабляет его взаимодействие с фибриллами Sup35NM, но не влияет на рекрутирование Hsp70.

3.3.2 Sis1 не стимулирует взаимодействие Hsp104 с агрегатами без участия иных кофакторов

Положительное влияние Sis1 на излечение $[PSI^+]$ при сверхэкспрессии *HSP104* позволяет предположить, что формирование прочных комплексов Sis1 с амилоидными фибриллами Sup35 может стимулировать взаимодействие Hsp104 с агрегатами неза-

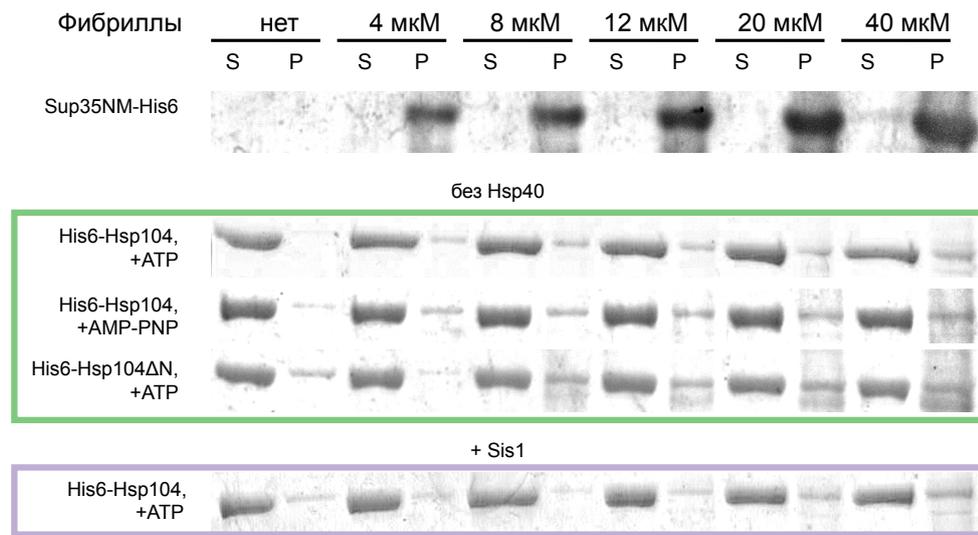


Рисунок 17. Hsp104 не формирует стабильных комплексов с агрегатами Sup35NM ни в присутствии, ни в отсутствии Sis1. Распределение Hsp104 или Hsp104ΔN по надосадочной (S) и осадочной (P) фракциям при добавлении в смесь амилоидных фибрилл Sup35NM в указанной концентрации, АТФ или АМФ-ФНФ, а также Sis1 (внизу). Приведена одна репрезентативная техническая повторность для каждой комбинации белков. Показаны результаты анализа SDS-PAGE с окрашиванием геля Кумасси R250.

висимо от Hsp70. Для проверки этой гипотезы мы также проанализировали формирование комплексов Hsp104 в концентрации 2 μM с амилоидными агрегатами Sup35NM, варьируя их концентрацию от 4 до 40 μM . Мы наблюдали незначительное увеличение количества Hsp104 в осадочной фракции при большом избытке фибрилл Sup35NM (Рис. 17), причем это увеличение наблюдалось как в присутствии АТФ, так и в присутствии АМФ-ФНФ. Аналогичная картина наблюдалась и для варианта Hsp104ΔN, который не способен излечивать $[PSI^+]$ при сверхэкспрессии (Hung, Masison, 2006). Количественный анализ полученных данных, однако, не выявил достоверного связывания ни в одном из случаев ($p > 0.05$). Добавление Sis1 в смесь никак не сказывалось на взаимодействии Hsp104 с агрегатами (Рис. 17). Полученные результаты свидетельствуют о том, что Hsp104 не формирует стабильных комплексов с фибриллами Sup35NM ни в присутствии, ни в отсутствии Sis1; наиболее вероятно, что для связывания необходимы другие кофакторы. Необходимо заметить, однако, что полученные данные могут объясняться сниженной функциональной активностью рекомбинантного Hsp104 ввиду

наличия у него N-концевой His₆-метки. Таким образом, данный вопрос требует дальнейшего исследования.

Глава 4. Обсуждение

4.1. Роль Hsp40 в жизненном цикле прионов дрожжей

Как уже было сказано ранее, белки группы Hsp40 играют важнейшую роль в регуляции активности и субстратной специфичности шаперонов Hsp70 (см. обзор Craig, Marszalek, 2017). Прионы дрожжей не являются исключением, и их поддержание также во многом регулируется именно балансом различных Hsp40.

Целый ряд работ демонстрировал центральную роль Sis1 в поддержании наиболее изученных прионов дрожжей (Sondheimer *et al.*, 2001; Tipton *et al.*, 2008; Higurashi *et al.*, 2008; Kirkland *et al.*, 2011; Hines *et al.*, 2011; Reidy *et al.*, 2014; Stein, True, 2014). Дрожжевые прионы $[PSI^+]$, $[URE3]$, $[PIN^+]$ и $[SWI^+]$ теряются при снижении уровня Sis1 в клетке, хотя для потери приона требуется различное число поколений (Higurashi *et al.*, 2008). Наблюдаемые нами дифференциальные эффекты изменения локализации Sis1 на прионы дрожжей (Рис. 7, 8; Barbitoff *et al.*, 2017; Matveenko *et al.*, 2018) указывают на то, что в некоторых случаях снижение цитозольной концентрации Sis1 может положительно влиять на поддержание прионов, в частности, $[PSI^+]$. Учитывая, что сверхпродукция NLS-Sis1 не вызывает видимых изменений размера и морфологии агрегатов (Рис. 8), можно предположить, что небольшое снижение цитозольной концентрации Sis1 влияет не на фрагментацию прионных агрегатов, а на их распределение в клеточных делениях. Данное предположение согласуется с увеличением количества прионных семян, наблюдаемым при сверхпродукции фактора Cur1 (Son, Wickner, 2022). Изменения в характере распределения прионных семян в делениях может объясняться изменением активности процесса удержания прионных семян в материнской клетке, опосредованного Hsp104.

В совокупности с описанными нами ранее разнонаправленными эффектами Hsp40-Ydj1 и фактора Cur1 на прионы $[PSI^+]$ и $[URE3]$, а также существующими в литературе описаниями эффектов иных шаперонов на прионы дрожжей, полученные данные позволяют нам сформулировать уточненную модель поддержания различных прионов дрожжей (Рис. 18). Так, поддержание приона $[URE3]$ строго зависит от высоких уровней Sis1, а также от активности кошаперона Swa2. Эти белки критически важны для фрагментации фибрилл Ure2 и формирования прионных семян. Ydj1, напротив,

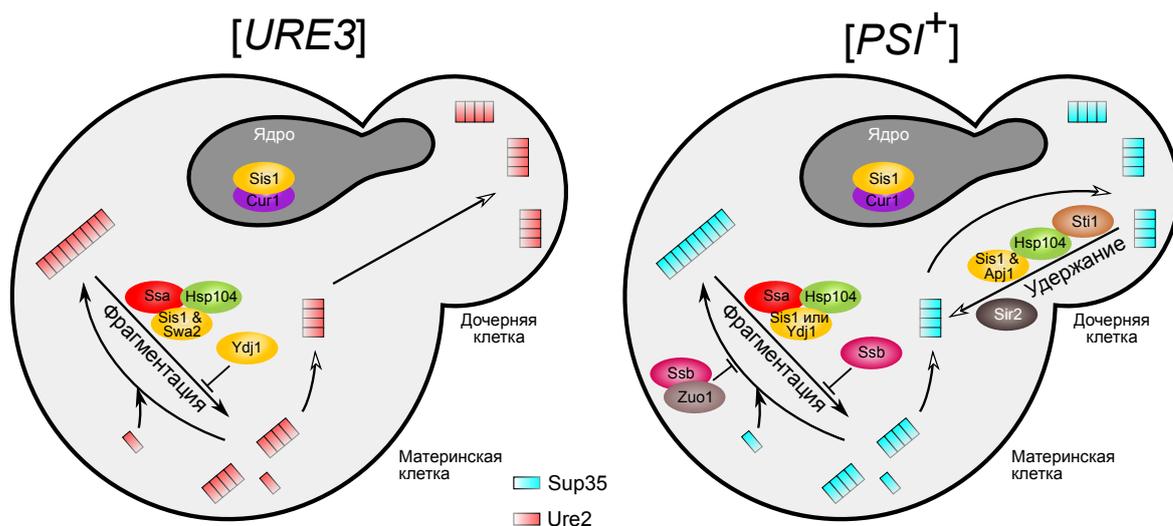


Рисунок 18. Модель, объясняющая дифференциальные эффекты Hsp40 на $[PSI^+]$ и $[URE3]$ (модель дифференциального взаимодействия Hsp40 с прионами дрожжей). Стрелки соответствуют клеточным процессам, влияющим на поддержание приона. Стрелки с белым наконечником обозначают процессы, связанные с передачей прионных семян. (адаптировано из Matveenko *et al.*, 2018; Barbitoff *et al.*, 2022).

препятствует фрагментации агрегатов $[URE3]$, вследствие чего его сверхэкспрессия приводит к изгнанию этого приона (Moriyama *et al.*, 2000; Sharma, Masison, 2008b). Для приона $[PSI^+]$, напротив, и Sis1, и Ydj1, вероятнее всего, способствуют фрагментации агрегатов; это предположение подтверждается как данными, полученными нами *in vivo* (Barbitoff *et al.*, 2017), так и результатами экспериментов в системе *in vitro* (Shorter, Lindquist, 2008). В то же время, в отличие от $[URE3]$, поддержание $[PSI^+]$ зависит от второго Hsp104-опосредованного процесса, удержания прионных семян в материнской клетке. Этот процесс способствует изгнанию приона при сверхпродукции Hsp104. Известно, что сверхпродукция Sis1 способствует этому процессу (Kryndushkin *et al.*, 2002). Помимо Sis1, в этом процессе играют важную роль и другие кофакторы, такие как Hsp40-Apj1, Sti1 и Sir2 (Astor *et al.*, 2018; Gorkovskiy *et al.*, 2017; Howie *et al.*, 2019). Таким образом, изменение внутриклеточной локализации Sis1 и падение его цитозольной концентрации может в большей степени сказываться на удержании семян в материнской клетке ввиду того, что для протекания этого процесса необходим Sis1, а Ydj1 не способен выполнять эту функцию. Напротив, фрагментация агрегатов может быть менее зависима от локализации Sis1 за счет выполнения его функции иными

белками группы Hsp40.

Стоит заметить, что предложенная нами модель основывается на наличии независимого механизма удержания семян в материнской клетке. Этот механизм, как было сказано ранее, наиболее активно проявляется при сверхэкспрессии *HSP104*, однако работает и при нормальных его уровнях (Gorkovskiy *et al.*, 2017). В то же время, ряд исследователей подвергает сомнению существование такого процесса. Так, в недавнем исследовании Хуанга с соавторами было показано, что мутантные варианты *HSP104*, не способные излечивать $[PSI^+]$ при сверхэкспрессии (*HSP104 Δ N* и *HSP104^{T160M}*), характеризуются сниженной активностью и в процессе фрагментации агрегатов (Huang *et al.*, 2021). Вследствие этого, варианты приона, индуцированные в присутствии нормальной аллели *HSP104*, не способны поддерживаться на фоне мутантного варианта. На основе этих данных авторами был сделан вывод о том, что процесс излечения $[PSI^+]$ сверхэкспрессией *HSP104* имеет ту же природу, что и обычная фрагментация агрегатов. Полученные нами результаты, свидетельствующие об ослаблении прионного фенотипа $[PSI^+]$ при делеции димеризационного домена *SIS1* (Рис. 9), могут рассматриваться как дополнительное свидетельство в пользу данной гипотезы. В то же время, данная гипотеза не согласуется с результатами анализа фенотипа приона при сверхпродукции NLS-Sis1, в которых наблюдалось усиление приона, не зависящее от эффективности фрагментации (Рис. 7, 8)

4.2. Молекулярные механизмы дезагрегации амилоидов

Описанная в предыдущем разделе модель, объясняющая наблюдаемые дифференциальные эффекты *Sis1* и других шаперонов на прионы дрожжей, требует объяснения с точки зрения молекулярных механизмов рассматриваемых прион-шаперонных взаимодействий.

Как было упомянуто в предыдущих главах, роль системы Hsp40/Hsp70/Hsp104 в разборке агрегатов была постулирована еще в 1998 г. (Glover, Lindquist, 1998; Kushnirov, Ter-Avanesyan, 1998). За последние два десятилетия в различных лабораториях прилагались значительные усилия для расшифровки точной последовательности молекулярных взаимодействий, происходящих в ходе нормального цикла дезагрегации (см. обзор Kushnirov *et al.*, 2021).

В 2006-ом г. в экспериментах по анализу динамики агрегации полноразмерного Sup35 было показано, что шапероны групп Hsp40 и Hsp70 предпочтительно взаимодействуют с мономерными формами Sup35 или короткими олигомерами, но не с протяженными амилоидными фибриллами (Krzewska, Melki, 2006). Более того, в этих экспериментах Ydj1 демонстрировал более выраженное взаимодействие с олигомерами Sup35 по сравнению с Sis1, связывание которого с высокомолекулярными формами Sup35 наблюдалось только при взаимодействии с Ssa1. Эти результаты находятся в хорошем соответствии с недавней работой, опубликованной в 2022 г. лабораторией Танаки (Nakagawa *et al.*, 2022). В этом исследовании был применен метод микроскопии сверхвысокого разрешения для мониторинга взаимодействия шаперонов с фибриллами в режиме реального времени. Анализ, приведенный в данной работе, показал, что Sis1 не взаимодействует с фибриллами Sup35NM, полученными при инкубации в холоде (при 4 °C) (фибриллами «Sc4»). Напротив, авторы наблюдали эффективное связывание шаперонов с фибриллами при наличии в растворе как Sis1, так и Ssa1. На основе этих данных авторами была предложена модель дезагрегации, согласно которой первым этапом цикла фрагментации агрегата является совместное связывание комплекса Sis1/Ssa1 с фибриллой с последующим многократным привлечением Hsp104 к одному и тому же участку фибриллы (Рис. 19А).

Данные, полученные нами в ходе исследования, противоречат результатам из вышеуказанных работ. Так, мы наблюдали эффективное взаимодействие Sis1 с амилоидными фибриллами Sup35NM без участия каких-либо кофакторов (Рис. 12, 14, Barbitoff *et al.*, 2020). Несовпадение наших результатов с литературными данными может быть вызвано двумя основными причинами: во-первых, в работе Krzewska, Melki, 2006 были использованы агрегаты полноразмерного белка Sup35, а не его фрагмента Sup35NM. В работе Nakagawa *et al.*, 2022 был использован именно Sup35NM, однако фибриллы типа Sc4 были получены при иных температурных условиях по сравнению с нашими экспериментами. В то же время, авторы не приводят данные о взаимодействии Sis1 с другим типом фибрилл Sup35NM, использованном в их исследовании — Sc37.

Взаимодействие Sis1 с агрегатами Sup35NM, схожее с наблюдаемым в наших экспериментах, было отмечено в работе лаборатории Линдквист (Shorter, Lindquist, 2008). В этом исследовании Sis1 демонстрировал способность взаимодействовать как с олиго-

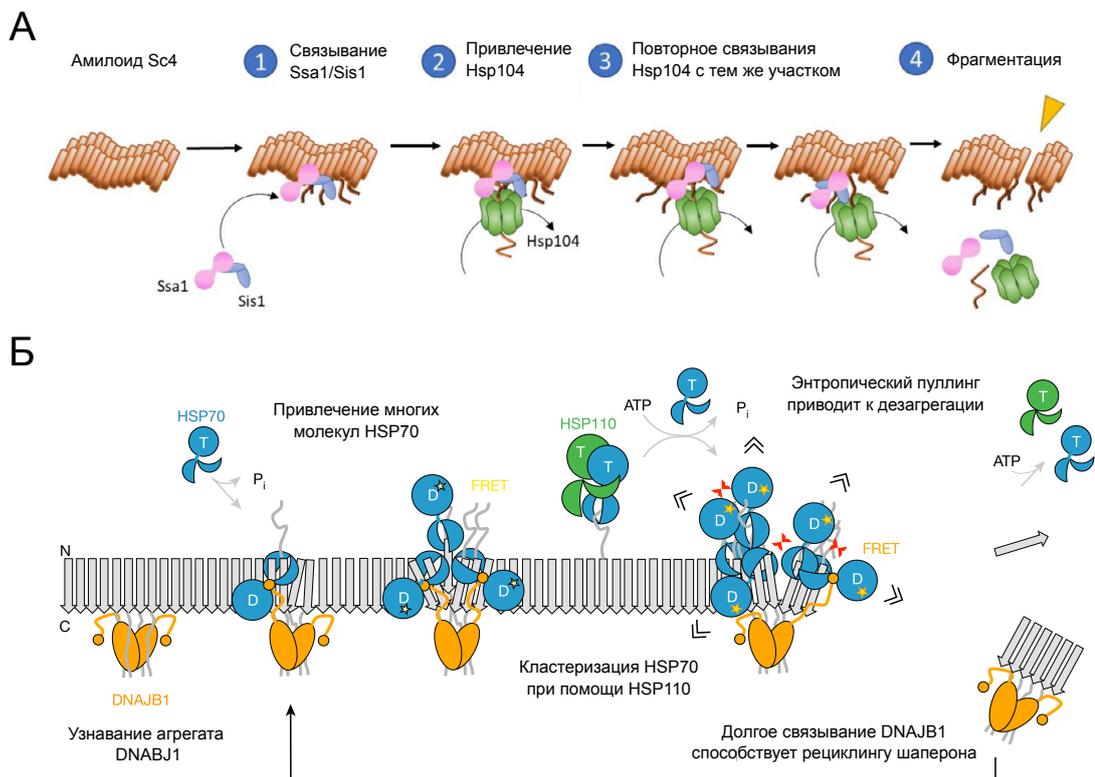


Рисунок 19. Модели дезагрегации амилоидных агрегатов. Показаны адаптированные схемы дезагрегации амилоидных фибрилл Sup35NM (Sc4) (Nakagawa *et al.*, 2022) (А) и α -синуклеина (Wentink *et al.*, 2020) (Б).

мерной, так и с фибриллярной формой Sup35NM. Первичность взаимодействия Hsp40 с агрегатом в нормальном цикле дезагрегации амилоида также показана для системы дезагрегации агрегатов α -синуклеина (Wentink *et al.*, 2020). В этом исследовании была предложена модель дезагрегации амилоидных фибрилл в клетках млекопитающих, опосредованной исключительно системой Hsp40/Hsp70 (Рис. 18Б). Согласно этой модели, ключевую роль в фрагментации фибриллы играет кластеризация молекул Hsp70 в одном участке амилоидной фибриллы. Сам процесс дезагрегации, по мнению авторов, обусловлен механизмом ”энтропического давления”(entropic pulling) — многочисленных разнонаправленных движений кластеризованных молекул Hsp70. Важную роль в образовании кластеров играет также и фактор обмена нуклеотидов, Hsp110. Помимо прочего, в данной модели предполагается, что длительное связывание Hsp40-DNAJB1 с фибриллой может способствовать рециклингу шаперонов.

Таким образом, совокупность результатов, полученных нами в наших экспериментах, а также описанных в научной литературе, свидетельствует о том, что дезагрегация амилоидов может идти несколькими альтернативными путями, а конкретная последовательность взаимодействий шаперонов с фибриллами может варьировать в зависимости от конформации белка в составе фибрилл. Несмотря на это, полученные нами результаты анализа влияния мутаций в прионном домене Sup35 на взаимодействие Sis1 с фибриллами (Рис. 14) свидетельствуют о том, что наблюдаемые различия могут быть связаны не столько с конформацией мономеров в составе фибриллы, сколько с условиями эксперимента и особенностями организации протофиламентов в составе агрегата.

4.3. Функциональное значение связывания Sis1 с агрегатами

Несмотря на вышеописанные особенности, мы наблюдали устойчивые и воспроизводимые различия в эффективности связывания Sis1 с фибриллами разных белков и в эффективности привлечения к ним Hsp70 (Рис. 12, 15, 16, Barbitoff *et al.*, 2020). Как уже было замечено ранее, мы не наблюдали четкой взаимосвязи между связыванием Hsp40 с фибриллами и эффективностью привлечения к ним Ssa1 (Рис. 20). Эти результаты могут говорить о том, что процесс фрагментации амилоидных фибрилл в

Hsp40	Прион/белок	Связывание с фибрилой	Изгнание $\uparrow HSP104$	Привлечение Ssa1	Поддержание приона
Sis1	[PS ⁺]/Sup35NM				
Sis1 Δ DD	[PS ⁺]/Sup35NM		**	*	**
Sis1	[RNQ ⁺]/Rnq1				
Sis1 Δ DD	[RNQ ⁺]/Rnq1				**

Рисунок 20. Дифференциальное взаимодействие Sis1 с прионами дрожжей и амилоидными фибриллами. Таблица обобщает влияние Sis1 и Sis1 Δ DD на поддержание прионов и их излечение сверхэкспрессией *HSP104*, а также показывает связывания Sis1 с амилоидными фибриллами (Рис. 12, Barbitoff *et al.*, 2020) и привлечение к ним Ssa1 (Рис. 15, 16). Зеленым цветом обозначены случаи, когда данный вариант Sis1 эффективно участвует в конкретном процессе или способствует ему. Желтым цветом отмечена недостаточная активность Sis1 в данном процессе. Оранжевым и красным цветом отмечены случаи, при которых Sis1 не способен участвовать в данном процессе. * - наблюдаемые эффекты характеризуются низкой степенью достоверности, ** - наблюдаемые эффекты имеют штамм-специфичный характер.

клетках дрожжей может начинаться как с первичного связывания Hsp40 с фибриллой, так и с совместного связывания с ней комплекса Hsp40/Hsp70. Заметим, что эффективность привлечения Ssa1 к фибриллам в наших экспериментах относительно точно соответствовала наблюдаемым эффектам на поддержание приона — делеция димеризационного домена Sis1 снижала эффективность рекрутирования Ssa1 (Рис. 15, 16), что согласуется с ослаблением фенотипа [*PSI*⁺] и некоторых вариантов [*PIN*⁺] (Stein, True, 2014). В то же время, наблюдаемые нами различия в эффективности связывания Sis1 с фибриллой хорошо соотносятся с возможностью изгнания соответствующего приона сверхэкспрессией *HSP104* (Рис. 20). Можно предложить два альтернативных объяснения этому феномену: во-первых, можно предположить, что стабильное взаимодействие Hsp40 с агрегатом способствует внутриклеточной сортировке комплекса Hsp40-фибрилла; во-вторых, высокоаффинное связывание Sis1 с фибриллой может модифицировать активность других компонентов шаперонной системы и изменять протекание цикла дезагрегации.

Вне зависимости от того, справедлива ли какая-либо из предложенных выше гипотез, полученные данные позволяют сформулировать модель того, как Hsp40 определяют протекание Hsp104-опосредованных процессов (Рис. 21, Barbitoff *et al.*, 2020; 2022). Исходя из полученных нами результатов (Рис. 12, 15) и литературных данных о роли Sis1 в поддержании прионов (Kryndushkin *et al.*, 2002; Kirkland *et al.*, 2011), мы предполагаем, что слабое связывание Sis1 с фибриллой (или связывание предсуществующего комплекса Sis1/Ssa1) приводит к правильной сборке комплекса Hsp70/Hsp104 и последующей фрагментации амилоидной фибриллы. Прочное же связывание Hsp40 с фибриллой способствует функционально отличному взаимодействию Hsp104 с фибриллой, опосредованному N-доменом Hsp104. Важно заметить, что согласно нашим данным (Рис. 17) такое взаимодействие, скорее всего, реализуется при помощи ряда дополнительных кофакторов и не может происходить исключительно за счет Sis1. Весьма вероятно, что таким кофактором может выступать и Hsp70 в случае его неоптимальной координации относительно фибриллы. Такое предположение могло бы объяснить как некоторые литературные данные (в частности, роль Ssa1 в альтернативном пути фрагментации амилоидов Sc37 (Nakagawa *et al.*, 2022)), так и полученные нами результаты анализа привлечения к фибриллам мутантного варианта Ssa1, Ssa1-21 (Рис. 16). До-

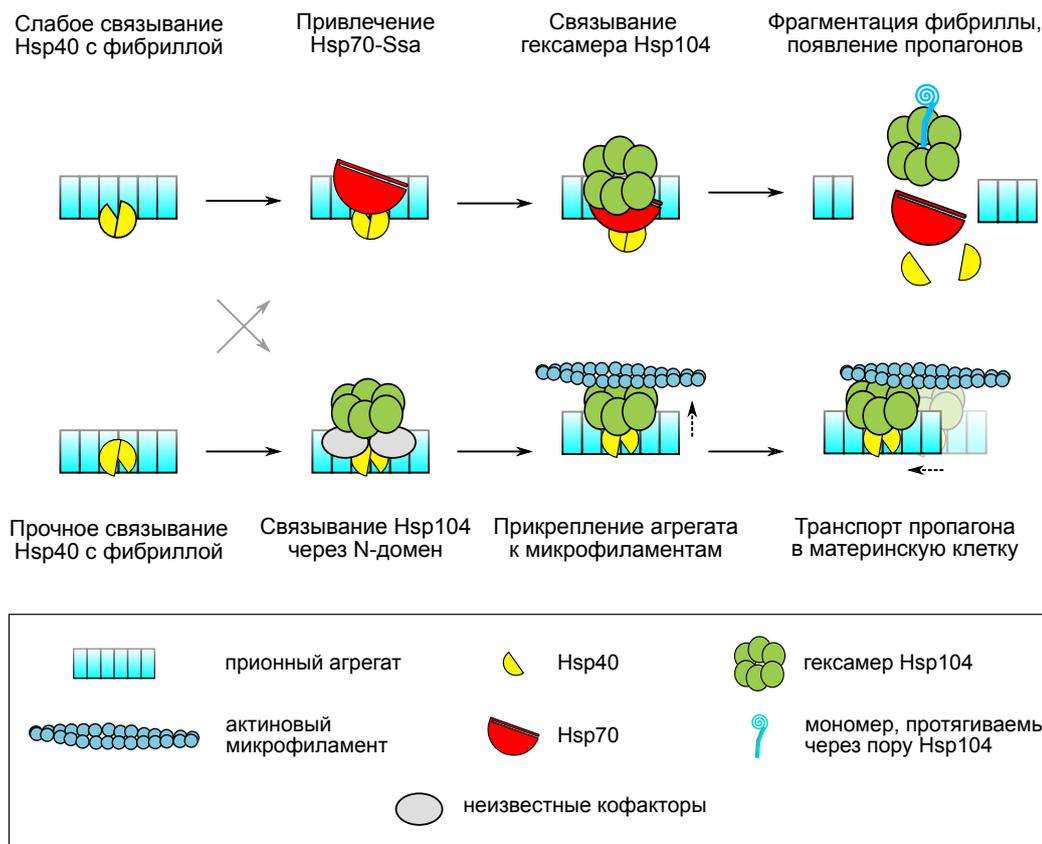


Рисунок 21. Уточненная модель дифференциального взаимодействия шаперонов с фибриллами. Пунктирные линии соответствуют движениям молекул и формированию комплексов. Серые стрелки соответствуют побочным процессам. Адаптировано из Barbitoff *et al.*, 2022.

полнительные свидетельства в пользу этой гипотезы были получены в недавней работе Жао с соавторами (Zhao *et al.*, 2023). Было показано, что взаимодействие Hsp70 с N-концевым доменом Hsp104 может играть роль в излечивании $[PSI^+]$ при сверхэкспрессии *HSP104*. Так, мутантный вариант Hsp104-3A, неспособный к взаимодействию с Hsp70, теряет способность излечивать $[PSI^+]$ при сверхпродукции. Более того, в данной работе продемонстрировано, что замена аллели *HSP104* дикого типа на мутантную (3A) аллель компенсирует антиприонные эффекты мутантного варианта *SSA1-21*. Эти данные согласуются с нашими результатами об отсутствии Hsp70-независимой роли Sis1 в связывании Hsp104 с агрегатами (Рис. 17). Ввиду того, что мы не наблюдаем четкой взаимосвязи между связыванием Hsp40 и привлечением Hsp70 к фибриллам (Рис.

15, 20) можно предположить, что сила связывания Hsp40 не предопределяет судьбу конкретного амилоидного агрегата, но способствует протеканию процесса по одному из путей.

Литературные данные свидетельствуют о том, что важную роль в Hsp104-опосредованном удержании прионных семян может играть актиновый цитоскелет. Делеции генов, кодирующих актин-связывающий белок Lsb2 и деацетилазу Sir2, заметно сказываются на дестабилизации [PSI^+] при тепловом шоке (Howie *et al.*, 2019). Известно также, что взаимодействие Hsp104 и актинового цитоскелета принимает активное участие в контроле асимметричной сегрегации белковых агрегатов (Tessarz *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010). Таким образом, процесс удержания прионных семян также может включать в себя присоединение агрегатов в комплексе с Hsp104 к актиновому цитоскелету и транспорт в материнскую клетку, опосредованный полярисомой.

Можно высказать целый ряд предположений, объясняющих необходимость наличия в клетке двух независимых процессов, опосредованных системой Hsp40/Hsp70/Hsp104. Такая система может использоваться клеткой для дифференциального распределения и сортировки патологических и функциональных белковых агрегатов. Например, удержание агрегатов в клетке в ходе ее деления может препятствовать распространению патологических белковых агрегатов, снижая их отрицательное влияние на популяцию клеток или организм. В последние годы у человека был обнаружен ряд белков, которые могут служить кандидатами на роль Hsp104-подобной дезагрегазы (например, Ruvb1/2 (Zaarur *et al.*, 2015) и Torsin A (Adam *et al.*, 2017)). Дальнейшие исследования в этой области позволят понять, распространяются ли модели Hsp104-опосредованного определения судьбы белкового агрегата на процессы, сопровождающие амилоидозы человека и млекопитающих.

Глава 5. Выводы

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Изменение внутриклеточной локализации Sis1 с цитоплазматической на внутриядерную разнонаправленно влияет на прионы дрожжей, усиливая проявление некоторых вариантов [*PSI*⁺] и стимулируя потерю [*URE3*].
2. Sis1 формирует комплексы с амилоидными фибриллами Sup35NM значительно эффективнее, чем с фибриллами Rnq1 в системе *in vitro*.
3. Делеция димеризационного домена Sis1 приводит к ослаблению его взаимодействия с амилоидными фибриллами в системе *in vitro*.
4. Сила связывания Hsp40 с амилоидными фибриллами не оказывает прямого влияния на эффективность привлечения Hsp70-Ssa1 к фибриллам.

Список литературы

1. Бондарев С. А. Влияние мутаций в прионизирующей домене белка Sup35 на свойства приона [*PSI*⁺] дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. СПбГУ, 2014. С. 119.
2. Adam I., Jossé L., Tuite M. F. Human TorsinA can function in the yeast cytosol as a molecular chaperone // *Biochemical Journal*. 2017. Vol. 474, no. 20. P. 3439–3454.
3. Agaphonov M., Alexandrov A. Self-excising integrative yeast plasmid vectors containing an intronated recombinase gene // *FEMS Yeast Research*. 2014. Vol. 14, no. 7. P. 1048–1054.
4. Alberti S., Halfmann R., King O., Kapila A., Lindquist S. A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins // *Cell*. 2009. Vol. 137. P. 146–158.
5. Allen K. D., Wegrzyn R. D., Chernova T. A., Müller S., Newnam G. P., Winslett P. A., Wittich K. B., Wilkinson K. D., Chernoff Y. O. Hsp70 chaperones as modulators of prion life cycle: Novel effects of Ssa and Ssb on the *Saccharomyces cerevisiae* prion [*PSI*⁺] // *Genetics*. 2005. Vol. 169, no. 3. P. 1227–1242.
6. Amor A. J., Castanzo D. T., Delany S. P., Selechnik D. M., Ooy A. van, Cameron D. M. The ribosome-associated complex antagonizes prion formation in yeast // *Prion*. 2015. Vol. 9, no. 2. P. 144–164.
7. Anfinsen C. B., Haber E., Sela M., White Jr F. H. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1961. Sept. Vol. 47, no. 9. P. 1309–1314.
8. Aron R., Higurashi T., Sahi C., Craig E. A. J-protein co-chaperone Sis1 required for generation of [*RNQ*⁺] seeds necessary for prion propagation // *EMBO Journal*. 2007. Vol. 26, no. 16. P. 3794–3803.
9. Astor M. T., Kamiya E., Sporn Z. A., Berger S. E., Hines J. K. Variant-specific and reciprocal Hsp40 functions in Hsp104-mediated prion elimination // *Molecular Microbiology*. 2018. Vol. 109. P. 41–62.

10. Balch W. E., Morimoto R. I., Dillin A., Kelly J. W. Adapting proteostasis for disease intervention // *Science*. 2008. Vol. 319, no. 5865. P. 916–919.
11. Barbitoff Y. A., Matveenکو A. G., Moskalenko S. E., Zemlyanko O. M., Newnam G. P., Patel A. X., Chernova T. A., Chernoff Y. O., Zhouravleva G. A. To CURE or not to CURE? Differential effects of the chaperone sorting factor Cur1 on yeast prions are mediated by the chaperone Sis1 // *Molecular Microbiology*. 2017. Vol. 105, no. 2. P. 242–257.
12. Barbitoff Y. A., Matveenکو A. G., Bondarev S. A., Maksutenko E. M., Kulikova A. V., Zhouravleva G. A. Quantitative assessment of chaperone binding to amyloid aggregates identifies specificity of Hsp40 interaction with yeast prion fibrils // *FEMS Yeast Research*. 2020. Vol. 20, no. 4. foaa025.
13. Barbitoff Y. A., Matveenکو A. G., Zhouravleva G. A. Differential interactions of molecular chaperones and yeast prions // *Journal of Fungi*. 2022. Vol. 8, no. 2. P. 1–18.
14. Bateman D. A., Wickner R. B. The $[PSI^+]$ Prion Exists as a Dynamic Cloud of Variants // *PLoS Genetics*. 2013. Vol. 9, no. 1. P. 1–13.
15. Berger S. E., Nolte A. M., Kamiya E., Hines J. K. Three J-proteins impact Hsp104-mediated variant-specific prion elimination: a new critical role for a low-complexity domain // *Current Genetics*. 2020. Feb. Vol. 66, no. 1. P. 51–58.
16. Bertelsen E. B., Zhou H., Lowry D. F., Flynn G. C., Dahlquist F. W. Topology and dynamics of the 10 kDa C-terminal domain of DnaK in solution // *Protein Science*. 2008. Dec. Vol. 8, no. 2. P. 343–354.
17. Bondarev S. A., Shchepachev V. V., Kajava A. V., Zhouravleva G. A. Effect of charged residues in the N-domain of Sup35 protein on prion $[PSI^+]$ stability and propagation // *Journal of Biological Chemistry*. 2013. Vol. 288, no. 40. P. 28503–28513.
18. Boorstein W. R., Ziegelhoffer T., Craig E. A. Molecular evolution of the *HSP70* multi-gene family. // *Journal of Molecular Evolution*. 1994. Vol. 38, no. 1. P. 1–17.
19. Brachmann A., Baxa U., Wickner R. B. Prion generation in vitro: amyloid of Ure2p is infectious. // *EMBO Journal*. 2005. Vol. 24, no. 17. P. 3082–3092.

20. Byrne K. P., Wolfe K. H. The Yeast Gene Order Browser: Combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species // *Genome Research*. 2005. Vol. 15. P. 1456–1461.
21. Chabelskaya S., Kiktev D., Inge-Vechtomov S., Philippe M., Zhouravleva G. Nonsense mutations in the essential gene *SUP35* of *Saccharomyces cerevisiae* are non-lethal. // *Molecular Genetics and Genomics*. 2004. Vol. 272, no. 3. P. 297–307.
22. Cheetham M. E., Caplan A. J. Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. // *Cell Stress & Chaperones*. 1998. Vol. 3, no. 1. P. 28–36.
23. Chernoff Y. O., Lindquist S. L., Ono B., Inge-Vechtomov S. G., Liebman S. W. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [*PSI*⁺]. // *Science*. 1995. Vol. 268, no. 5212. P. 880–884.
24. Chernoff Y. O., Newnam G. P., Kumar J., Allen K., Zink A. D. Evidence for a protein mutator in yeast: role of the Hsp70-related chaperone *ssb* in formation, stability, and toxicity of the [*PSI*] prion. // *Molecular and Cellular Biology*. 1999. Vol. 19, no. 12. P. 8103–12.
25. Chernoff Y. O., Kiktev D. A. Dual role of ribosome-associated chaperones in prion formation and propagation // *Current Genetics*. 2016. Vol. 62, no. 4. P. 677–685.
26. Chernova T. A., Wilkinson K. D., Chernoff Y. O. Physiological and environmental control of yeast prions. // *FEMS Microbiology reviews*. 2014. Vol. 38, no. 2. P. 326–44.
27. Christianson T. W., Sikorski R. S., Dante M., Shero J. H., Hieter P. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. // *Gene*. 1992. Vol. 110, no. 1. P. 119–122.
28. Clogg C. C., Petkova E., Haritou A. Statistical methods for comparing regression coefficients between models. // *American Journal of Sociology*. US, 1995. Vol. 100, no. 5. P. 1261–1293.
29. Cox B. S. Ψ , A cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast // *Heredity*. 1965. Vol. 20, no. 4. P. 505–521.
30. Cox B., Tuite M. The life of [*PSI*] // *Current Genetics*. 2018. Vol. 64, no. 1. P. 1–8.
31. Craig E. A., Marszalek J. How do J-proteins get Hsp70 to do so many different things? // *Trends in Biochemical Sciences*. 2017. Vol. 42, no. 5. P. 355–368.

32. Cranz-Mileva S., Imkamp F., Kolygo K., Maglica Ž., Kress W., Weber-Ban E. The Flexible Attachment of the N-Domains to the ClpA Ring Body Allows their Use On Demand // *Journal of Molecular Biology*. 2008. Vol. 378, no. 2. P. 412–424.
33. Crow E. T., Li L. Newly identified prions in budding yeast, and their possible functions // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2011. Vol. 22, no. 5. P. 452–459.
34. DePace A. H., Santoso A., Hillner P., Weissman J. S. A critical role for amino-terminal glutamine/asparagine repeats in the formation and propagation of a yeast prion // *Cell*. 1998. Vol. 93, no. 7. P. 1241–1252.
35. Derdowski A., Sindi S. S., Klaips C. L. A size threshold limits prion transmission and establishes phenotypic diversity // *Science*. 2010. Vol. 330, no. 6004. P. 680–683.
36. Derkatch I. L., Chernoff Y. O., Kushnirov V. V., Inge-Vechtomov S. G., Liebman S. W. Genesis and variability of [*PSI*] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genetics*. 1996. Dec. Vol. 144, no. 4. P. 1375–1386.
37. Derkatch I. L., Bradley M. E., Zhou P., Chernoff Y. O., Liebman S. W. Genetic and environmental factors affecting the de novo appearance of the [*PSI*⁺] prion in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genetics*. 1997. Vol. 147, no. 2. P. 507–519.
38. Derkatch I. L., Bradley M. E., Hong J. Y., Liebman S. W. Prions affect the appearance of other prions: the story of [*PIN*⁺] // *Cell*. 2001. Vol. 106. P. 171–182.
39. Deville C., Carroni M., Franke K. B., Topf M., Bukau B., Mogk A., Saibil H. R. Structural pathway of regulated substrate transfer and threading through an Hsp100 disaggregase // *Science Advances*. 2017. Vol. 3, no. 8. e1701726.
40. Dobson C. M. Protein folding and misfolding // *Nature*. 2003. Vol. 426, no. 6968. P. 884–890.
41. Douglas P. M., Treusch S., Ren H.-Y., Halfmann R., Duennwald M. L., Lindquist S., Cyr D. M. Chaperone-dependent amyloid assembly protects cells from prion toxicity. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. Vol. 105, no. 20. P. 7206–7211.
42. Drozdova P. B., Tarasov O. V., Matveenko A. G., Radchenko E. A., Sopova J. V., Polev D. E., Inge-Vechtomov S. G., Dobrynin P. V. Genome Sequencing and Comparative

- Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Strains of the Peterhof Genetic Collection. // PloS one. 2016. Vol. 11, no. 5. e0154722.
43. Drozdova P. B., Barbitoff Y. A., Belousov M. V., Skitchenko R. K., Rogoza T. M., Leclercq J. Y., Kajava A. V., Matveenko A. G., Zhouravleva G. A., Bondarev S. A. Estimation of amyloid aggregate sizes with semi-denaturing detergent agarose gel electrophoresis and its limitations // Prion. 2020. Vol. 14, no. 1. P. 118–128.
 44. Du Z., Park K.-w., Yu H., Fan Q., Li L. Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae* // Nature Genetics. 2008. Vol. 40, no. 4. P. 460–465.
 45. Du Z., Zhang Y., Li L. The yeast prion [*SWI*⁺] abolishes multicellular growth by triggering conformational changes of multiple regulators required for flocculin gene expression // Cell Reports. 2015. Vol. 13, no. 12. P. 2865–2878.
 46. Duran E. C., Weaver C. L., Lucius A. L. Comparative analysis of the structure and function of AAA+ motors ClpA, ClpB, and Hsp104: Common threads and disparate functions // Frontiers in Molecular Biosciences. 2017. Vol. 4. P. 54.
 47. Eaglestone S. S., Ruddock L. W., Cox B. S., Tuite M. F. 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. 2000. Vol. 97, no. 1. P. 240–244.
 48. Ellis J. Proteins as molecular chaperones // Nature. 1987. Vol. 328, no. 6129. P. 378–379.
 49. Escusa-Toret S., Vonk W. I., Frydman J. Spatial sequestration of misfolded proteins by a dynamic chaperone pathway enhances cellular fitness during stress // Nature Cell Biology. 2013. Vol. 15, no. 10. P. 1231–1243.
 50. Faust O., Abayev-Avraham M., Wentink A. S., Maurer M., Nillegoda N. B., London N., Bukau B., Rosenzweig R. HSP40 proteins use class-specific regulation to drive HSP70 functional diversity // Nature. 2020. Nov. Vol. 587, no. 7834. P. 489–494.
 51. Fohlman J., Eaker D., Karlsoon E., Thesleff S. Taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian snake taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*). Isolation, characterization, quaternary structure and pharmacological properties // European Journal of Biochemistry. England, 1976. Sept. Vol. 68, no. 2. P. 457–469.

52. Franzmann T. M., Jahnel M., Pozniakovsky A., Mahamid J., Holehouse A. S., Nüske E., Richter D., Baumeister W., Grill S. W., Pappu R. V., Hyman A. A., Alberti S. Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness // *Science*. 2018. Jan. Vol. 359, no. 6371. eaao5654.
53. Freeman B. C., Myers M. P., Schumacher R., Morimoto R. I. Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1 // *EMBO Journal*. 1995. Vol. 14, no. 10. P. 2281–2292.
54. Garcia D. M., Dietrich D., Clardy J., Jarosz D. F. A common bacterial metabolite elicits prion-based bypass of glucose repression. // *eLife*. 2016. Vol. 5. e17978.
55. Gates S. N., Yokom A. L., Lin J. B., Jackrel M. E., Rizo A. N., Kendsersky N. M., Buell C. E., Sweeny E. A., Mack K. L., Chuang E., Torrente M. P., Su M., Shorter J., Southworth D. R. Ratchet-like polypeptide translocation mechanism of the AAA+ disaggregase Hsp104 // *Science*. 2017. Vol. 357, no. 6348. P. 273–279.
56. Ghaemmaghami S. Biology and genetics of PrP prion strains // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2017. Vol. 7, no. 8. P. 1–13.
57. Gietz R. D., Sugino A. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. // *Gene*. 1988. Dec. Vol. 74, no. 2. P. 527–34.
58. Gietz D., St Jean A., Woods R. A., Schiestl R. H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. // *Nucleic Acids Research*. 1992. Vol. 20, no. 6. P. 1425.
59. Glover J. R., Lindquist S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins // *Cell*. 1998. Vol. 94, no. 1. P. 73–82.
60. Gokhale K. C., Newnam G. P., Sherman M. Y., Chernoff Y. O. Modulation of prion-dependent polyglutamine aggregation and toxicity by chaperone proteins in the yeast model. // *Journal of Biological Chemistry*. 2005. Vol. 280, no. 24. P. 22809–22818.
61. Goloubinoff P., Gatenby A. A., Lorimer G. H. GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli* // *Nature*. 1989. Jan. Vol. 337, no. 6202. P. 44–47.
62. Gorkovskiy A., Reidy M., Masison D. C., Wickner R. B. Hsp104 disaggregase at normal levels cures many [PSI⁺] prion variants in a process promoted by Sti1p, Hsp90,

- and Sis1p // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2017. In press.
63. Greene M. K., Maskos K., Landry S. J. Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998. Vol. 95, no. 11. P. 6108–6113.
 64. Halfmann R., Lindquist S. Screening for amyloid aggregation by Semi-Denaturing Detergent-Agarose Gel Electrophoresis. // Journal of Visualized Experiments: JoVE. 2008. No. 17.
 65. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids // Journal of Molecular Biology. 1983. Vol. 166, no. 4. P. 557–580.
 66. Harris J. M., Nguyen P. P., Patel M. J., Sporn Z. a., Hines J. K. Functional diversification of Hsp40: distinct J-protein functional requirements for two prions allow for chaperone-dependent prion selection // PLoS Genetics. 2014. Vol. 10, no. 7. e1004510.
 67. Hartl F. U. Unfolding the chaperone story // Molecular Biology of the Cell. 2017. Nov. Vol. 28, no. 22. P. 2919–2923.
 68. Helsen C. W., Glover J. R. Insight into molecular basis of curing of [PSI +] prion by overexpression of 104-kDa heat shock protein (Hsp104) // Journal of Biological Chemistry. 2012. Vol. 287, no. 1. P. 542–556.
 69. Hemmingsen S. M., Woolford C., Vies S. M. van der, Tilly K., Dennis D. T., Georgopoulos C. P., Hendrix R. W., Ellis R. J. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly // Nature. 1988. May. Vol. 333, no. 6171. P. 330–334.
 70. Higurashi T., Hines J. K., Sahi C., Aron R., Craig E. A. Specificity of the J-protein Sis1 in the propagation of 3 yeast prions. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008. Vol. 105, no. 43. P. 16596–16601.
 71. Hines J. K., Li X., Du Z., Higurashi T., Li L., Craig E. A. [SWI⁺], the prion formed by the chromatin remodeling factor Swi1, is highly sensitive to alterations in Hsp70 chaperone system activity // PLoS Genetics. 2011. Vol. 7, no. 2. P. 27–29.
 72. Ho C. T., Grousl T., Shatz O., Jawed A., Ruger-Herreros C., Semmelink M., Zahn R., Richter K., Bukau B., Mogk A. Cellular sequestrases maintain basal Hsp70 capacity

- ensuring balanced proteostasis // *Nature Communications*. 2019. Vol. 10, no. 1. P. 1–15.
73. Howie R. L., Jay-Garcia L. M., Kiktev D. A., Faber Q. L., Murphy M., Rees K. A., Sachwani N., Chernoff Y. O. Role of the cell asymmetry apparatus and ribosome-associated chaperones in the destabilization of a *Saccharomyces cerevisiae* prion by heat shock // *Genetics*. 2019. Vol. 212, no. 3. P. 757–771.
 74. Huang Y. W., King C.-Y. A complete catalog of wild-type Sup35 prion variants and their protein-only propagation // *Current Genetics*. 2020. Feb. Vol. 66, no. 1. P. 97–122.
 75. Huang Y. W., Kushnirov V. V., King C. Y. Mutable yeast prion variants are stabilized by a defective Hsp104 chaperone // *Molecular Microbiology*. 2021. Vol. 115, no. 4. P. 774–788.
 76. Hung G.-C., Masison D. C. N-Terminal Domain of Yeast Hsp104 Chaperone Is Dispensable for Thermotolerance and Prion Propagation but Necessary for Curing Prions by Hsp104 Overexpression // *Genetics*. 2006. Vol. 173, June. P. 611–620.
 77. Iadanza M. G., Jackson M. P., Hewitt E. W., Ranson N. A., Radford S. E. A new era for understanding amyloid structures and disease // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018. Vol. 19, no. 12. P. 755–773.
 78. Inoue Y. Life cycle of yeast prions: propagation mediated by amyloid fibrils // *Protein & Peptide Letters*. 2009. Mar. Vol. 16, no. 3. P. 271–276.
 79. James P., Pfund C., Craig E. a. Functional specificity among Hsp70 molecular chaperones. // *Science*. 1997. Vol. 275, no. 5298. P. 387–389.
 80. Jones G. W., Masison D. C. *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 mutations affect $[PSI^+]$ prion propagation and cell growth differently and implicate Hsp40 and tetratricopeptide repeat cochaperones in impairment of $[PSI^+]$ // *Genetics*. 2003. Vol. 163, no. 2. P. 495–506.
 81. Jung G., Jones G., Wegrzyn R. D., Masison D. C. A role for cytosolic hsp70 in yeast $[PSI^+]$ prion propagation and $[PSI^+]$ as a cellular stress. // *Genetics*. 2000. Oct. Vol. 156, no. 2. P. 559–70.

82. Kadnar M. L., Articov G., Derkatch I. L. Distinct type of transmission barrier revealed by study of multiple prion determinants of Rnq1 // *PLoS Genetics*. 2010. Vol. 6, no. 1. P. 31–34.
83. Kaganovich D., Kopito R., Frydman J. Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. // *Nature*. 2008. Vol. 454, no. 7208. P. 1088–1095.
84. Kaiser C., Michaelis S., Mitchell A. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. P. 234.
85. Kampinga H. H., Craig E. A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010. Vol. 11, no. 8. P. 579–592.
86. Kiktev D., Inge-Vechtomov S., Zhouravleva G. Prion-dependent lethality of *sup45* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Prion*. 2007. Vol. 1, no. 2. P. 136–143.
87. Kiktev D. A., Chernoff Y. O., Archipenko A. V., Zhouravleva G. A. Identification of genes influencing synthetic lethality of genetic and epigenetic alterations in translation termination factors in yeast // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2011. Vol. 438, no. 3. P. 117–119.
88. Kiktev D. A., Melomed M. M., Lu C. D., Newnam G. P., Chernoff Y. O. Feedback control of prion formation and propagation by the ribosome-associated chaperone complex // *Molecular Microbiology*. 2015. Vol. 96, no. 3. P. 621–632.
89. Kirkland P. A., Reidy M., Masison D. C. Functions of yeast Hsp40 chaperone Sis1p dispensable for prion propagation but important for prion curing and protection from prion toxicity // *Genetics*. 2011. Vol. 188, no. 3. P. 565–577.
90. Kityk R., Kopp J., Mayer M. P. Molecular Mechanism of J-Domain-Triggered ATP Hydrolysis by Hsp70 Chaperones // *Molecular Cell*. 2018. Vol. 69, no. 2. 227–237.e4.
91. Klaips C. L., Gropp M. H. M., Hipp M. S., Hartl F. U. Sis1 potentiates the stress response to protein aggregation and elevated temperature // *Nature Communications*. 2020. Dec. Vol. 11, no. 1. P. 6271.
92. Kominek J., Marszalek J., Neuvéglise C., Craig E. A., Williams B. L. The complex evolutionary dynamics of Hsp70s: A genomic and functional perspective // *Genome Biology and Evolution*. 2013. Vol. 5, no. 12. P. 2460–2477.

93. Krantz K. C., Puchalla J., Thapa R., Kobayashi C., Bisher M., Viehweg J., Carr C. M., Rye H. S. Clathrin coat disassembly by the yeast hsc70/Ssa1p and auxilin/Swa2p proteins observed by single-particle burst analysis spectroscopy // *Journal of Biological Chemistry*. 2013. Vol. 288, no. 37. P. 26721–26730.
94. Kroschwald S., Maharana S., Mateju D., Malinowska L., Elisabeth N., Poser I., Richter D., Alberti S. Promiscuous interactions and protein disaggregases determine the material state of stress-inducible RNP granules // *eLife*. 2015. Vol. 4. e06807.
95. Kryndushkin D. S., Smirnov V. N., Ter-Avanesyan M. D., Kushnirov V. V. Increased expression of Hsp40 chaperones, transcriptional factors, and ribosomal protein Rpp0 can cure yeast prions // *Journal of Biological Chemistry*. 2002. Vol. 277, no. 26. P. 23702–23708.
96. Kryndushkin D. S., Alexandrov I. M., Ter-Avanesyan M. D., Kushnirov V. V. Yeast $[PSI^+]$ Prion Aggregates Are Formed by Small Sup35 Polymers Fragmented by Hsp104 // *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Dec. Vol. 278, no. 49. P. 49636–49643.
97. Kryndushkin D. S., Shewmaker F., Wickner R. B. Curing of the $[URE3]$ prion by Btn2p, a Batten disease-related protein. // *EMBO Journal*. 2008. Vol. 27, no. 20. P. 2725–2735.
98. Kryndushkin D. S., Engel A., Edskes H., Wickner R. B. Molecular chaperone Hsp104 can promote yeast prion generation // *Genetics*. 2011. Vol. 188, no. 2. P. 339–348.
99. Krzewska J., Melki R. Molecular chaperones and the assembly of the prion Sup35p, an in vitro study // *EMBO Journal*. 2006. Vol. 25, no. 4. P. 822–833.
100. Kumar S., Dine E. A., Paddock E., Steinberg D. N., Greene L. E., Masison D. C. Mutations outside the Ure2 amyloid-forming region disrupt $[URE3]$ prion propagation and alter interactions with protein quality control factors // *Molecular and Cellular Biology*. 2020. Oct. Vol. 40, no. 21. e00294–20.
101. Kumar J., Reidy M., Masison D. C. Yeast J-protein Sis1 prevents prion toxicity by moderating depletion of prion protein // *Genetics*. 2021. Oct. Vol. 219, no. 2. iyab129.
102. Kushnirov V. V., Ter-Avanesyan M. D. Structure and replication of yeast prions // *Cell*. 1998. Vol. 94, no. 1. P. 13–16.

103. Kushnirov V. V., Kryndushkin D. S., Boguta M., Smirnov V. N., Ter-Avanesyan M. D. Chaperones that cure yeast artificial [*PSI*⁺] and their prion-specific effects // *Current Biology*. 2000. Vol. 10, no. 22. P. 1443–1446.
104. Kushnirov V. V. Rapid and reliable protein extraction from yeast // *Yeast*. 2000. Vol. 16. P. 857–860.
105. Kushnirov V. V., Alexandrov I. M., Mitkevich O. V., Shkundina I. S., Ter-Avanesyan M. D. Purification and analysis of prion and amyloid aggregates. // *Methods* (San Diego, Calif.) 2006. May. Vol. 39, no. 1. P. 50–55.
106. Kushnirov V. V., Dergalev A. A., Alexandrov A. I. Proteinase K resistant cores of prions and amyloids // *Prion*. 2020. Vol. 14, no. 1. P. 11–19.
107. Kushnirov V. V., Dergalev A. A., Alexandrov A. I. Amyloid fragmentation and disaggregation in yeast and animals // *Biomolecules*. 2021. Dec. Vol. 11, no. 12. P. 1884.
108. Kushnirov V. V., Dergalev A. A., Alieva M. K., Alexandrov A. I. Structural bases of prion variation in yeast // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23, no. 10. P. 5738.
109. Lacroute F. Non-Mendelian mutation allowing ureidosuccinic acid uptake in yeast. // *Journal of bacteriology*. 1971. Vol. 106, no. 2. P. 519–522.
110. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227, no. 5259. P. 680–685.
111. Laskey R. A., Honda B. M., Mills A. D., Finch J. T. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA // *Nature*. 1978. Vol. 275, October. P. 416–420.
112. Lee S., Fan C. Y., Michael Younger J., Ren H. Identification of essential residues in the type II Hsp40 Sis1 that function in polypeptide binding // *Journal of Biological Chemistry*. 2002. Vol. 277, no. 24. P. 21675–21682.
113. Lee J., Sung N., Mercado J. M., Hryc C. F., Chang C., Lee S., Tsai F. T. Overlapping and specific functions of the Hsp104 N-domain define its role in protein disaggregation // *Scientific Reports*. 2017. Dec. Vol. 7, no. 1. P. 11184.
114. Levinthal, Cyrus. Are there pathways for protein folding? // *J. Chim. Phys.* 1968. Vol. 65. P. 44–45.

115. Li J., Wu Y., Qian X., Sha B. Crystal structure of yeast Sis1 peptide-binding fragment and Hsp70 Ssa1 C-terminal complex. // *The Biochemical journal*. 2006. Vol. 398, no. 3. P. 353–360.
116. Liebman S. W., Chernoff Y. O. Prions in yeast // *Genetics*. 2012. Vol. 191, no. 4. P. 1041–1072.
117. Liu Q., Hendrickson W. A. Insights into Hsp70 Chaperone Activity from a Crystal Structure of the Yeast Hsp110 Sse1 // *Cell*. 2007. Vol. 131, no. 1. P. 106–120.
118. Liu B., Larsson L., Caballero A., Hao X., Öling D., Grantham J., Nyström T. The polarisome is required for segregation and retrograde transport of protein aggregates // *Cell*. 2010. Vol. 140, no. 2. P. 257–267.
119. Lotz S. K., Knighton L. E., Nitika, Jones G. W., Truman A. W. Not quite the SSAME: unique roles for the yeast cytosolic Hsp70s // *Current Genetics*. 2019. Vol. 65, no. 5. P. 1127–1134.
120. Malinowska L., Kroschwald S., Munder M. C., Richter D., Alberti S. Molecular chaperones and stress-inducible protein-sorting factors coordinate the spatiotemporal distribution of protein aggregates // *Molecular Biology of the Cell*. 2012. Vol. 23, no. 16. P. 3041–3056.
121. Malovichko Y. V., Antonets K. S., Maslova A. R., Andreeva E. A., Inge-Vechtomov S. G., Nizhnikov A. A. RNA Sequencing Reveals Specific Transcriptomic Signatures Distinguishing Effects of the [*SWI*⁺] Prion and *SWI1* Deletion in Yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes*. 2019. Mar. Vol. 10, no. 3. P. 212.
122. Martin J., Mayhew M., Langer T., Hartl F. U. The reaction cycle of GroEL and GroES in chaperonin-assisted protein folding // *Nature*. 1993. Vol. 366, no. 6452. P. 228–233.
123. Masison D. C., Wickner R. B. Prion-Inducing Domain of Yeast Ure2p and Protease Resistance of Ure2p in Prion-Containing Cells // *Science*. 1995. Oct. Vol. 270, no. 5233. P. 93–95.
124. Matiiv A. B., Trubitsina N. P., Matveenko A. G., Barbitoff Y. A., Zhouravleva G. A., Bondarev S. A. Amyloid and Amyloid-Like Aggregates: Diversity and the Term Crisis // *Biochemistry (Moscow)*. 2020. Sept. Vol. 85, no. 9. P. 1011–1034.

125. Matiiv A. B., Trubitsina N. P., Matveenکو A. G., Barbitoff Y. A., Zhouravleva G. A., Bondarev S. A. Structure and Polymorphism of Amyloid and Amyloid-Like Aggregates // *Biochemistry (Moscow)*. 2022. Vol. 87, no. 5. P. 450–463.
126. Matveenکو A. G., Drozdova P. B., Belousov M. V., Moskalenko S. E., Bondarev S. A., Barbitoff Y. A., Nizhnikov A. A., Zhouravleva G. A. *SFPI*-mediated prion-dependent lethality is caused by increased Sup35 aggregation and alleviated by Sis1 // *Genes to Cells*. 2016. Vol. 21, no. 12. P. 1290–1308.
127. Matveenکو A. G., Barbitoff Y. A., Jay-Garcia L. M., Chernoff Y. O., Zhouravleva G. A. Differential effects of chaperones on yeast prions: CURrent view // *Current Genetics*. 2018. Vol. 64, no. 2. P. 317–325.
128. Mayer M. P., Gierasch L. M. Recent advances in the structural and mechanistic aspects of Hsp70 molecular chaperones // *Journal of Biological Chemistry*. 2019. Vol. 294, no. 6. P. 2085–2097.
129. Merz P. A., Rohwer R. G., Kasczak R., Wisniewski H. M., Somerville R. A., Gibbs C. J. J., Gajdusek D. C. Infection-specific particle from the unconventional slow virus diseases. // *Science*. 1984. Vol. 225, no. 4660. P. 437–440.
130. Miller S. B., Ho C.-T., Winkler J., Khokhrina M., Neuner A., Mohamed M. Y. H., Guilbride D. L., Richter K., Lisby M., Schiebel E., Mogk A., Bukau B. Compartment-specific aggregates direct distinct nuclear and cytoplasmic aggregate deposition. // *EMBO Journal*. 2015a. Vol. 34, no. 6. P. 778–797.
131. Miller S. B., Mogk A., Bukau B. Spatially organized aggregation of misfolded proteins as cellular stress defense strategy // *Journal of Molecular Biology*. 2015b. Vol. 427, no. 7. P. 1564–1574.
132. Moehle C. M., Aynardi M. W., Kolodny M. R., Park F. J., Jones E. W. Protease B of *Saccharomyces cerevisiae*: Isolation and Regulation of the *PRB1* Structural Gene // *Genetics*. 1987. Feb. Vol. 115, no. 2. P. 255–263.
133. Morange M. What history tells us. II. The discovery of chaperone function // *Journal of Biosciences*. 2005. Vol. 30, no. 4. P. 461–464.
134. Moriyama H., Edskes H. K., Wickner R. B. [*URE3*] prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for chaperone Hsp104 and curing by overexpressed

- chaperone Ydj1p // *Molecular and cellular biology*. 2000. Vol. 20, no. 23. P. 8916–8922.
135. Motulsky H. J., Neubig R. R. Analyzing Binding Data // *Current Protocols in Neuroscience*. 2010. Vol. 7. P. 7.51–65.
136. Nakagawa Y., Shen H. C., Komi Y., Sugiyama S., Kurinomaru T., Tomabechi Y., Krayukhina E., Okamoto K., Yokoyama T., Shirouzu M., Uchiyama S., Inaba M., Niwa T., Sako Y., Taguchi H., Tanaka M. Amyloid conformation-dependent disaggregation in a reconstituted yeast prion system // *Nature Chemical Biology*. 2022. Vol. 18, no. 3. P. 321–331.
137. Needham P. G., Masison D. C. Prion-impairing mutations in Hsp70 chaperone Ssa1: Effects on ATPase and chaperone activities // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008. Vol. 478, no. 2. P. 167–174.
138. Ness F., Cox B. S., Wongwigkarn J., Naeimi W. R., Tuite M. F. Over-expression of the molecular chaperone Hsp104 in *Saccharomyces cerevisiae* results in the malpartitioning of $[PSI^+]$ propagons // *Molecular Microbiology*. 2017. Vol. 104, no. 1. P. 125–143.
139. Newnam G. P., Wegrzyn R. D., Lindquist S. L., Chernoff Y. O. Antagonistic interactions between yeast chaperones Hsp104 and Hsp70 in prion curing. // *Molecular and cellular biology*. 1999. Vol. 19, no. 2. P. 1325–1333.
140. Newnam G. P., Birchmore J. L., Chernoff Y. O. Destabilization and recovery of a yeast prion after mild heat shock // *Journal of Molecular Biology*. 2011. Vol. 408, no. 3. P. 432–448.
141. Nizhnikov A. A., Alexandrov A. I., Ryzhova T. A., Mitkevich O. V., Dergalev A. A., Ter-Avanesyan M. D., Galkin A. P. Proteomic Screening for Amyloid Proteins // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, no. 12. e116003.
142. Nizhnikov A. A., Ryzhova T. A., Volkov K. V., Zadorsky S. P., Sopova J. V., Inge-Vechtomov S. G., Galkin A. P. Interaction of Prions Causes Heritable Traits in *Saccharomyces cerevisiae*. // *PLoS Genetics*. 2016. Vol. 12, no. 12. e1006504.
143. Park S.-H., Kukushkin Y., Gupta R., Chen T., Konagai A., Hipp M. S., Hayer-Hartl M., Hartl F. U. PolyQ proteins interfere with nuclear degradation of cytosolic proteins by sequestering the Sis1p chaperone // *Cell*. 2013. Vol. 154, no. 1. P. 134–145.

144. Park Y.-N., Zhao X., Yim Y.-I., Todor H., Ellerbrock R., Reidy M., Eisenberg E., Masison D. C., Greene L. E. Hsp104 Overexpression Cures *Saccharomyces cerevisiae* [*PSI*⁺] by Causing Dissolution of the Prion Seeds // *Eukaryotic Cell*. 2014. May. Vol. 13, no. 5. P. 635–647.
145. Patino M. M., Liu J.-j., Glover J. R., Lindquist S. Support for the Prion Hypothesis for Inheritance of a Phenotypic Trait in Yeast // *Science*. 1996. Aug. Vol. 273, no. 5275. P. 622–626.
146. Paushkin S. V., Kushnirov V. V., Smirnov V. N., Ter-Avanesyan M. D. Propagation of the yeast prion-like [*PSI*⁺] determinant is mediated by oligomerization of the *SUP35*-encoded polypeptide chain release factor. // *EMBO Journal*. 1996. June. Vol. 15, no. 12. P. 3127–3134.
147. Pelham H. R. B. Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock // *EMBO Journal*. 1984. Vol. 3, no. 13. P. 3095–3100.
148. Powers E. T., Balch W. E. Diversity in the origins of proteostasis networks—a driver for protein function in evolution // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013. Vol. 14, no. 4. P. 237–248.
149. Prusiner S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. // *Science*. 1982. Vol. 216, no. 4542. P. 136–144.
150. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing / R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2014.
151. Reidy M., Miot M., Masison D. C. Prokaryotic chaperones support yeast prions and thermotolerance and define disaggregation machinery interactions // *Genetics*. 2012. Vol. 192, no. 1. P. 185–193.
152. Reidy M., Sharma R., Shastry S., Roberts B.-L., Albino-Flores I., Wickner S., Masison D. C. Hsp40s specify functions of Hsp104 and Hsp90 protein chaperone machines // *PLoS Genetics*. 2014. Vol. 10, no. 10. e1004720.
153. Rohner N., Jarosz D. F., Kowalko J. E., Yoshizawa M., Jeffery W. R., Borowsky R. L., Lindquist S., Tabin C. J. Cryptic Variation in Morphological Evolution: HSP90 as a Capacitor for Loss of Eyes in Cavefish // *Science*. 2013. Dec. Vol. 342, no. 6164. P. 1372–1375.

154. Rosenzweig R., Nillegoda N. B., Mayer M. P., Bukau B. The Hsp70 chaperone network // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019. Vol. 20, no. 11. P. 665–680.
155. Ross E. D., Minton A., Wickner R. B. Prion domains: sequences, structures and interactions. // *Nature Cell Biology*. 2005. Vol. 7, no. 11. P. 1039–1044.
156. Ryzhova T. A., Sopova J. V., Zadorsky S. P., Siniukova V. A., Sergeeva A. V., Galkina S. A., Nizhnikov A. A., Shenfeld A. A., Volkov K. V., Galkin A. P. Screening for amyloid proteins in the yeast proteome // *Current Genetics*. 2018. Apr. Vol. 64, no. 2. P. 469–478.
157. Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013. Vol. 14, no. 10. P. 630–642.
158. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Elsevier, 04/1989. P. 1626.
159. Sambrook J., Russell D. W. Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride // *Cold Spring Harbor Protocols*. 2006. Vol. 2006, no. 1. pdb.prot3932.
160. Savistchenko J., Krzewska J., Fay N., Melki R. Molecular chaperones and the assembly of the prion Ure2p in vitro // *Journal of Biological Chemistry*. 2008. Vol. 283, no. 23. P. 15732–15739.
161. Schuermann J. P., Jiang J., Cuellar J., Llorca O., Wang L., Gimenez L. E., Jin S., Taylor A. B., Demeler B., Morano K. A., Hart P. J., Valpuesta J. M., Lafer E. M., Sousa R. Structure of the Hsp110:Hsc70 Nucleotide Exchange Machine // *Molecular Cell*. 2008. Vol. 31, no. 2. P. 232–243.
162. Schumacher R. J., Hansen W. J., Freeman B. C., Alnemri E., Litwack G., Toft D. O. Cooperative action of Hsp70, Hsp90, and DnaJ proteins in protein renaturation // *Biochemistry*. 1996. Vol. 35, no. 47. P. 14889–14898.
163. Schwimmer C., Masison D. C. 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*. 2002. Vol. 22, no. 11. P. 3590–3598.
164. Scior A., Buntru A., Arnsburg K., Ast A., Iburg M., Juenemann K., Pigazzini M. L., Mlody B., Puchkov D., Priller J., Wanker E. E., Prigione A., Kirstein J. Complete

- suppression of Htt fibrilization and disaggregation of Htt fibrils by a trimeric chaperone complex // *EMBO Journal*. 2018. Vol. 37, no. 2. P. 282–299.
165. Sergeeva A. V., Galkin A. P. Functional amyloids of eukaryotes: criteria, classification, and biological significance // *Current Genetics*. 2020. Vol. 66, no. 5. P. 849–866.
166. Sharma D., Masison D. C. Functionally redundant isoforms of a yeast Hsp70 chaperone subfamily have different antiprion effects // *Genetics*. 2008a. Vol. 179, no. 3. P. 1301–1311.
167. Sharma D., Masison D. C. Functionally redundant isoforms of a yeast Hsp70 chaperone subfamily have different antiprion effects // *Genetics*. 2008b. Vol. 179, no. 3. P. 1301–1311.
168. Sharma D., Martineau C. N., Le Dall M. T., Reidy M., Masison D. C., Kabani M. Function of SSA subfamily of Hsp70 within and across species varies widely in complementing *Saccharomyces cerevisiae* cell growth and prion propagation // *PLoS ONE*. 2009. Vol. 4, no. 8.
169. Shorter J., Lindquist S. Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers. // *Science (New York, N.Y.)* 2004. June. Vol. 304, no. 5678. P. 1793–1797.
170. Shorter J., Lindquist S. Destruction or potentiation of different prions catalyzed by similar Hsp104 remodeling activities // *Molecular Cell*. 2006. Vol. 23, no. 3. P. 425–438.
171. Shorter J., Lindquist S. Hsp104, Hsp70 and Hsp40 interplay regulates formation, growth and elimination of Sup35 prions // *EMBO Journal*. 2008. Vol. 27, no. 20. P. 2712–2724.
172. Shorter J., Southworth D. R. Spiraling in control: structures and mechanisms of the Hsp104 disaggregase // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2019. Aug. Vol. 11, no. 8. a034033.
173. Sikorski R. S., Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genetics*. 1989. Vol. 122, no. 1. P. 19–27.
174. Snider J., Thibault G., Houry W. A. The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins // *Genome Biology*. 2008. Vol. 9, no. 4. P. 1–8.

175. Son M., Wickner R. B. Antiprion systems in yeast cooperate to cure or prevent the generation of nearly all [*PSI*⁺] and [*URE3*] prions // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2022. July. Vol. 119, no. 28. P. 1–9.
176. Sondheimer N., Lindquist S. Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. // *Molecular cell*. 2000. Vol. 5, no. 1. P. 163–172.
177. Sondheimer N., Lopez N., Craig E. a., Lindquist S. The role of Sis1 in the maintenance of the [RNQ⁺] prion // *EMBO Journal*. 2001. Vol. 20, no. 10. P. 2435–2442.
178. Sopova J. V., Koshel E. I., Belashova T. A., Zadorsky S. P., Sergeeva A. V., Siniukova V. A., Shenfeld A. A., Velizhanina M. E., Volkov K. V., Nizhnikov A. A., Kachkin D. V., Gaginskaya E. R., Galkin A. P. RNA-binding protein FXR1 is presented in rat brain in amyloid form // *Scientific Reports*. 2019. Dec. Vol. 9, no. 1. P. 18983.
179. Specht S., Miller S. B. M., Mogk A., Bukau B. Hsp42 is required for sequestration of protein aggregates into deposition sites in *Saccharomyces cerevisiae* // *Journal of Cell Biology*. 2011. Vol. 195, no. 4. P. 617–629.
180. Stansfield I., Jones K. M., Kushnirov V. V., Dagkesamanskaya A. R., Poznyakovski A. I., Paushkin S. V., Nierras C. R., Cox B. S., Ter-Avanesyan M. D., Tuite M. F. The products of the *SUP45* (eRF1) and *SUP35* genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. // *EMBO Journal*. 1995. Sept. Vol. 14, no. 17. P. 4365–73.
181. Stein K. C., True H. L. Structural variants of yeast prions show conformer-specific requirements for chaperone activity // *Molecular Microbiology*. 2014. Vol. 93, no. 6. P. 1156–1171.
182. Studier F. W., Moffatt B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes // *Journal of Molecular Biology*. 1986. Vol. 189, no. 1. P. 113–130.
183. Sweeny E. A., Shorter J. Mechanistic and Structural Insights into the Prion-Disaggregase Activity of Hsp104 // *Journal of Molecular Biology*. 2016. Vol. 428, no. 9. P. 1870–1885.
184. Taipale M., Jarosz D. F., Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: Emerging mechanistic insights // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010. Vol. 11, no. 7. P. 515–528.

185. Tanaka M., Chien P., Naber N., Cooke R., Weissman J. S. Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences // *Nature*. 2004. Vol. 428, no. 6980. P. 323–328.
186. Ter-Avanesyan M. D., Kushnirov V. V., Dagkesamanskaya A. R., Didichenko S. A., Chernoff Y. O., Inge-Vechtomov S. G., Smirnov V. N. Deletion analysis of the SUP35 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two non-overlapping functional regions in the encoded protein // *Molecular Microbiology*. 1993. Mar. Vol. 7, no. 5. P. 683–692.
187. Ter-Avanesyan M. D., Dagkesamanskaya A. R., Kushnirov V. V., Smirnov V. N. The SUP35 omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [*psi*⁺] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genetics*. 1994. July. Vol. 137, no. 3. P. 671–676.
188. Tessarz P., Schwarz M., Mogk A., Bukau B. The yeast AAA+ chaperone Hsp104 is part of a network that links the actin cytoskeleton with the inheritance of damaged proteins // *Molecular and Cellular Biology*. 2009. July. Vol. 29, no. 13. P. 3738–3745.
189. Tipton K. a., Verges K. J., Weissman J. S. In Vivo Monitoring of the Prion Replication Cycle Reveals a Critical Role for Sis1 in Delivering Substrates to Hsp104 // *Molecular Cell*. 2008. Vol. 32, no. 4. P. 584–591.
190. Troisi E. M., Rockman M. E., Nguyen P. P., Oliver E. E., Hines J. K. Swa2, the yeast homolog of mammalian auxilin, is specifically required for the propagation of the prion variant [*URE3-1*] // *Molecular Microbiology*. 2015. Vol. 97, no. 5. P. 926–941.
191. Tsai J., Douglas M. G. A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding // *Journal of Biological Chemistry*. 1996. Vol. 271, no. 16. P. 9347–9354.
192. Uversky V. N. Mysterious oligomerization of the amyloidogenic proteins // *FEBS Journal*. 2010. Vol. 277, no. 14. P. 2940–2953.
193. Walsh P., Bursac D., Law Y. C., Cyr D., Lithgow T. The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. // *EMBO reports*. 2004. Vol. 5, no. 6. P. 567–571.
194. Wang J., Song J. J., Franklin M. C., Kamtekar S., Im Y. J., Rho S. H., Seong I. S., Lee C. S., Chung C. H., Eom S. H. Crystal structures of the HslVU peptidase-ATPase

- complex reveal an ATP-dependent proteolysis mechanism // *Structure*. 2001. Vol. 9, no. 2. P. 177–184.
195. Wegrzyn R. D., Bapat K., Newnam G. P., Zink a. D., Chernoff Y. O. Mechanism of prion loss after Hsp104 inactivation in yeast. // *Molecular and cellular biology*. 2001. Vol. 21, no. 14. P. 4656–4669.
 196. Wentink A. S., Nillegoda N. B., Feufel J., Ubartaitè G., Schneider C. P., De Los Rios P., Hennig J., Barducci A., Bukau B. Molecular dissection of amyloid disaggregation by human HSP70 // *Nature*. 2020. Nov. Vol. 587, no. 7834. P. 483–488.
 197. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016. P. 260.
 198. Wickner R. B. [*URE3*] as an altered *URE2* protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Science*. 1994. Vol. 264, no. 5158. P. 566–569.
 199. Wickner R. B. Discovering protein-based inheritance through yeast genetics. // *Journal of Biological Chemistry*. 2012. Vol. 287, no. 18. P. 14432–14442.
 200. Wickner R. B., Edskes H. K., Bateman D. a., Kelly A. C., Gorkovskiy A., Dayani Y., Zhou A. Amyloids and yeast prion biology // *Biochemistry*. 2013. Vol. 52, no. 9. P. 1514–1527.
 201. Wickner R. B., Bezsonov E., Bateman D. a. Normal levels of the antiprion proteins Btn2 and Cur1 cure most newly formed [*URE3*] prion variants. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014. Vol. 111, no. 26. E2711–20.
 202. Winkler J., Tyedmers J., Bukau B., Mogk A. Chaperone networks in protein disaggregation and prion propagation // *Journal of Structural Biology*. 2012a. Vol. 179, no. 2. P. 152–160.
 203. Winkler J., Tyedmers J., Bukau B., Mogk A. Hsp70 targets Hsp100 chaperones to substrates for protein disaggregation and prion fragmentation // *Journal of Cell Biology*. 2012b. Vol. 198, no. 3. P. 387–404.
 204. Yu C.-i., King C.-y. Forms and abundance of chaperone proteins influence yeast prion variant competition // *Molecular Microbiology*. 2019. Mar. Vol. 111, no. 3. P. 798–810.

205. Zaarur N., Xu X., Lestienne P., Meriin A. B., McComb M., Costello C. E., Newnam G. P., Ganti R., Romanova N. V., Shanmugasundaram M., Bandejas T. M., Matias P. M., Lobachev K. S., Lednev I. K., Chernoff Y. O., Sherman M. Y. RuvbL 1 and RuvbL 2 enhance aggregates formation and disaggregate amyloid fibrils // *EMBO Journal*. 2015. Vol. 34, no. 18. P. 2363–2382.
206. Zhang T., Lei J., Yang H., Xu K., Wang R., Zhang Z. An improved method for whole protein extraction from yeast *Saccharomyces cerevisiae* Tingting // *Yeast* (Chichester, England). 2011. Vol. 28, no. 11. P. 795–798.
207. Zhao X., Rodriguez R., Silberman R. E., Ahearn J. M., Saidha S., Cummins K. C., Eisenberg E., Greene L. E. Heat shock protein 104 (Hsp104)-mediated curing of $[PSI^+]$ yeast prions depends on both $[PSI^+]$ conformation and the properties of the Hsp104 homologs // *Journal of Biological Chemistry*. 2017. Vol. 292, no. 21. P. 8630–8641.
208. Zhao X., Lanz J., Steinberg D., Pease T., Ahearn J. M., Bezsonov E. E., Staguhn E. D., Eisenberg E., Masison D. C., Greene L. E. Real-time imaging of yeast cells reveals several distinct mechanisms of curing of the $[URE3]$ prion // *Journal of Biological Chemistry*. 2018. Vol. 293, no. 9. P. 3104–3117.
209. Zhao X., Stanford K., Ahearn J., Masison D. C., Greene L. E. Hsp70 Binding to the N-terminal Domain of Hsp104 Regulates $[PSI^+]$ Curing by Hsp104 Overexpression // *Molecular and Cellular Biology*. 2023. Apr. Vol. 43, no. 4. P. 157–173.
210. Zhouravleva G., Frolova L., Le Goff X., Le Guellec R., Inge-Vechtomov S., Kisselev L., Philippe M. Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. // *EMBO Journal*. 1995. Aug. Vol. 14, no. 16. P. 4065–72.
211. Zhu X., Zhao X., Burkholder W. F., Gragerov A., Ogata C. M., Gottesman M. E., Hendrickson W. A. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK // *Science*. 1996. Vol. 272, no. 5268. P. 1606–1614.

Благодарности

Хочу выразить мою благодарность за неоценимую роль в подготовке данной работы моей семье, а также всему коллективу лаборатории физиологической генетики кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ. Отдельно хочу поблагодарить:

- Журавлеву Галину Анатольевну и Матвеевко Андрея Георгиевича за руководство работой, помощь в интерпретации и критической оценке результатов исследования;
- Бондарева Станислава Александровича за неоценимый вклад в освоение методов и проведение ряда экспериментов;
- Куликову Александру Владимировну и Белявскую Юлианну Игоревну за помощь в проведении экспериментов;
- Чернова Юрия Олеговича и Рида Викнера за конструктивную критику результатов и ценные комментарии.

Особую благодарность хочу выразить Максютенко Евгении Михайловне за бесценную поддержку и помощь в работе и за её пределами.