

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Антон Александрович Нижников

**ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ И ДЕЙСТВИЯ
КОНФОРМАЦИОННЫХ БЕЛКОВЫХ МАТРИЦ
В ПРОТЕОМАХ ПРОКАРИОТ И ЭУКАРИОТ**

Научная специальность 03.02.07 – ГЕНЕТИКА

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора биологических наук

научный консультант доктор биологических наук,
академик РАН С.Г. Инге-Вечтомов

Санкт-Петербург, 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ. Амилоидогенез и прионизация: от патологии к функции.....	- 3 -
ГЛАВА I. Функциональные амилоиды растений	- 19 -
ГЛАВА II. Амилоидогенез и надорганизменные взаимодействия.....	- 41 -
ГЛАВА III. Прионизация белка: инактивация или изменение функции? .-	- 58 -
ГЛАВА IV. Условные прионы	- 75 -
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	- 87 -
ВЫВОДЫ.....	- 92 -
ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	- 94 -
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	- 98 -
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	- 101 -
БЛАГОДАРНОСТИ.....	- 128 -

ВВЕДЕНИЕ. Амилоидогенез и прионизация: от патологии к функции

Матричный принцип в биологии, сформулированный в 1928 году Николаем Константиновичем Кольцовым для объяснения механизма воспроизведения хромосом [по: Inge-Vechtomov, 2015] и позднее обобщенный Френсисом Криком в виде центральной догмы молекулярной биологии [Crick, 1970], объяснял транскрипцию и трансляцию как линейное копирование последовательностей элементов биологических макромолекул, то есть матриц I рода [по: Inge-Vechtomov, 2013; Nizhnikov, Antonets, Inge-Vechtomov, 2015]. Амилоидные белки также подчиняются матричному принципу при формировании белковых фибрилл, имеющих особую упорядоченную пространственную структуру, называемую кросс- β [Sipe, Cohen, 2000b]. Эта структура обладает свойствами конформационной матрицы или матрицы II рода [Inge-Vechtomov, 2013], обеспечивающей автокаталитическое приобретение мономерами соответствующего белка амилоидной конформации при включении в состав олигомеров или фибрилл [Nizhnikov, Antonets, Inge-Vechtomov, 2015].

Термин «кросс- β », описывающий структуру амилоидов, происходит из-за крестообразного рисунка, наблюдаемого при двумерной рентгеновской дифракции амилоидных фибрилл, образующего два максимума приблизительно в 10 и 4,7 Å [Eanes, Glenner, 1968], являющихся следствием регулярного расположения межмолекулярных β -слоев относительно оси фибриллы и

преимущественно перпендикулярной ориентации β -цепей в составе этих слоев, соответственно [Nelson *et al.*, 2005]. Тем не менее, пространственная структура амилоидов весьма гетерогенна и может включать у различных амилоидов, например, параллельно и антипараллельно расположенные β -слои, а также β -спирали [Melckebeke Van *et al.*, 2010; Qiang *et al.*, 2012; Smaoui *et al.*, 2013; Tycko *et al.*, 2009; Tycko, Wickner, 2013]. Такая структура амилоидных фибрилл, состоящих из повторяющихся через равные промежутки элементов, приводит к специфичным эффектам связывания ими ряда красителей. Например, при взаимодействии тиофлавина-Т (ТфТ) с амилоидами наблюдается усиление флуоресценции [Hobbs, Morgan, 1963; Vassar, Culling, 1959; Naiki *et al.*, 1989], а при связывании конго красного (КК) [Bennhold, 1922] – двойное лучепреломление в поляризованном свете [Divry, Florkin, 1927]. Значительное количество водородных связей в составе межмолекулярных β -слоев вносит значительный вклад в стабилизацию амилоидов [Makin *et al.*, 2005], которые приобретают благодаря этому уникальные физико-химические свойства, такие как устойчивость к обработке ионными детергентами [Selkoe, Ihara, Salazar, 1982] или протеазами [Bolton, McKinley, Prusiner, 1982; McKinley, Bolton, Prusiner, 1983], разрушающими большинство неамилоидных белковых комплексов [Nizhnikov *et al.*, 2014b]. Некоторые амилоиды обладают исключительной для биогенных частиц стабильностью, позволяющей им сохранять свою структуру и свойства, находясь в окружающей среде в течение десятилетий [Wiggins, 2009].

Исторически термин «амилоид» (от лат. *amylum* – крахмал) был впервые использован Маттиасом Шлейденом в 1838 году для обозначения крахмалистых конгломератов в клетках растений, которые окрашивались йодом в синий цвет [по: Kyle, 2001; Nizhnikov, Antonets, Inge-Vechtomov, 2015]. В 1854 году Рудольф Вирхов назвал амилоидами небольшие патологические включения в нервной ткани человека, которые, как и крахмальные зерна в клетках растений, окрашивались йодом в синий цвет [Virchow, 1854]. Позднее было установлено, что многие внутренние органы человека и животных претерпевают необратимые преобразования при инфильтрации патологическими амилоидными включениями [Kyle, 2001]. Эти конгломераты, известные с XVII века, в медицинской литературе того времени называли «жироподобными» или «восковыми» (в традициях французской и британской патанатомических школ, соответственно) и предполагали их целлюлозоподобную природу [Kyle, 2001]. Тем не менее, уже в 1859 году Август Кекуле и Карл Фрайдрих показали, что патологические «восковые» включения в селезенке обогащены азотом, что свидетельствовало в пользу их белковой природы [Friedreich, Kekule, 1859]. Окрашивание йодом этих белковых включений было связано с присутствием в их составе протеогликанов и гликозамингликанов [Niewold *et al.*, 1991]. В 1927 году был разработан уже упомянутый способ анализа «яблочно-зеленого» свечения амилоидов, окрашенных азокрасителем КК в поляризованном свете [Divry, Florin, 1927] (которое, на самом деле, может быть разных цветов, включая синий и желтый [Howie *et al.*,

2008]). Этот подход на долгое время стал «золотым стандартом» в патанатомическом описании амилоидных включений [Sipe *et al.*, 2014]. Далее в практику работы с амилоидами была внедрена электронная микроскопия, с использованием которой в 1959 году были показаны фибриллярные свойства амилоидов [Cohen, Calkins, 1959] и позднее описаны уровни организации амилоидов, включающие протофиламенты, латерально стыкующиеся сначала в филаменты и затем в более крупные, почти не разветвленные образования – фибриллы, которые и являются наиболее типичной для амилоидов формой надмолекулярной организации [Sipe, Cohen, 2000a; Fitzpatrick *et al.*, 2013; Lashuel *et al.*, 2000]. В 1968 году был разработан метод водной экстракции амилоидов, который дал возможность выделения этих фибрилл из тканей и открыл перспективы работы с ними *in vitro* [Pras *et al.*, 1968]. В том же году в ходе исследования при помощи рентгеновской дифракции фибрилл, выделенных из инфильтрованных патологическими амилоидными включениями тканей, была описана «кросс-β» картина [Eanes, Glenner, 1968], позднее интерпретированная в виде общей, хотя и полиморфной в контексте точного положения регулярно повторяющихся элементов, модели кросс-β структуры амилоидов [Sunde *et al.*, 1997].

Столь значительный интерес к изучению амилоидов на протяжении длительного промежутка времени, продолжающегося до сих пор, отнюдь не случаен. Многочисленные заболевания человека и животных, характеризующиеся патологической аккумуляцией амилоидных включений, получили название амилоидозов [Kyle, 2001; Sipe, Cohen, 2000a; Blancas-Mejía, Ramirez-Alvarado, 2013; Chiti, Dobson, 2006]. Эти заболевания, в основном, неизлечимы [Baker, Rice, 2012; Picken, 2020] и являются достаточно многообразными по особенностям возникновения (первичные или вторичные) и характеру локализации (локализованные и системные) [Benson *et al.*, 2018]. Целый ряд неизлечимых нейродегенеративных заболеваний, включая болезни Альцгеймера [Selkoe *et al.*, 1986], Паркинсона [Araki *et al.*, 2019] и Хантингтона [DiFiglia *et al.*, 1997], также связаны с амилоидной агрегацией определенных белков, а также, вероятно, со взаимодействием амилоидных белков друг с другом [Bondarev *et al.*, 2018]. Наконец, в последние годы установлено, что при некоторых видах рака наблюдается формирование амилоидов определенными белками [Ano Bom *et al.*, 2012; Lasagna-Reeves *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2011]. Причинно-следственные связи агрегации белков и патологии не всегда ясны, как, например, в случае диабета II типа, поражающего до полумиллиарда человек [Meetoo, McGovern, Safadi, 2007], при котором наблюдается амилоидная агрегация пептида IAPP [Westermarck *et al.*, 1986]. Особую группу амилоидных заболеваний человека и животных составляют нейродегенеративные прионные болезни, вызываемые белком PrP в амилоидной конформации Sc

(скрепи, историческое название прионной болезни овец) [Bolton, McKinley, Prusiner, 1982], который сохраняет инфекционность при переваривании в пищеварительном тракте [McKinley, Bolton, Prusiner, 1983] и способен преодолевать некоторые межвидовые барьеры (например, передаваться человеку при употреблении в пищу зараженного мяса коров) [Cobb, Surewicz, 2009; Kraus, Groveman, Caughey, 2013; Vanik, Surewicz, Surewicz, 2004]. В настоящее время под термином «прионы» понимают белки, определенные конформации которых (обычно амилоидные) обладают инфекционными свойствами [Wickner *et al.*, 2015]. Несмотря на то, что для большинства известных амилоидов отсутствуют данные об инфекционности, недавние исследования показывают, что α -синуклеин (ассоциированный с развитием болезни Паркинсона), белок Тау (таупатии и болезнь Альцгеймера) и амилоидный пептид- β (болезнь Альцгеймера) обладают прионоподобными свойствами [Aoyagi *et al.*, 2019; Lasagna-Reeves *et al.*, 2012; Luk *et al.*, 2012]. Таким образом, число прионов среди патологических амилоидов человека в перспективе может существенно возрасти.

В целом, к настоящему времени выявлено более 40 белков, экстраклеточная и внутриклеточная амилоидная агрегация которых ассоциирована с развитием неизлечимых заболеваний человека [Benson *et al.*, 2018], среди которых, как мы упоминали ранее, есть болезни, обладающие высокой социальной значимостью, такие как диабет II типа и болезнь Альцгеймера. Согласно гипотезе Кристофера Добсона участки, потенциально склонные к амилоидогенезу,

присутствуют в большинстве белков протеома, однако специализированные клеточные системы синтеза, фолдинга и деградации белка контролируют образование амилоидов *in vivo* и препятствуют формированию тех из них, которые могут быть болезнетворными. Нарушение работы этих систем приводит к развитию амилоидозов, многие из которых являются старческими болезнями [Dobson, 2003; Dobson, 2004].

Другая сторона мира амилоидных белков была открыта в 2000 году, когда были идентифицированы амилоиды в хорионе яиц шелкопряда, выполняющие *in vivo* функцию защиты эмбриона [Iconomidou, Vriend, Hamodrakas, 2000] и гидрофобинов базидиомицета *Schizophyllum commune* [Vocht de et al., 2000]. К настоящему времени такие амилоиды, названные «функциональными», обнаружены во всех трех доменах живого мира: у архей [Dueholm et al., 2015; Chimileski, Franklin, Papke, 2014], бактерий [Blanco et al., 2012; Romero, Kolter, 2014; Schwartz, Boles, 2013b], эукариот [Nizhnikov et al., 2016a; Nizhnikov, Antonets, Inge-Vechtomov, 2015; Otzen, Riek, 2019]. Даже у вирусов выявлены функциональные амилоидоподобные белки [Nan et al., 2019], а общее число идентифицированных в различных филогенетических группах функциональных амилоидов превысило количество патологических [Otzen, Riek, 2019].

Так, у прокариот идентифицированы десятки функциональных амилоидов, преимущественно вовлеченных в формирование биопленок, хранение токсинов и формирование белковых оболочек [Gerven Van *et al.*, 2018; Shanmugam *et al.*, 2019]. В то время как большинство амилоидов прокариот выполняют структурную или запасующую функцию, некоторые бактериальные токсины активны именно в амилоидной форме [Oh *et al.*, 2007]. Многие амилоиды прокариот представляют собой факторы вирулентности, вовлеченные в надорганизменные взаимодействия «патоген-хозяин» [Schwartz, Boles, 2013a]. Так, показана роль амилоидных компонентов биопленок, которые функциональны для бактерий, но патогенны для многоклеточного хозяина, в процессе развития инфекционных заболеваний у человека [Gerven Van *et al.*, 2018]. С учетом того, что: (i) структурным компонентом биопленок целого ряда филогенетически удаленных видов прокариот являются амилоиды [Taglialegna, Lasa, Valle, 2016]; (ii) число видов патогенных для человека бактерий составляет около 1500 [Shaw *et al.*, 2020] и (iii) 65% из них образуют биопленки, ассоциированные с инфекционными заболеваниями [Costerton, 2001], реальное число только лишь амилоидов патогенных бактерий, являющихся компонентами биопленок может составлять около тысячи. Таким образом, патологические амилоиды, чьи структурные белки закодированы в геноме человека, представляют собой лишь малую часть амилоидов, ассоциированных с развитием заболеваний, количество которых потенциально может исчисляться тысячами [Kosolapova *et al.*, 2020]. Несмотря на относительную

разработанность вопроса вовлеченности амилоидов прокариот во взаимодействия «патоген-хозяин», данные о наличии амилоидных белков у симбиотических бактерий, представляющих собой второй ключевой вектор надорганизменных взаимодействий, к началу работ по данной диссертации отсутствовали.

Функциональные амилоиды идентифицированы и у эукариот, в частности, у человека и других млекопитающих, где они играют ключевую роль в полимеризации меланина [Fowler *et al.*, 2006], запасании гормонов [Maji *et al.*, 2009], биоминерализации зубной эмали [Carneiro *et al.*, 2016], формировании долговременной памяти [Fioriti *et al.*, 2015] и ряде иных биологических процессов [Bondarev *et al.*, 2018]. В большинстве случаев образование амилоидов необходимо либо для формирования упорядоченных структур, используемых в качестве «каркаса» (как в случае полимеризации меланина [Fowler *et al.*, 2006] или зубной эмали [Carneiro *et al.*, 2016]), либо для запасания и хранения в амилоидной форме определенных белков или пептидов, активных в мономерном состоянии (например, гормонов [Maji *et al.*, 2009]). Таким образом, даже функциональный амилоидогенез, может быть сопряжен с постоянной или временной функциональной инактивацией белка, которая прекращается при переходе этого белка из амилоидного в мономерное (или какое-либо иное) состояние, для чего могут быть использованы специальные молекулярные механизмы, такие как изменение pH в компартментах, где запасаются белки в амилоидной форме [Maji *et al.*, 2009]. Функциональные амилоиды идентифицированы также у грибов

[Ramsook *et al.*, 2010], моллюсков [Si *et al.*, 2003], насекомых [Majumdar *et al.*, 2012], однако наиболее значимой для человека группой организмов, у которой к началу наших работ не были известны белки, образующие амилоиды в физиологических условиях, оставались растения [Antonets, Nizhnikov, 2017b].

Функциональные амилоиды грибов широко используются этими организмами для построения структур клеточной стенки [Kalebina *et al.*, 2008; Ramsook *et al.*, 2010; Ryzhova *et al.*, 2017], однако особый интерес прикован к амилоидам грибов-аскомицетов в связи с наличием у них группы инфекционных амилоидов – прионов [Wickner, 1994]. Прионы грибов и, прежде всего, дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, могут быть функциональными, вредными для клеток [McGlinchey, Kryndushkin, Wickner, 2011; Nakayashiki *et al.*, 2005; Wickner *et al.*, 2007] или же не оказывать каких-либо видимых эффектов [Chernova, Wilkinson, Chernoff, 2014; Derkatch, Liebman, 2007b; Nizhnikov *et al.*, 2016a]. Прионы могут существовать в виде различных структурных состояний, называемых вариантами, обладающих отличающимися фенотипическими проявлениями [Bateman, Wickner, 2013; Wickner, Son, Edskes, 2019]. Функциональные прионы дрожжей контролируют псевдомногоклеточность [Holmes *et al.*, 2013] или устойчивость этих организмов к различным химическим соединениям [Suzuki, Shimazu, Tanaka, 2012; Harvey *et al.*, 2020], повышая их выживаемость в определенных условиях [Chakravarty *et al.*, 2020; Itakura *et al.*, 2020]. Несмотря на участие в контроле определенных биологических функций, прионизация, как и

амилоидогенез в целом, отождествляется большинством исследователей с функциональной инактивацией соответствующих структурных белков [Kundu *et al.*, 2020]. Один из классических постулатов о дрожжевых прионах, предложенный Ридом Викнером, гласит, что фенотипы приона и делеции его структурного гена совпадают [Wickner, 1994]. Вместе с тем, весьма малоизученной остается проблема сходства эффектов прионизации белка и делеции его структурного гена на молекулярном уровне. Нельзя исключать, что инактивация белка в случае формирования приона может быть лишь частичной и даже приводить к возникновению новых функций у этого белка. Также неясным остается вопрос о том, могут ли белки приобретать прионные свойства при изменении условий, например, уровня продукции, хотя к настоящему времени уже получены некоторые свидетельства в пользу того, что «амилоидом» или совокупность амилоидных (включая и прионные) белков клетки [Nizhnikov, Antonets, Inge-Vechtomov, 2015] является динамической системой [Audas *et al.*, 2016].

Способность к автокаталитическому матричному воспроизведению, высокая стабильность и относительная простота первичной структуры (амилоиды образуют, например, полипептиды, состоящие из повторов Q [Perutz *et al.*, 1994], N [Perutz *et al.*, 2002] или E [Colaco, Park, Blanch, 2008]) привели Карла Петера Маури к гипотезе о том, что амилоиды могли быть одним из древнейших вариантов структурной и функциональной организации биологических макромолекул на заре формирования жизни на нашей планете

[Maury, 2009; Maury, 2018]. Если предположить, что эта гипотеза верна, в пользу чего свидетельствуют некоторые исследования [Katsnelson, 2020; Rout *et al.*, 2018], можно было бы ожидать, что амилоиды могли бы быть весьма широко распространены среди существующих сейчас крупных таксонов.

Накопленные к настоящему времени данные позволяют констатировать изменение парадигмы «амилоид – патоген» и показывают, что эти белковые фибриллы как конформационные матрицы являются одним из важнейших вариантов функциональной четвертичной структуры белка [Nizhnikov, Antonets, Inge-Vechtomov, 2015]. Тем не менее, несмотря на значительное количество амилоидов, идентифицированных у разных групп организмов, существуют серьезные пробелы в понимании масштабов разнообразия амилоидов, особенностей их формирования и биологических функций, вызванные, прежде всего, тем, что большинство амилоидов выявляли путем анализа отдельных генов и их продуктов, что не позволяло оценить распространенность амилоидов во всем протеоме. Протеомный подход, позволяющий рассматривать амилоиды как совокупность белков с различными последовательностями, но объединенных пространственной структурой, имеющей целый ряд общих черт, лег в основу исследований, выполненных в рамках настоящей диссертации.

Целью настоящего исследования было выявление новых особенностей формирования и действия белковых конформационных матриц на протеомном уровне. Исследования в рамках этой цели были направлены на решение следующих **задач**:

1. Выявить потенциально амилоидогенные белки в протеомах растений и провести экспериментальную проверку амилоидных свойств выбранных кандидатов.

2. Охарактеризовать комплексы потенциально амилоидогенных белков и идентифицировать амилоиды в протеомах симбиотических и патогенных видов протеобактерий.

3. Сравнить функциональные последствия прионизации белков на уровне экспрессии всего генома с эффектами инактивации соответствующих структурных генов.

4. Изучить влияние первичной структуры и уровня продукции на прионные свойства белков.

Новизна работы определяется тем, что в ее рамках впервые в мировой практике открыты амилоидные белки у растений и симбиотических бактерий, показана их связь с запасанием белка в семенах и надорганно-изменными взаимодействиями, соответственно. Установлено, что прионизация белка может приводить не к подавлению, а к изменению его функций. Описана новая группа белков, способных поддерживать прионные свойства в условиях продукции, отличающихся от нативных, названных нами «условными прионами».

Практическая ценность работы обусловлена описанным нами амилоидогенезом запасных белков семян, представляющих важный компонент рациона питания человека. Эти амилоиды могут, с одной стороны, влиять на пищевую ценность семян, а с другой – быть источником пищевых аллергий.

На защиту выносятся следующие **положения**:

1. Впервые идентифицирован функциональный амилоидный белок у растений, представляющий собой запасной белок семян посевного гороха *P. sativum* L. вицилин.
2. Впервые идентифицированы амилоиды у симбиотических бактерий, формируемые поринами наружной мембраны клубеньковой бактерии *R. leguminosarum* RopA и RopB.
3. Установлено, что эффекты прионизации белка не тождественны делеции его структурного гена, то есть прионизация может вызывать не инактивацию белка, а изменение его функции.
4. На примере транскрипционного регулятора Gln3 дрожжей *S. cerevisiae* показано, что белки, получившие название «условных прионов», приобретают и поддерживают прионные свойства только при уровнях продукции, отличающихся от естественных.

Результаты диссертации апробированы в докладах на более чем пятидесяти значимых международных конференциях, включая конгрессы Вавиловского общества генетиков и селекционеров (2019, 2014), Федерации европейских биохимических обществ (2019, 2018,

2017), Американского общества клеточной биологии (2018, 2017), Федерации биохимических обществ Франции, Испании и Португалии (2015), Европейской ассоциации молекулярной биологии (2014), конгрессе по аналитической протеомике (2015), конференциях по генетике и молекулярной биологии дрожжей (2015, 2019), прионным белкам (2016), европейском симпозиуме по top-down протеомике (2019), BGRS/SB (2016, 2018, 2020), PLAMIC (2018), международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (2019, 2018, 2017), юбилейной конференции «50 лет ВОГиС: успехи и перспективы (2015) и целом ряде других мероприятий. Результаты работы представлены и обсуждены в 20 полнотекстовых статьях в журналах, индексируемых в международных базах данных. Соискатель внес основной вклад в планирование, получение и интерпретацию результатов диссертации. Личный вклад соискателя подтвержден тем, что почти во всех ключевых публикациях он является автором, ответственным за переписку или первым автором. Эксперименты по фибриллогенезу белков выполнены совместно с А. И. Сулацкой и М. И. Сулацким, гистологические исследования семян растений – совместно с Е. А. Андреевой и П. А. Зыкиным. Детальное описание использованных методов и подходов приведено в статьях, опубликованных по результатам работы. Источником материала для исследования послужили уникальные генетические коллекции растений и бактерий (ФГБНУ «Всероссийский институт сельскохозяйственной микробиологии» (ФГБНУ ВНИИСХМ)), а также дрожжей (кафедра генетики и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Санкт-

Петербургский государственный университет» (СПбГУ)). Протеомные исследования выполнены в центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ, работы по секвенированию выполнены в центре коллективного пользования «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ. Результаты, представленные в диссертации, получены при поддержке грантов Президента Российской Федерации (МК-3240.2017.4, МК-4854.2015.4), Российского научного фонда (17-16-01100П, 17-16-01100), Российского фонда фундаментальных исследований (17-04-00816, 16-34-60153) и Комитета по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга.

Диссертация включает введение, четыре главы и заключение; изложена на 128 страницах текста, содержит 25 иллюстраций, две таблицы и 230 ссылок на использованные источники литературы.

ГЛАВА I. Функциональные амилоиды растений

Функциональные амилоиды описаны у различных групп эукариот, включая хордовых, членистоногих, моллюсков и грибов, однако растения, несмотря на крайне высокую значимость для человека, оставались малоизученной группой в области биологии амилоидов [Nizhnikov, Antonets, Inge-Vechtomov, 2015; Otzen, Riek, 2019]. Тем не менее, для нескольких белков растений или их фрагментов была установлена способность образовывать фибриллы, демонстрирующие некоторые свойства амилоидов *in vitro* (Рисунок 1). Такие свойства показаны для С-терминального домена белка прогевеина *Hevea brasiliensis* [Berthelot *et al.*, 2016], трансглутаминазы *Zea mays*, фрагментов дефензина RsAFP1 и RsAFP2 *Raphanus sativus* [Garvey *et al.*, 2013], антимикробного пептида Cn-AMP2 *Cocos nucifera* [Gour *et al.*, 2016] (подробное описание амилоидогенных белков растений приведено в обзоре [Antonets, Nizhnikov, 2017b]). Некоторые QN-богатые транскрипционные регуляторы растений, связанные с контролем Autonomous Flowering Pathway (автономный путь цветения, AFP), проявляли амилоидоподобные и прионоподобные свойства при гетерологичной продукции в дрожжах *S. cerevisiae* [Chakrabortee *et al.*, 2016]. Вероятно, наибольший интерес представляли данные об амилоидных свойствах полимерных субстанций, выделяемых при прикреплении к субстрату зелеными водорослями, однако конкретные белки, к сожалению, идентифицированы в этих работах не были [Mostaert *et al.*, 2006; Mostaert *et al.*, 2009].

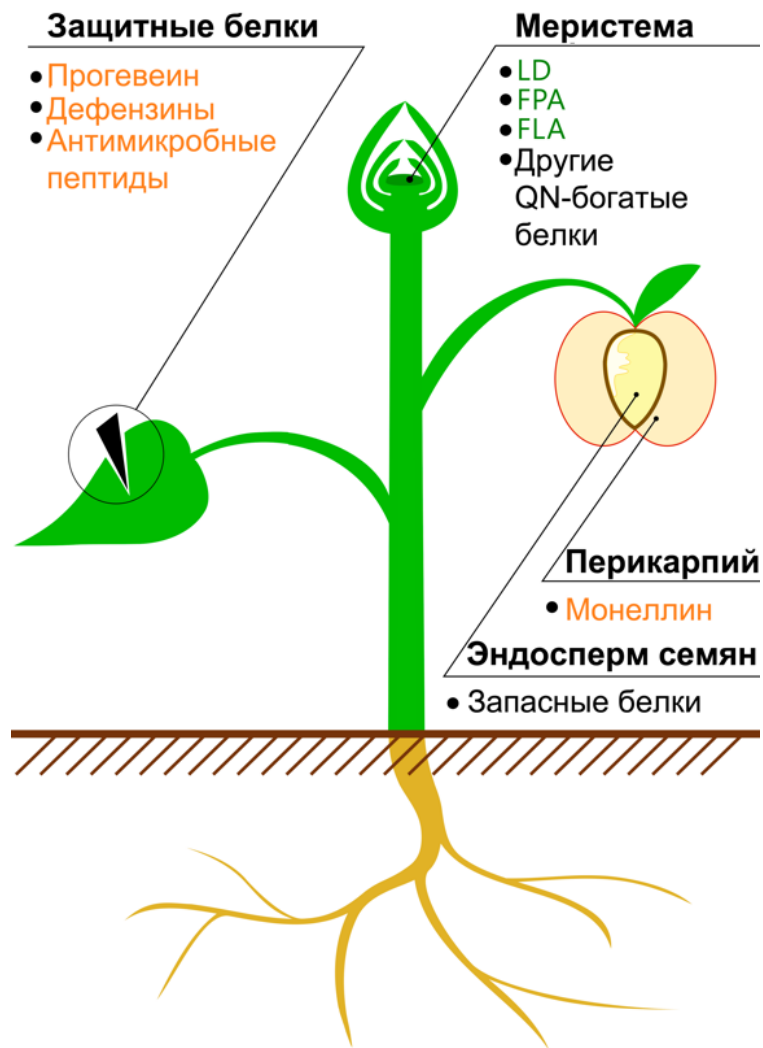


Рисунок 1. Амилоидогенные белки растений. Показано схематическое изображение растения. Указаны названия белков или пептидов, амилоидогенные свойства которых частично охарактеризованы *in vivo* (зеленый) или *in vitro* (оранжевый), а также белков, фрагменты которых обладают амилоидогенными свойствами (черный) [Antonets, Nizhnikov, 2017b].

Хорошо известна способность фрагментов белков семян растений, образующихся в результате неполного кислотного гидролиза (при варке в среде с $pH \leq 2,0$), образовывать фибриллярные агрегаты, что свидетельствует в пользу наличия в их последовательностях амилоидогенных участков (обзор амилоидогенных свойств гидролизатов различных пищевых

продуктов проведен в работах [Cao, Mezzenga, 2019; Jansens *et al.*, 2019]). Таким образом, к началу наших исследований у растений не были известны белки, образующие амилоиды *in vivo* в физиологических условиях, однако на основе имеющихся данных можно было предположить, что такие белки существуют и, вероятно, выполняют у этих организмов определенные биологические функции.

Мы начали изучение амилоидных белков растений с биоинформатического анализа встречаемости амилоидогенных участков в их протеомах и связи обогащенности амилоидогенными участками с конкретными функциональными группами белков растений. В работу были включены протеомы всех видов наземных растений с секвенированными и функционально аннотированными на тот момент геномами. Протеомы этих 75 видов содержали примерно 2,9 миллиона белков, которые и были подвергнуты анализу на наличие потенциально амилоидогенных участков (ПАУ) [Antonets, Nizhnikov, 2017a] при помощи алгоритма Waltz [Maurer-Stroh *et al.*, 2010] и разработанного нами ранее алгоритма SARP (анализ последовательностей, основанный на ранжировании вероятностей) [Antonets, Nizhnikov, 2013].

Необходимо отметить, что все существующие на данный момент алгоритмы для предсказания потенциально амилоидогенных свойств белков оценивают наличие потенциально амилоидогенных свойств у отдельных участков первичной структуры белка, и не могут предсказывать амилоидные свойства полноразмерного белка *in vivo* с учетом взаимодействий амилоидогенных и неамилоидогенных

участков в его структуре и влияния внешней среды [Santos *et al.*, 2020]. Тем не менее, биоинформатический анализ позволяет сформировать представление о функциональных группах белков или белковых доменах с повышенным содержанием амилоидогенных участков, подсказывая исследователю, «где искать» амилоидные белки. Дальнейшее подтверждение амилоидных свойств необходимо проводить уже экспериментальными биохимическими и молекулярно-биологическими методами [Nizhnikov, Antonets, Inge-Vechtomov, 2015]. Алгоритм Waltz (в работе использовали следующие параметры: максимальная специфичность; рН 7,0) основан на позиционных матрицах и предсказывает ПАУ, обогащенные преимущественно гидрофобными аминокислотами. Положение каждого аминокислотного остатка в таких участках может быть критичным и даже перестановка двух аминокислот местами может приводить к потере участком амилоидогенных свойств [Maurer-Stroh *et al.*, 2010]. Алгоритм SARP основан на выявлении участков белков с преобладанием одной или нескольких аминокислот, называемых также участками с пониженной сложностью (англ. low complexity regions) [Antonets, Nizhnikov, 2013]. В частности, для многих известных амилоидных белков характерно повышенное содержание N, Q или N и Q одновременно [Harrison, Gerstein, 2003; Michelitsch, Weissman, 2000]. Именно такие участки выявляли при помощи SARP (использовали порог вероятности 10^{-8}) [Antonets, Nizhnikov, 2013].

Проведенный нами биоинформатический скрининг в протеомах 75 видов наземных растений выявил ряд закономерностей,

описывающих распределение амилоидогенных участков в белках этой систематической группы эукариот. В частности, анализ представленности биологических процессов, основанный на данных базы Gene Ontology (GO), показал, что значительная доля потенциально амилоидогенных белков, предсказанных Waltz, вовлечена в различные виды транспорта веществ через мембрану [Antonets, Nizhnikov, 2017a]. Такой результат представляется логичным, с учетом того, что трансмембранные белки, зачастую склонны формировать обогащенную β -слоями структуру, называемую « β -баррель» (от англ. barrel – бочка) [Chaturvedi, Mahalakshmi, 2017]. Алгоритм SARP показал обогащенность амилоидогенными участками белков, выполняющих функции кофакторов транскрипции, связывания клатрина и фосфатидил-инозитола, однако наибольшее число видов (более двух третей из проанализированных) имели обогащенные амилоидогенными участками белки, выполняющие функцию резервуара питательных веществ, большинство из которых являются запасными белками семян (Рисунок 2).

Дальнейший биоинформатический скрининг белковых доменов, обогащенных амилоидогенными участками (ПАУ), предсказанными алгоритмом SARP, позволил установить [Antonets, Nizhnikov, 2017a], что наиболее обогащены ПАУ домены семейства Cupin-1, присущие запасным белкам семян (7S и 11S глобулинам) и имеющие структуру β -барреля [Dunwell, Purvis, Khuri, 2004]. Всего было выявлено 302 содержащих ПАУ запасных белков семян с доменами Cupin-1 у 54 из 75 проанализированных видов, относящихся как к однодольным, так и двудольным покрытосеменным, что свидетельствует в пользу эволюционной консервативности данного свойства (Рисунок 3). Таким образом, данные, полученные в ходе масштабного биоинформатического скрининга потенциально амилоидогенных белков в протеомах растений [Antonets, Nizhnikov, 2017a], позволили нам выдвинуть гипотезу о том, что амилоидогенез потенциально может быть вовлечен в механизмы запасания белка в семенах растений, к экспериментальной проверке которой мы перешли далее.

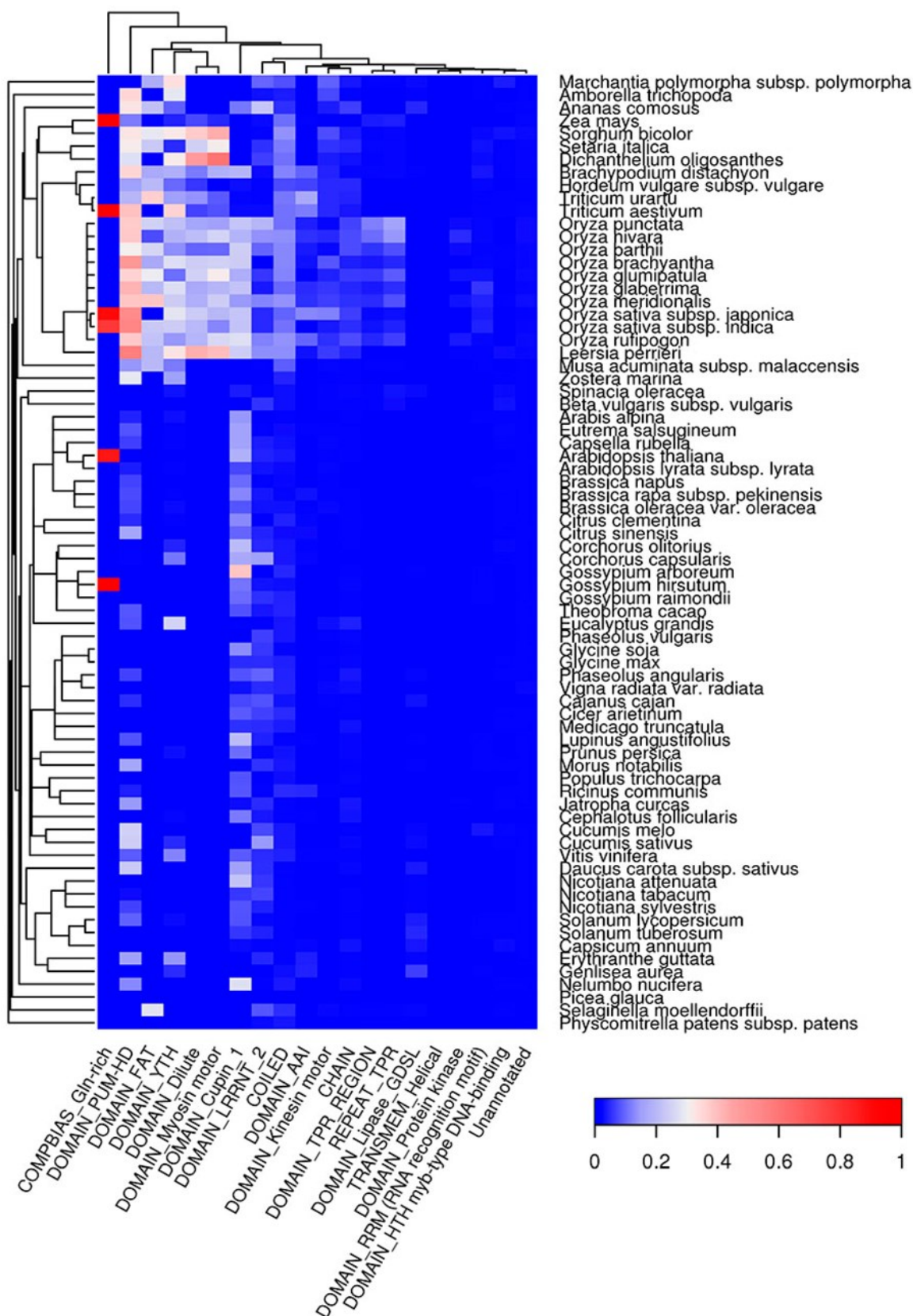


Рисунок 3. 20 групп доменов белков растений, наиболее обогащенных потенциально амилоидогенными участками, предсказанными SARP. Цвет клеток обозначает долю белков с потенциально амилоидогенными участками среди всех белков с этим признаком. Дендрограмма видов растений соответствует их филогенетическому древу [Antonets, Nizhnikov, 2017a].

Для проверки гипотезы о роли амилоидогенеза в запасании белка семян у растений мы провели протеомный скрининг амилоидных белков в зрелых (30 дней после опыления) семенах скороспелой линии *Sprint-2* [Borisov *et al.*, 1997; Malovichko *et al.*, 2020] гороха посевного *P. sativum* L. Накопление запасных белков в таких семенах приближалось к максимуму в результате активной сверхэкспрессии генов запасных белков, происходящей на более ранних этапах развития семян [Malovichko *et al.*, 2020]. Необходимо уточнить, что после достижения зрелости у семян, называемых «ортодоксальными», происходит естественная дегидратация, сопровождающаяся компактизацией генетического материала [Zanten van *et al.*, 2012] и стабилизацией резервуара питательных веществ. В результате этого комплекса процессов семена переходят в состояние покоя, в котором они способны пережить неблагоприятные условия в течение весьма длительного времени [Angelovici *et al.*, 2010]. Например, семена лотоса орехоносного (*Nelumbo nucifera* Gaertn.), запасные белки которого, по нашим данным, наиболее сильно обогащены потенциально амилоидогенными участками [Antonets, Nizhnikov, 2017a], успешно прорастали в возрасте около 1300 лет [Shen-Miller *et al.*, 1995; Shen-Miller *et al.*, 2013].

Протеомный скрининг амилоидных белков был проведен с использованием метода PSIA-LC-MALDI [Nizhnikov *et al.*, 2016b]. Особенность этого метода состоит в выделении путем нескольких ультрацентрифугирований фракции белковых агрегатов, устойчивых к обработке ионными детергентами [Nizhnikov *et al.*,

2014b; Antonets *et al.*, 2016], что является одним из ключевых свойств амилоидов [Bolton, McKinley, Prusiner, 1982], в исследуемых тканях или культурах клеток. Далее производится растворение полученных детергент-устойчивых агрегатов, обработка белков трипсином, разделение продуктов трипсинолиза при помощи ВЭЖХ и идентификация белков, составляющих детергент-устойчивые фракции, посредством масс-спектрометрии [Nizhnikov *et al.*, 2016b]. Необходимо отметить, что идентифицированные подобными скрининговыми методами белки являются лишь кандидатами на роль новых амилоидов, для доказательства амилоидных свойств которых необходимо использовать комплекс дополнительных методов анализа свойств образуемых ими агрегатов *in vitro* и *in vivo* [Nizhnikov, Antonets, Inge-Vechtomov, 2015].

В результате выполненного нами при помощи PSIA-LC-MALDI протеомного скрининга был описан ансамбль белков, формирующих детергент-устойчивые полимеры в зрелых семенах гороха [Antonets *et al.*, 2020]. Мы идентифицировали белки, представляющие все три основных класса запасных белков семян гороха: вицилины, конвицилины и легумины. Мы также выявили в составе детергент-устойчивых фракций семян гетерополимерный железосвязывающий белок ферритин, биотин-содержащий белок SBP65 и белок дегидрин, участвующий в ответе на действие засухи [Garnczarska, Zalewski, Wojtyla, 2008]. Наиболее высокий масс-спектрометрический счет (параметр, отражающий достоверность идентификации)

продемонстрировали запасные 7S глобулины семян вицилины, что свидетельствовало об их преобладании в составе детергент-устойчивых полимерных фракций семян гороха. Для дальнейшего анализа амилоидных свойств *in vivo* и *in vitro* в качестве наиболее перспективного кандидата мы выбрали вицилин массой 47 кДа, поскольку его N- и C-концевые области были идентифицированы tandemным масс-спектрометрическим анализом (МС/МС), что свидетельствовало в пользу того, что этот белок образует детергент-устойчивые полимеры в полноразмерной форме [Antonets *et al.*, 2020].

Белок вицилин содержит два эволюционно-консервативных домена семейства Cupin-1, имеющих структуру β -барреля, обогащенную регулярно повторяющимися β -слоями – Cupin-1.1 и Cupin-1.2 (Рисунок 4А). Именно домены семейства Cupin-1 были выявлены нами в биоинформатическом скрининге как потенциально наиболее амилоидогенные белковые домены в протеомах наземных растений [Antonets, Nizhnikov, 2017a]. Дополнительный анализ наличия потенциально амилоидогенных участков (ПАУ) в последовательности белка вицилина, проведенный нами при помощи алгоритма AmylPred2, объединяющего восемь различных алгоритмов предсказания ПАУ [Tsolis *et al.*, 2013], показал, что все ПАУ в последовательности вицилина локализованы внутри двух его доменов Cupin-1.1 и Cupin-1.2, причем Cupin-1.1 содержит пять таких участков, а Cupin-1.2 – четыре (Рисунок 4А). Исходя из этих данных, мы

решили анализировать *in vitro* амилоидогенные свойства не только полноразмерного вицилина, но и его доменов Cupin-1.1 и Cupin-1.2. Эти белки были наработаны в клетках *E. coli*, выделены и очищены, после чего была проанализирована их способность формировать фибриллы *in vitro*. Фибриллы Cupin-1.1 и Cupin-1.2 были успешно получены при помощи ранее опубликованного протокола [Kayed *et al.*, 2007; Kosolarova *et al.*, 2019] с использованием растворителя ГФИП (Рисунок 4Б). В то же время, для эффективного формирования фибрилл вицилином (Рисунок 4Б) необходимо было дополнительно добавлять в раствор «затравки» [Scherpelz *et al.*, 2016] из предсуществующих агрегатов этого белка, образовавшихся в ходе предыдущего цикла фибриллогенеза. Окрашивание фибрилл конго красным (КК) с последующей поляризационной микроскопией показало, что все три белка (вицилин, Cupin-1.1 и Cupin-1.2) демонстрируют характерное для амилоидов двойное лучепреломление в поляризованном свете (Рисунок 4В). При помощи вестерн-блот гибридизации с поликлональными антителами против вицилина было показано, что агрегаты всех этих трех белков обладают устойчивостью к обработке детергентом додецилсульфатом натрия (ДСН) (Рисунок 4Г) [Antonets *et al.*, 2020].

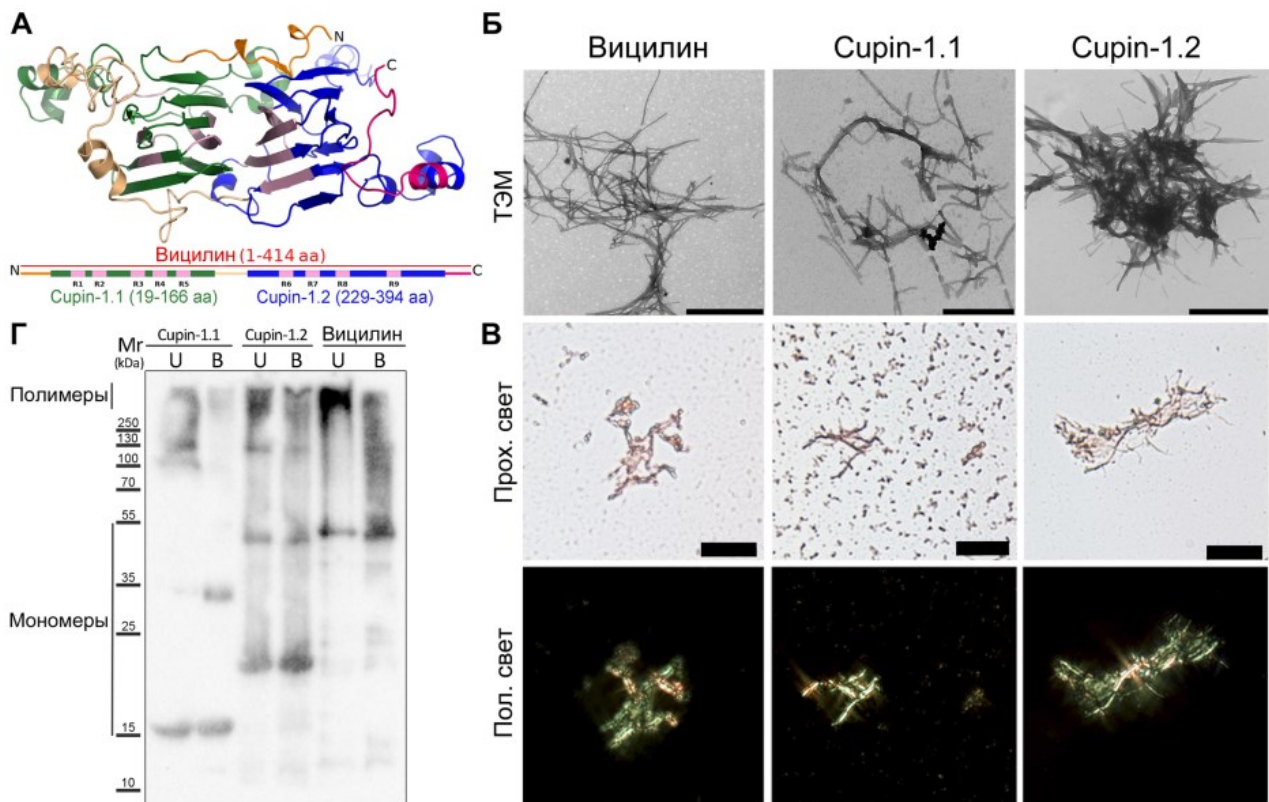


Рисунок 4. Амилоидные свойства вицилина и его доменов Cupin-1.1 и Cupin-1.2 *in vitro*. **А.** Структура вицилина *P. sativum* L., предсказанная с помощью сервера I-TASSER [Yang, Zhang, 2015]. Доменная структура представлена в линейном виде ниже; домен Cupin-1.1 отмечен зеленым, Cupin-1.2 – синим; области, не входящие в состав доменов – охристым, светло-желтым и лиловым. ПАУ, предсказанные алгоритмом AmylPred2 [Tsolis *et al.*, 2013], обозначены как R1-R9 и окрашены розовым. **Б.** ТЭМ фибрилл вицилина и его доменов, полученных *in vitro* путем растворения соответствующих белков в 50% ГФИП с последующим выпариванием в потоке азота и фибрилlogenезом в дистиллированной воде. Масштабная линейка соответствует 500 нм. **В.** Окрашивание фибрилл вицилина и его доменов красителем КК. Показаны окрашенные фибриллы в проходящем (верхний ряд) и поляризованном (нижний ряд) свете. Масштабная линейка равна 20 мкм. **Г.** Устойчивость агрегатов вицилина и его доменов к обработке холодным (У) и горячим (В) 2% ионным детергентом ДСН. Показан маркер молекулярной массы (Mr) в килодальтонах (kDa) [Antonets *et al.*, 2020].

При гетерологичной экспрессии в клетках дрожжей *S. cerevisiae* вицилин и оба его домена формировали внутриклеточные агрегаты (Рисунок 5А), а при секреции на поверхность клеток *E. coli* в системе C-DAG [Sivanathan, Hochschild, 2013] (Рисунок 5Б) – фибриллы (Рисунок

5В), связывающие краситель КК (Рисунок 5Г) и демонстрирующие двойное лучепреломление в поляризованном свете (Рисунок 5Д). Необходимо отметить, что клетки *E. coli*, продуцирующие Cupin-1.2, весьма слабо связывали КК, по сравнению с клетками, продуцирующими вицилин и Cupin-1.1, что является любопытным примером псевдонегативного результата в системе C-DAG (Рисунок 5Б-Д). В целом, на основании полученных данных можно констатировать, что вицилин и оба его домена Cupin-1.1 и Cupin-1.2 образуют *in vitro*, а также при секреции на поверхность бактериальных клеток, амилоидные фибриллы.

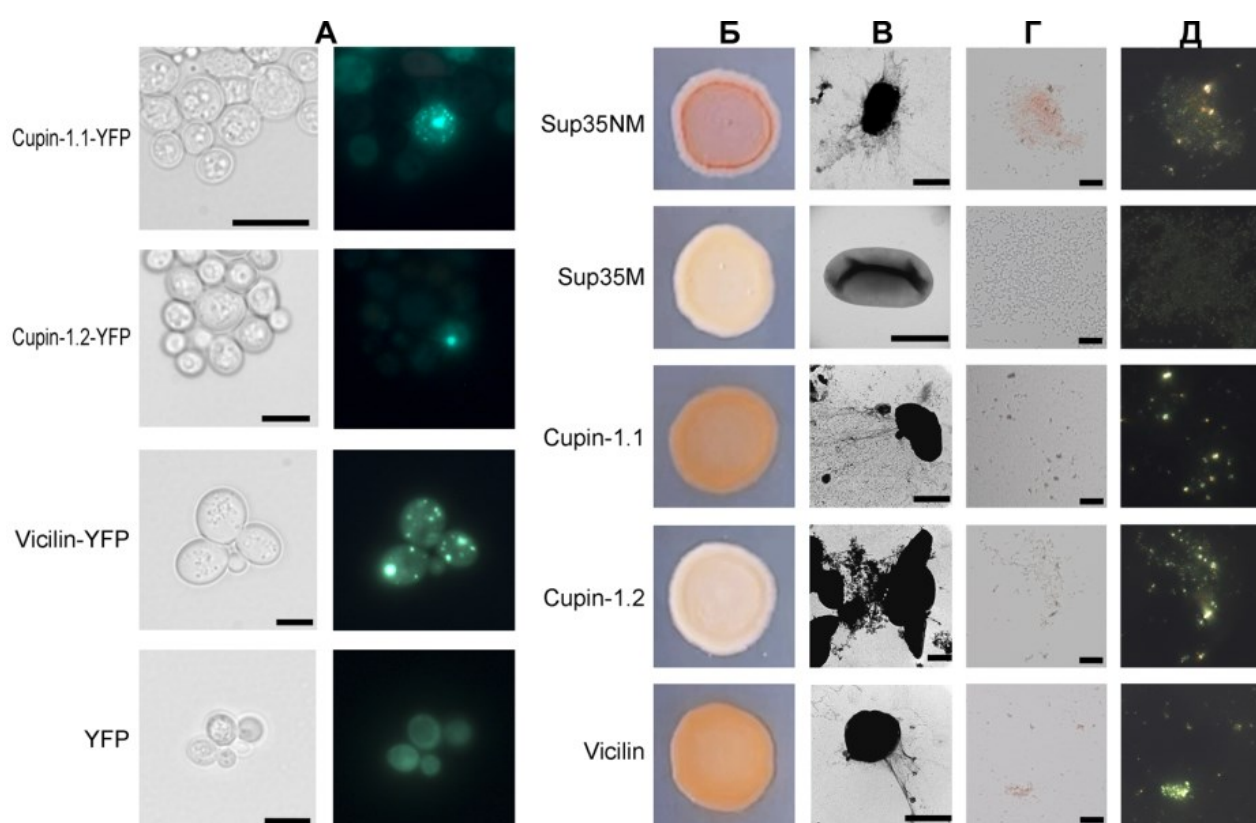


Рисунок 5. Амилоидные свойства вицилина и его доменов Cupin-1.1 и Cupin-1.2 в гетерологичных системах. **А.** Вицилин и его домены, слитые с YFP, формируют агрегаты при сверхпродукции в клетках дрожжей *S. cerevisiae*. Фотографии клеток в проходящем (левый столбец) и флуоресцентном (правый столбец) свете. Масштабные линейки равны 5 мкм. **Б.** Фотографии

колоний бактерий, секретирующих на поверхность соответствующие белки, на чашке Петри с добавлением КК. Колонии, секретирующие белки Sup35NM (амилоидный) и Sup35M (растворимый), были использованы в качестве позитивного и негативного контроля, соответственно. **В.** ТЭМ клеток *E. coli*, секретирующих соответствующие белки. Масштабные линейки равны 500 нм (все фотографии, кроме Cupin-1.2, где масштабная линейка равна 1 мкм). **Г-Д.** Секреция фибрилл вицилина и обоих его доменов на поверхность клеток *E. coli* вызывает двойное лучепреломление в поляризованном свете, при окрашивании КК. Показаны фотографии колоний *E. coli*, продуцирующих соответствующие белки, взятых с чашки с КК, в проходящем (**Г**) и поляризованном (**Д**) свете. Масштабные линейки равны 20 мкм [Antonets *et al.*, 2020].

Далее мы провели исследование амилоидных свойства вицилина *in vivo*. На первом этапе этой работы мы выполнили анализ колокализации амилоид-специфичного красителя ТфТ с сигналом антител против вицилина на криосрезах семядолей гороха при помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Полученные данные показали практически полную колокализацию сигналов вицилина и ТфТ (Рисунок 6А), что свидетельствовало в пользу того, что вицилин, являющийся одним из наиболее высоко продуцируемых белков [Malovichko *et al.*, 2020], может находиться в семенах в амилоидной форме [Antonets *et al.*, 2020].

Поскольку по литературным данным вицилин накапливается в семенах во внутриклеточных мембранных компартментах, называемых белковыми тельцами [Chrispeels, Higgins, Spencer, 1982], мы выделили эти белковые тельца при помощи ранее предложенного подхода, включающего ультрацентрифугирование лизатов семян в градиенте сахарозы. Мы исследовали содержание и детергент-устойчивость вицилина в лизатах выделенных белковых телец.

Полученные данные показали, что вицилин является белком, наиболее представленным в составе белковых телец (Рисунок 6Б), причем в этих тельцах он находится в виде детергент-устойчивых агрегатов (Рисунок 6Б).

Мы провели окрашивание выделенных белковых телец КК. Полученные данные показали, что белковые тельца связывают КК и демонстрируют свечение в поляризованном свете (Рисунок 6В), что свидетельствовало в пользу наличия в них белковых агрегатов, имеющих амилоидную структуру. Более детальный анализ был проведен с помощью иммуноэлектронной микроскопии. Было установлено, что интактные белковые тельца (Рисунок 6Г) слабо связывают меченные коллоидным золотом антитела против вицилина (Рисунок 6Д), что, вероятно, связано с наличием у них мембраны [Chrispeels, Higgins, Spencer, 1982]. После удаления мембраны при помощи обработки неионными детергентами аффинность антител к содержимому белковых телец существенно возрастала (Рисунок 6Е), а дополнительная легкая обработка ультразвуком приводила к высвобождению фибриллярных белковых агрегатов, которые связывали антитела против вицилина (Рисунок 6Ж-З). Таким образом, вицилин образует амилоиды как *in vitro*, так и *in vivo* [Antonets *et al.*, 2020].

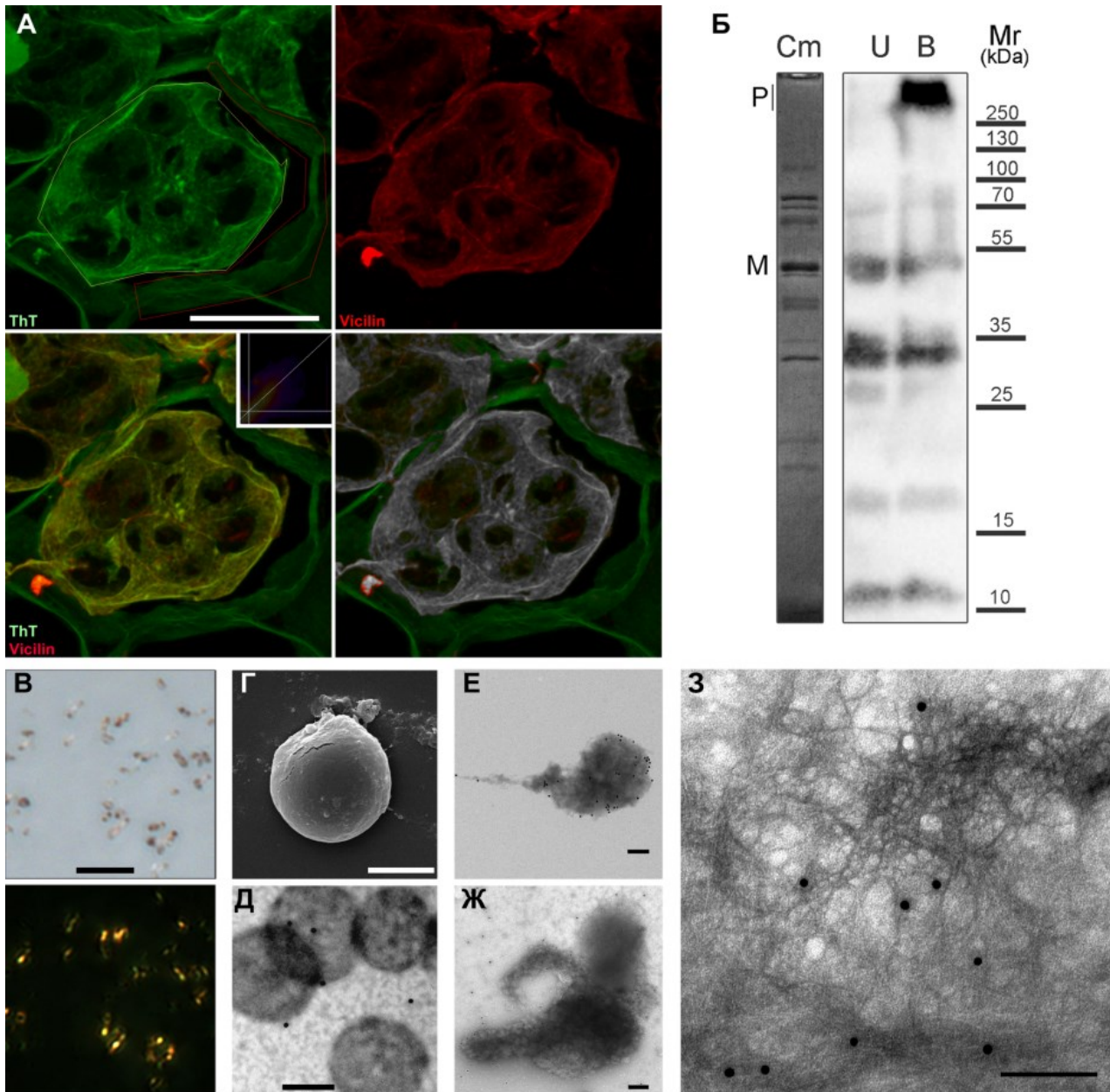


Рисунок 6. Амилоидные свойства вицилина *in vivo*. **А.** Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия криосрезов семядолей гороха *P. sativum* L., окрашенных амилоид-специфичным красителем ТфТ (ThT, зеленый) и гибридованных с поликлональными антителами кролика против вицилина гороха и вторичными антителами козы против антител кролика, конъюгированными с красителем Alexa Fluor 568 (красный). Слева внизу показано наложение сигналов антител против вицилина и ТфТ, справа внизу – колокализация сигналов (колокализирующиеся пиксели отмечены серым), на врезке – корреляционная диаграмма каналов. **Б.** Содержание вицилина и его детергент-устойчивость в белковых тельцах, выделенных из семян гороха. Cm – гель SDS-PAGE с лизатом белковых телец, кипяченым в буфере с 2% ДСН. U и B – вестерн-блот гибридикация тех же лизатов, обработанных 0,5%

Tween-20 и 2% ДСН, кипяченных (В) или некипяченных (U). **В.** Окрашивание белковых телец, выделенных из семян гороха, красителем КК. Верхняя фотография – проходящий свет, нижняя – поляризованный. Масштабная линейка равна 20 мкм. **Г.** Сканирующая электронная микроскопия белкового тельца. Масштабная линейка равна 2 мкм. **Д-З.** Трансмиссионная иммуноэлектронная микроскопия белковых телец, гибридованных с поликлональными антителами против вицилина и вторичными антителами, мечеными частицами золота. **Д.** Интактные тельца. **Е.** Тельца обработаны Tween-20. **Ж-З.** Тельца обработаны Tween-20 и ультразвуком. Масштабные линейки равны 200 нм [Antonets *et al.*, 2020].

Далее мы изучили некоторые физиологические особенности амилоидных агрегатов вицилина, образующихся в семенах *in vivo*. При помощи вестерн-блот гибридации с поликлональными антителами против вицилина нами было установлено, что агрегаты этого белка накапливаются по мере созревания (мы исследовали белковые лизаты семян на 10-й, 20-й и 30-й день после опыления), достигая максимума в зрелых семенах (примерно за 30 дней после опыления) (Рисунок 7А), а затем достаточно быстро исчезают при прорастании семян (на 3-й день). При этом по мере созревания и в проростках наблюдается отсутствие мономерного белка, что свидетельствует в пользу его включения в состав амилоидных агрегатов, а также, вероятно, участия протеаз в разборке агрегатов запасных белков при прорастании зародыша (Рисунок 7А). Можно было бы предположить, что агрегаты запасных белков при прорастании зародыша разбираются шаперонами, но тогда мы бы ожидали увидеть значительное количество мономерного белка в пробах прорастающих семян, что не наблюдается (Рисунок 7А). Анализ семян консервированного пищевого гороха показал, что в них содержится

значительное количество детергент-устойчивых агрегатов вицилина (Рисунок 7А).

Мы использовали методику IVPD, в ходе которой исследуемые белковые пробы последовательно обрабатывают протеазами (пепсином и панкреатином) в концентрациях и с продолжительностью соответствующей условиям желудочно-кишечного тракта [Rubio *et al.*, 2014]. Полученные данные показали, что амилоиды вицилина выдерживают такую обработку, в то время как мономерный белок практически полностью деградирует (Рисунок 7Б). Мы также сравнили токсичность фибрилл и нефибриллярного вицилина в дрожжевой культуре (Рисунок 7В-Г). Результаты этого эксперимента установили, что именно фибриллярное, амилоидное состояние вицилина и обоих его доменов C_{prp}-1 демонстрируют высокую токсичность для клеток дрожжей, в то время как неупорядоченные агрегаты, или фибриллы, разрушенные ультразвуком (Рисунок 7Г), вызывают значительно более слабый токсический эффект (Рисунок 7В). Сходные результаты были получены нами и на культуре клеток аденокарциномы кишечника человека [Antonets *et al.*, 2020].

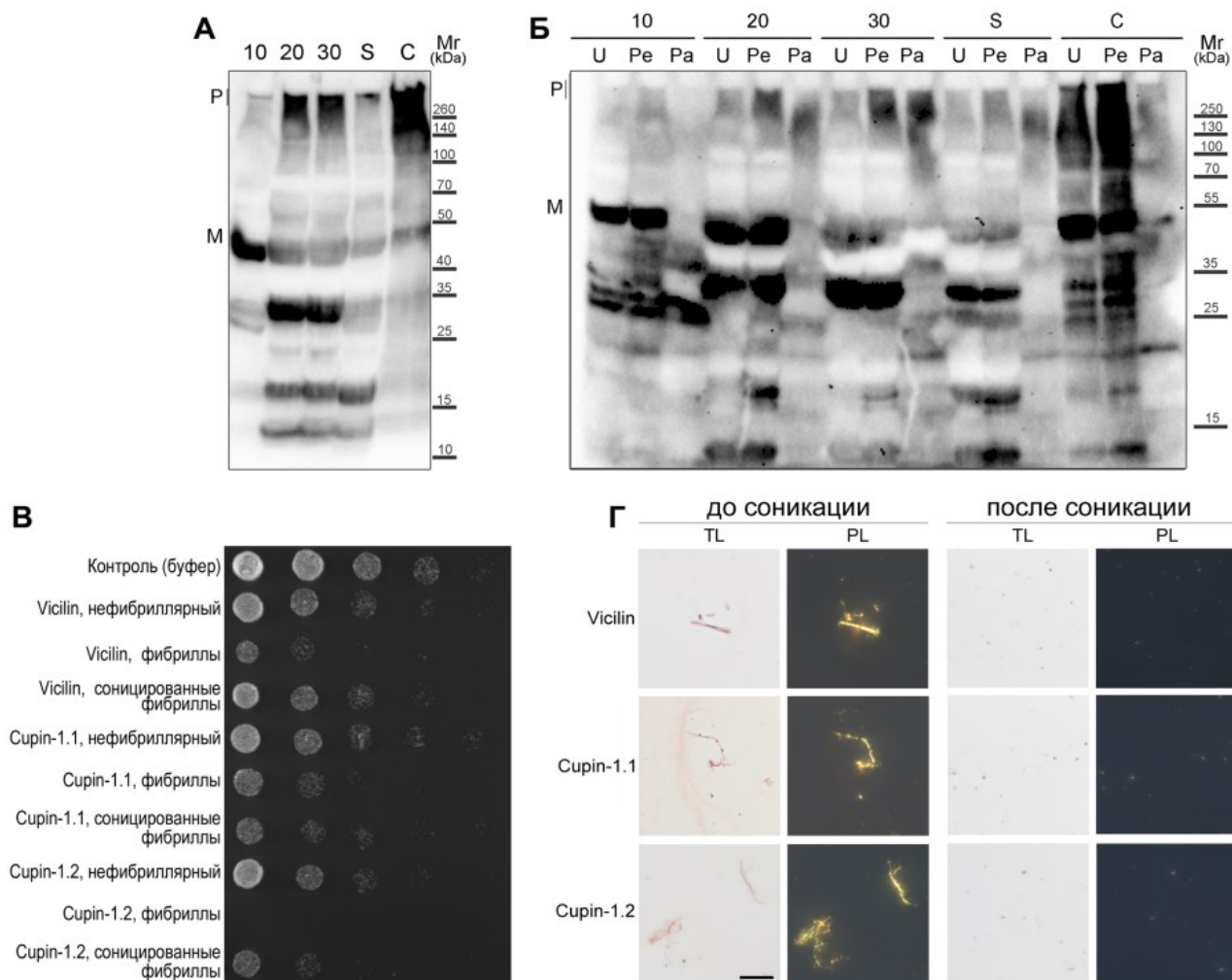


Рисунок 7. Динамика амилоидогенеза вицилина в ходе формирования семян и токсичность его амилоидов. **А.** Изучение детергент-устойчивости агрегатов вицилина, выделенных из семян гороха на 10-й, 20-й и 30-й день после опыления, проростков (S) и коммерческих консервированных семян (C) при помощи вестерн-блот гибридизации с поликлональными антителами против вицилина. **Б.** Исследование протеазоустойчивости амилоидов вицилина в семенах гороха при помощи методики IVPD [Rubio *et al.*, 2014] с последующей вестерн-блот гибридизацией с поликлональными антителами против вицилина. U – пробы не обработаны протеазами; Pe – обработаны пепсином; Pa – обработаны пепсином и затем панкреатином; P – полимеры; M – мономеры. Все пробы на рисунках **А** и **Б** перед нанесением на гель были вскипачены в буфере с 2% ДСН в течение 5 мин. Маркер молекулярной массы (Mr) указан в килодальтонах (kDa). **В.** Анализ токсичности вицилина и его доменов для дрожжей *S. cerevisiae*. Показана серия десятикратных разведений высевной на чашку Петри жидкой дрожжевой культуры, инкубированной в течение 48 ч. с фибриллами, нефибриллярными агрегатами или фибриллами, разрушенными ультразвуком

(соницированными) соответствующих белков в концентрации 1 мг/мл. Г. Действие соникации (40 с, 60% мощности, соникатор Q125 (Qsonica, США)) на фибриллы вицилина и его доменов, окрашенные КК. TL – проходящий свет; PL – поляризованный свет. Масштабная линейка равна 20 мкм [Antonets et al., 2020].

На основании полученных нами результатов можно заключить, что запасной белок вицилин накапливается в семенах в виде амилоидных агрегатов. Вероятно, образование такой амилоидной структуры связано с необходимостью стабилизировать белковый запас семян на продолжительное время и предохранить его от деградации до прорастания зародыша. Амилоиды вицилина токсичны для клеток грибов и млекопитающих, выдерживают обработку протеазами желудочно-кишечного тракта и присутствуют в консервированных семенах гороха. Представляется чрезвычайно маловероятным, чтобы амилоиды, содержащиеся в семенах, были токсичны для человека при употреблении в пищу, так как концентрации их значительно ниже, чем в использованных нами для экспериментов по токсичности условиях *in vitro*, однако потенциально они могут служить источником сильных пищевых аллергий. Необходимо отметить, что вицилин (прежде всего, арахиса), – один из наиболее сильных аллергенов в пище растительного происхождения [Akkerdaas et al., 2018; Sanchez-Monge et al., 2004]. В этой связи, обнаруженный нами эффект быстрой, вероятно протеолитической, деградации амилоидов вицилина при прорастании семян позволяет полагать обоснованной сложившуюся много веков назад традицию замачивать семена бобовых перед употреблением в пищу, что может

существенно уменьшить количество запасных белков, находящихся в них в амилоидной форме. Пророщенные семена также будут отличаться сниженным количеством белков в амилоидной форме.

Необходимо также отметить, что купиновые белки и, в частности, вицилины [Sales *et al.*, 2000], являются полифункциональными и, кроме участия в формировании резервуара питательных веществ, выполняют также функцию защиты растения от патогенов за счет своей лектиновой активности [Gomes *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 2003]. С учетом обнаруженной токсичности фибрилл для грибов [Antonets *et al.*, 2020], амилоидогенез запасных белков кроме собственно запасательной функции может потенциально опосредовать защиту семян (и, возможно, других органов) растений от патогенов.

В целом, с учетом полученных нами результатов биоинформатического скрининга [Antonets, Nizhnikov, 2017a], подтвержденных экспериментальными данными [Antonets *et al.*, 2020], и можно предполагать, что функциональный амилоидогенез запасных белков семян является консервативной особенностью не только бобовых, но и, в целом, наземных растений.

ГЛАВА II. Амилоидогенез и надорганизменные взаимодействия

Взаимодействие растений с микроорганизмами является одним из ключевых биотических факторов, имеющих как благоприятные для растений эффекты, такие как стимуляция роста за счет оптимизации питания, так и способные вызвать болезни и даже гибель растения-хозяина [Imam, Singh, Shukla, 2016]. Роль амилоидогенеза в симбиотических надорганизменных взаимодействиях к началу наших работ описана не была, однако было накоплено весьма значительное количество данных о вовлеченности амилоидов бактерий в надорганизменные взаимодействия «патоген-хозяин» [Kosolapova *et al.*, 2020], прежде всего, взаимодействия бактерий с животными (амилоидные биопленки и токсины бактерий) [Schwartz, Boles, 2013a; Gerven Van *et al.*, 2018], а также и с растениями (амилоидные токсины бактерий гарпины, которые индуцируют у растений ответ сверхчувствительности) [Oh *et al.*, 2007].

На начальном этапе работы мы решили проанализировать, какие функциональные группы белков и белковые домены в протеомах бактерий обогащены потенциально амилоидогенными участками. Для этого был проведен биоинформатический скрининг протеомов более 80 видов альфапротеобактерий порядка *Rhizobiales*, к которому относятся как азотфиксирующие симбиотические клубеньковые бактерии, так и патогены растений и животных [Carvalho *et al.*, 2010]. Анализ биологических функций, выполняемых

потенциально амилоидогенными белками, предсказанными SARP [Antonets, Nizhnikov, 2013], показал, что чаще всего они связаны с вирулентностью, включая биосинтез липополисахаридов и формирование жгутика [Antonets, Kliver, Nizhnikov, 2018]. Алгоритм Waltz [Maurer-Stroh *et al.*, 2010] предсказал в качестве наиболее амилоидогенных белки, отвечающие за трансмембранный транспорт, что также является ключевым компонентом систем вирулентности [Antonets, Kliver, Nizhnikov, 2018].

Детальный анализ белковых доменов, содержащих потенциально амилоидогенные участки, в протеомах бактерий порядка *Rhizobiales* показал [Antonets, Kliver, Nizhnikov, 2018], что к наиболее обогащенным QN-богатыми участкам, предсказанным алгоритмом SARP, относились домены семейства LptD (Рисунок 8), представляющие собой трансмембранные β -баррели наружной мембраны, осуществляющие транспорт липополисахаридов и играющие ключевую роль в контроле надорганизменных взаимодействий как типа «патоген-хозяин», так и «симбионт-хозяин» [Jones *et al.*, 2007; Zha *et al.*, 2016].

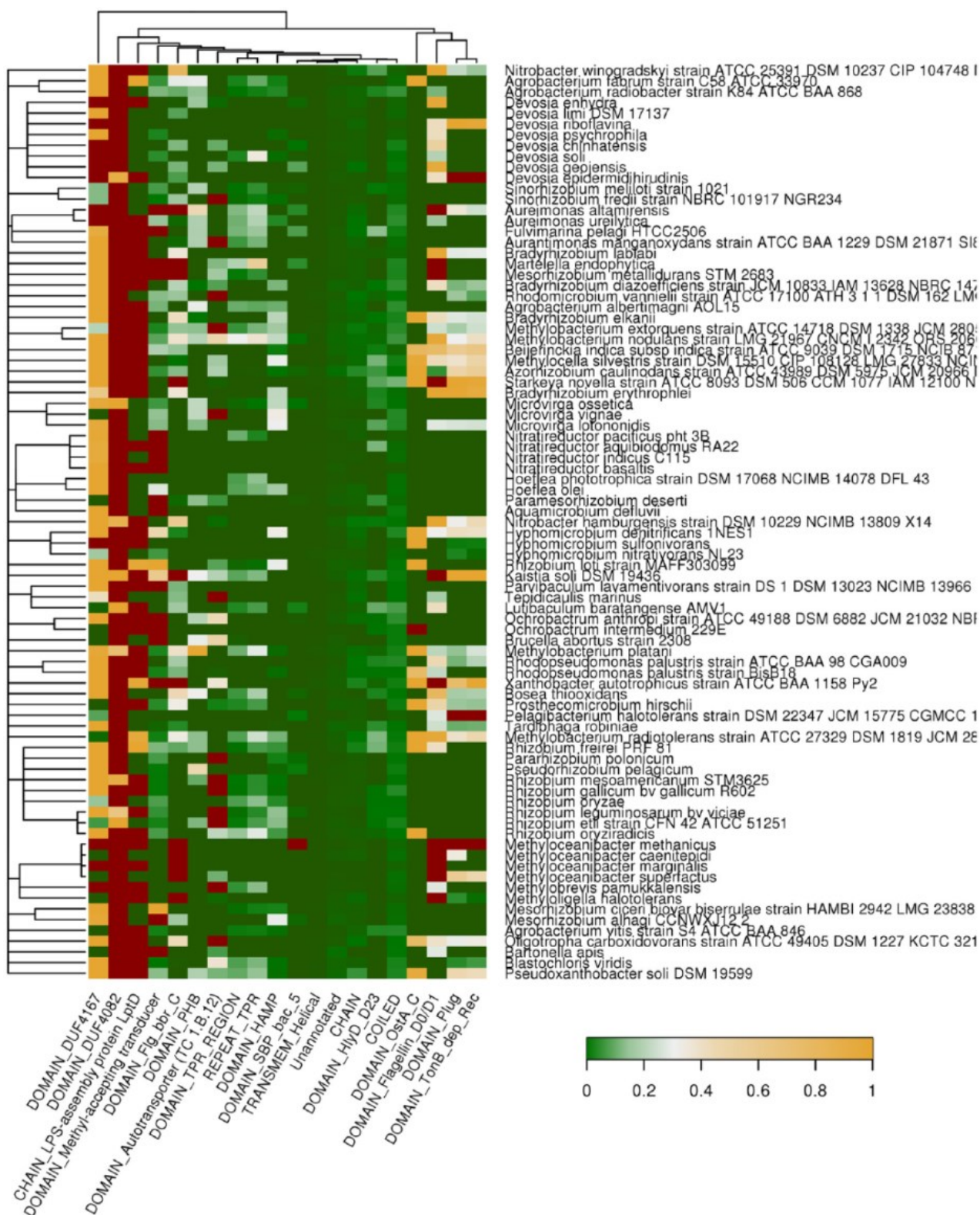


Рисунок 8. Белковые домены, ассоциированные с QN-богатыми потенциально амилоидогенными участками в протеомах бактерий порядка *Rhizobiales*. Амилоидогенные участки пресказаны алгоритмом SARP. Цвет ячейки соответствует доле, занимаемой QN-обогащенными участками в общей длине соответствующих доменов во всех проанализированных протеомах. Темно-красный цвет означает отсутствие данной группы доменов у соответствующего вида. Древо видов соответствует их филогенетическому положению [Antonets, Kliver, Nizhnikov, 2018].

В качестве белков, наиболее обогащенных амилоидогенными участками, ассоциированных с патогенезом, были выявлены YadA-подобные, RTX-токсин-подобные и гемолизин-подобные белки [Antonets, Kliver, Nizhnikov, 2018]. Все они вовлечены в контроль вирулентности, образуют трансмембранные β -баррель-подобные структуры или обогащены регулярно-повторяющимися β -слоями [Hafeez *et al.*, 2005; Hoiczuk, 2000; Linhartová *et al.*, 2010; Tahir El, Skurnik, 2001]. Таким образом, полученные нами в масштабном биоинформатическом скрининге данные показали, что у бактерий порядка *Rhizobiales* наиболее вероятными кандидатами на роль новых амилоидов могут являться вовлеченные в контроль вирулентности трансмембранные белки, образующие структуры типа « β -баррель».

Для проверки этой гипотезы мы провели экспериментальный протеомный скрининг у клубеньковой бактерии *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, способной вступать в симбиоз с посевным горохом *P. sativum* L. и фиксировать атмосферный азот в его корневых клубеньках [Tsyganov *et al.*, 2003]. В результате скрининга в протеоме свободноживущей культуры *R. leguminosarum* bv. *viciae* было идентифицировано 54 белка, образующих детергент-устойчивые агрегаты [Kosolapova *et al.*, 2019]. Большинство из них было представлено ферментами, однако около 1/5 составляли мембранные белки. Многие из таких белков склонны к формированию структур типа « β -баррель» и ассоциированы с вирулентностью бактерий [Rollauer *et al.*, 2015]. Для анализа амилоидных свойств мы выбрали

два белка наружной мембраны: RopA, который был идентифицирован с максимальным масс-спектрометрическим счетом, и RopB. Оба этих белка, согласно биоинформатическим предсказаниям, имели структуру β -баррель (Рисунок 9) [Kosolapova *et al.*, 2019].

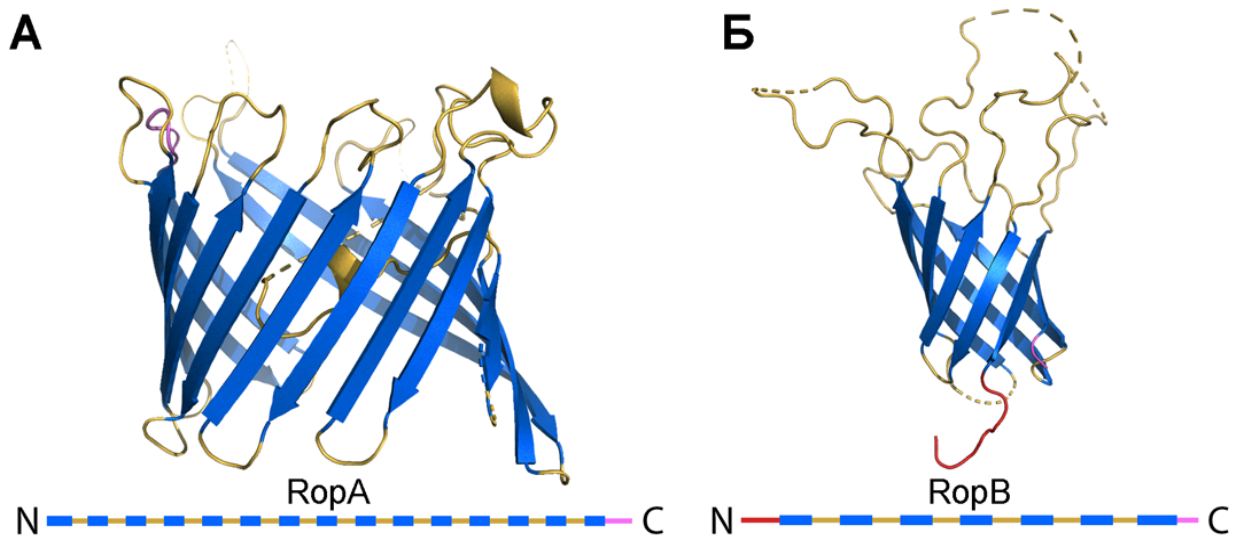


Рисунок 9. А. и Б. Структуры белков RopA и RopB, соответственно, предсказанные при помощи сервера I-TASSER [Yang, Zhang, 2015]. Элементы вторичной структуры белков представлены в линейной последовательности под пространственными моделями. Синие прямоугольники обозначают β -слои; желтые – петли; красные и пурпурные – N-терминальный и C-терминальный концы белков, соответственно [Kosolapova *et al.*, 2019].

Рекомбинантные белки RopA и RopB, слитые с последовательностью из шести гистидинов (6H) на С-терминальном конце, были наработаны в клетках *E. coli*, очищены и подвергнуты фибриллогенезу в буфере с pH=2,0. Полученные данные показали, что полноразмерные RopA и RopB формируют слабо разветвленные фибриллы, легко визуализируемые при помощи трансмиссионной электронной микроскопии (Рисунок 10А) [Kosolarova *et al.*, 2019]. Было установлено, что эти фибриллы связывают КК и демонстрируют двойное лучепреломление яблочно-зеленого цвета в поляризованном свете (Рисунок 10Б), а также обладают устойчивостью к обработке ионными детергентами и протеазами (Рисунок 10В-Г), демонстрируя, таким образом, ключевые свойства амилоидов *in vitro* [Kosolarova *et al.*, 2019].

Далее мы провели анализ способности полноразмерных белков RopA и RopB формировать амилоиды в системе для секреции белков на поверхность клеток *E. coli* C-DAG [Sivanathan, Hochschild, 2013]. Полученные в этой системе данные также подтвердили амилоидогенные свойства RopA и RopB: клетки *E. coli*, секретирующие RopA и RopB, формировали хорошо различимые фибриллы (Рисунок 11Г), связывали КК (Рисунок 11А-Б) и демонстрировали двойное лучепреломление зеленого цвета (Рисунок 11В) [Kosolarova *et al.*, 2019].

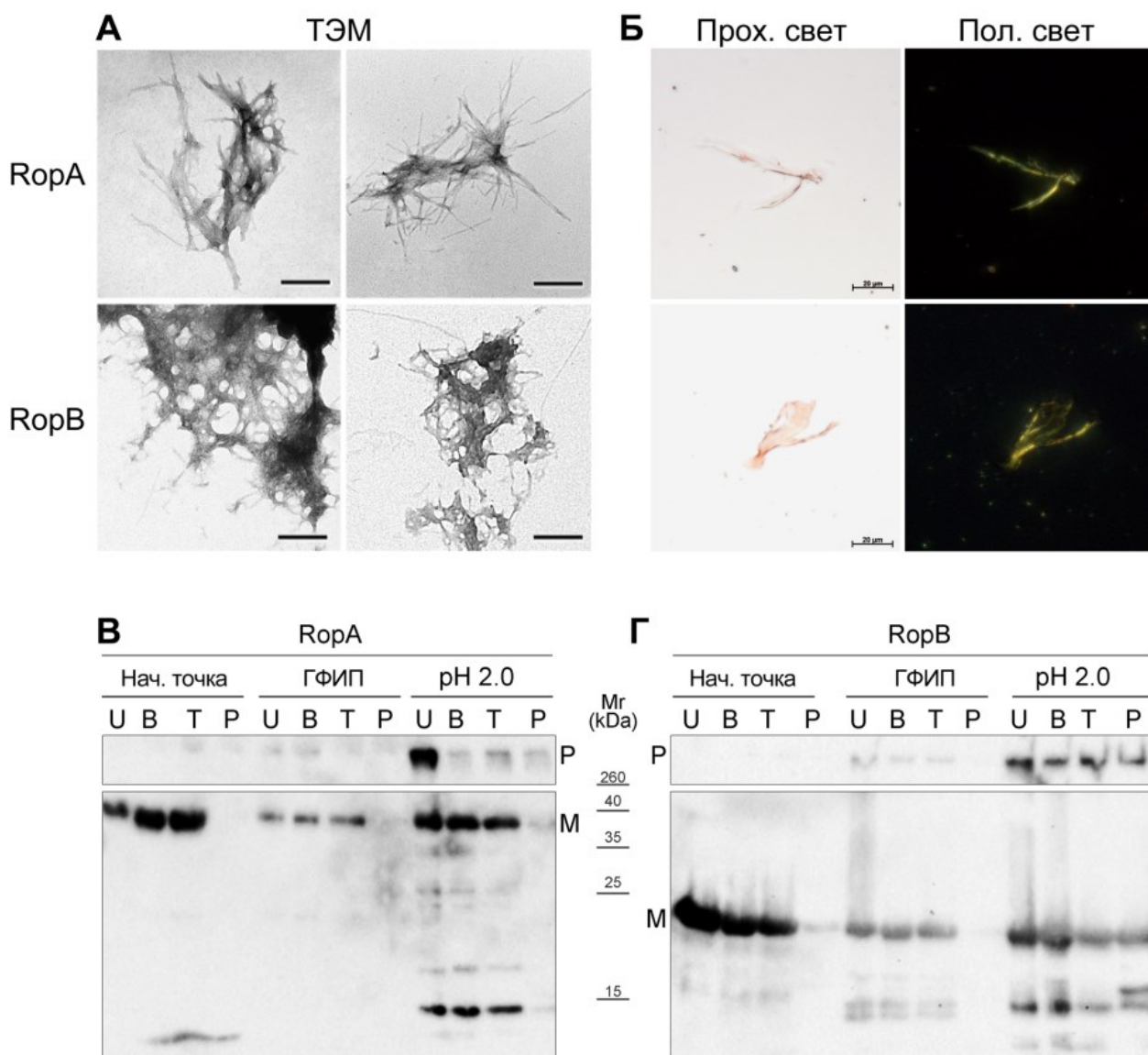


Рисунок 10. Амилоидные свойства фибрилл RopA и RopB, полученных *in vitro*. **А.** ТЭМ фибрилл RopA и RopB, полученных в буфере с pH=2,0. Масштабные линейки равно 200 нм. **Б.** Окрашивание фибрилл RopA и RopB красителем КК. Слева – проходящий свет, справа – поляризованный. Верхний ряд – RopA, нижний – RopB. Масштабные линейки равны 20 мкм. **В.** и **Г.** Анализ устойчивости агрегатов RopA и RopB, соответственно, к обработке ионными детергентами и протеазами при помощи вестерн-блот гибридизации с антителами против последовательности 6Н. Начальная точка – неструктурированные агрегаты; ГФИП и pH 2,0 – фибриллы, полученные в соответствующих буферах. P – полимеры; M – мономеры; U – некипяченые образцы, обработанные 2% ДСН; B – образцы обработаны 2% ДСН и подвергнуты кипячению; T – обработаны трипсином; P – обработаны панкреатином. Mr – маркер молекулярной массы в килодальтонах (kDa) [Kosolapova *et al.*, 2019].

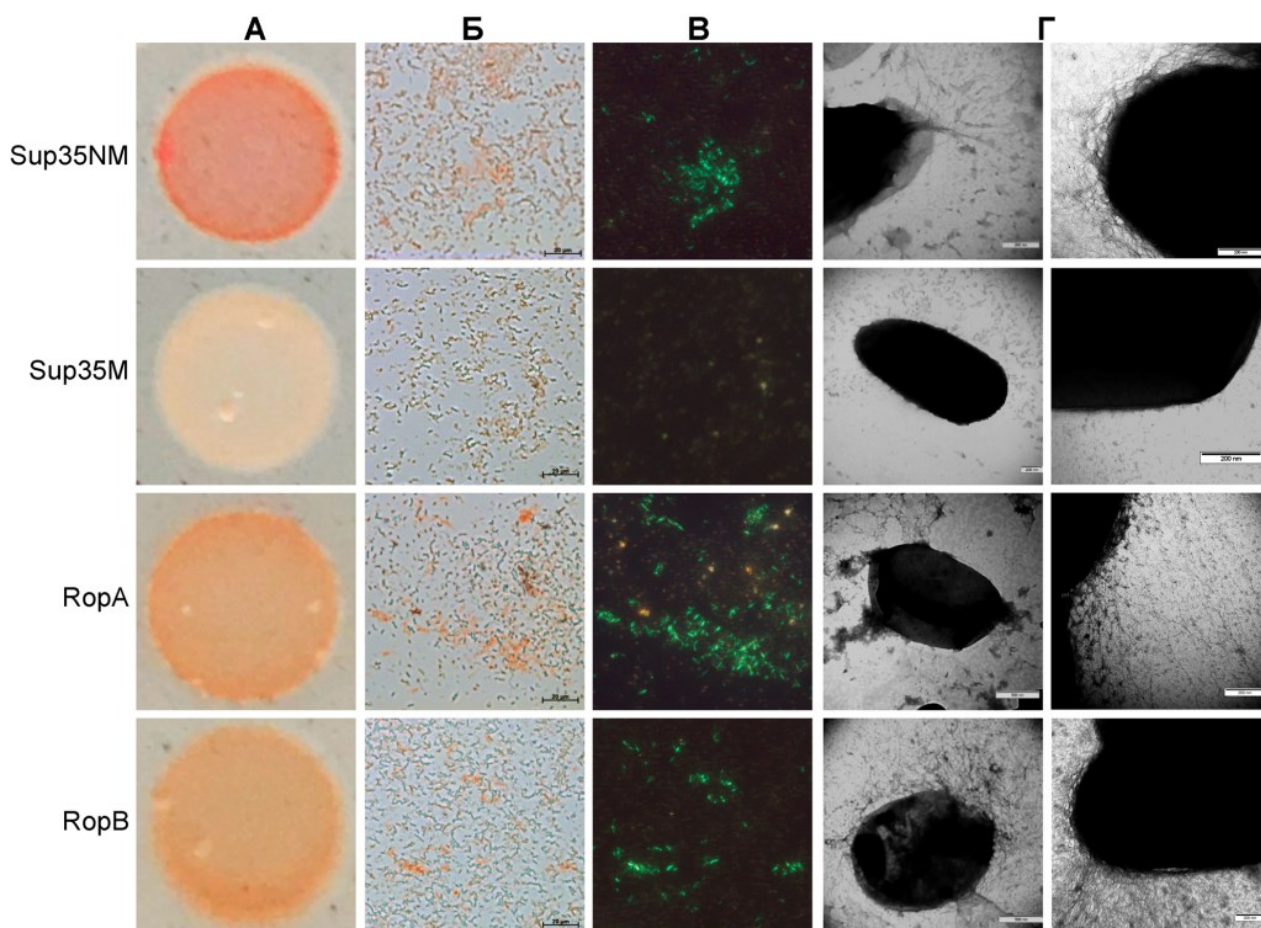


Рисунок 11. Изучение амилоиных свойств RopA и RopB при секреции на поверхность клеток *E. coli* в системе C-DAG [Sivanathan, Hochschild, 2013]. **А.** Колонии *E. coli*, секретирующие соответствующие белки на чашках Петри с добавлением КК. Клетки *E. coli*, секретирующие соответствующие белки, окрашенные КК, в проходящем (**Б.**) и поляризованном (**В.**) свете. Масштабные линейки равны 20 мкм. **Г.** ТЭМ клеток *E. coli*, секретирующих указанные белки. На всех частях рисунка клетки, секретирующие амилоидный белок Sup35NM были использованы в качестве положительного контроля, а растворимый Sup35M – в качестве отрицательного [Kosolapova *et al.*, 2019].

Чтобы окончательно проверить амилоидные свойства RopA и RopB, мы проанализировали их *in vivo* у бактерии *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Полученные данные показали, что оба белка формируют *in vivo* детергент-устойчивые полимеры (Рисунок 12А и Б), причем количество полимеров RopA возрастает при стимуляции клеток флавоноидом лютеолином (Рисунок 12Б) [Kosolapova *et al.*, 2019], который индуцирует начальные стадии формирования растительно-микробного симбиоза [Tolin *et al.*, 2013; Zaat *et al.*, 1987]. При помощи иммуноэлектронной микроскопии с антителами против RopA и RopB и вторичными антителами, конъюгированными с коллоидным золотом, было показано, что RopA и RopB формируют фибриллы в экстраклеточной капсуле *R. leguminosarum* (Рисунок 12Г-Ж), которая связывает КК и демонстрирует двойное лучепреломление зеленого цвета (Рисунок 12В). Таким образом, нами установлено, что белки RopA и RopB *R. leguminosarum* обладают амилоидными свойствами *in vivo* [Kosolapova *et al.*, 2019].

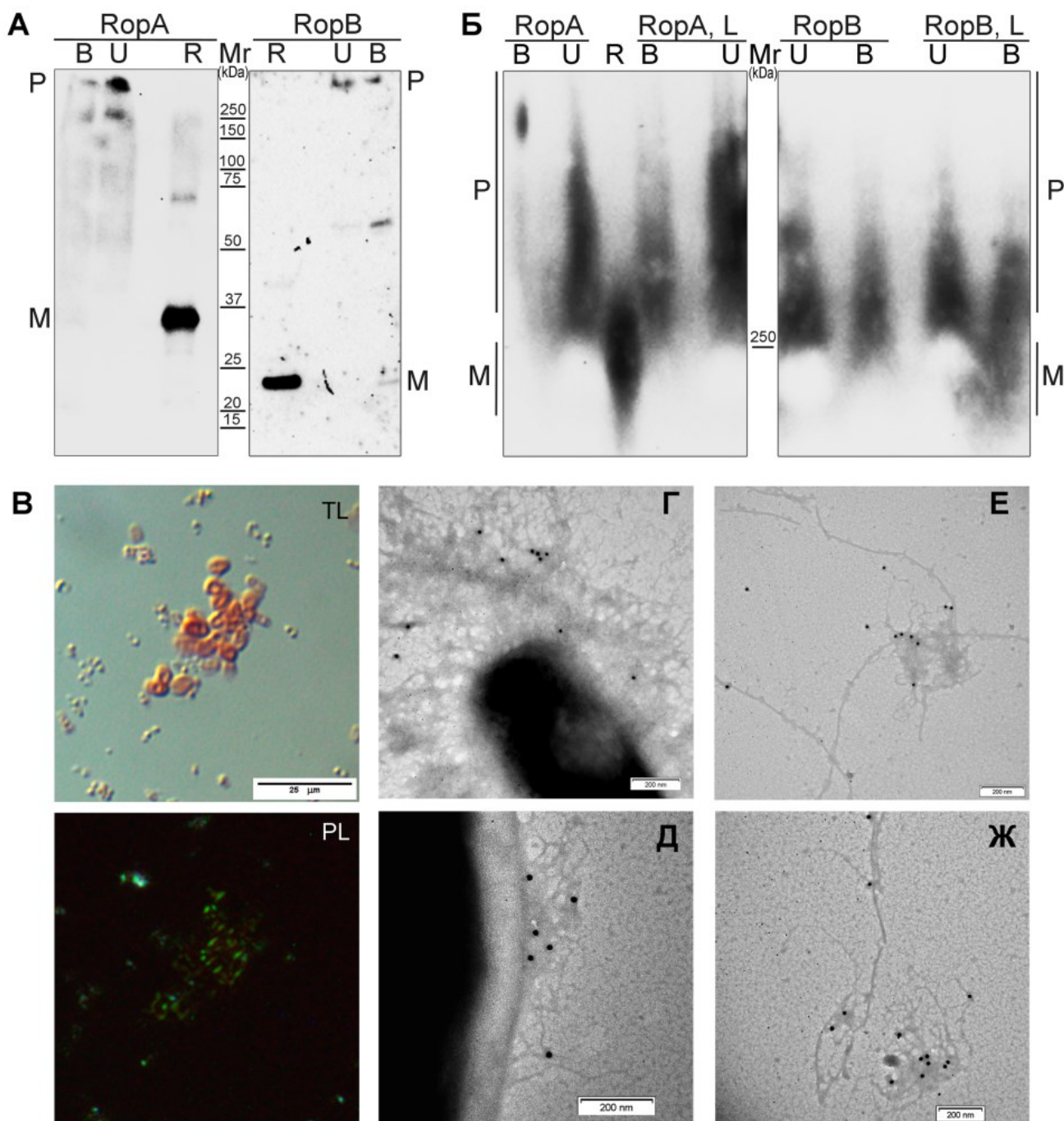


Рисунок 12. Амилоидные свойства RopA и RopB *in vivo* в клетках *R. leguminosarum*. **А-Б.** Анализ детергент-устойчивости агрегатов RopA и RopB в белковых лизатах, выделенных из клеток *R. leguminosarum* при помощи SDS-PAGE (**А.**) или SDD-AGE (**Б.**) с последующей вестерн-блот гибридизацией с поликлональными антителами, специфичными против данных белков. U – некипяченые образцы, обработанные 2% ДСН; В – образцы, обработанные 2% ДСН и подвергнутые кипячению; L – клетки *R. leguminosarum* были подвергнуты действию флавоноида лютеолина; R – пробы с контрольными рекомбинантными белками RopA или RopB. Маркер молекулярной массы (Mr) указан в килодальтонах (kDa). **В.** Колонии *R. leguminosarum*, растущие на твердой среде в течение семи суток, окрашенные КК,

в проходящем (TL) и поляризованном (PL) свете. Масштабные линейки равны 20 мкм. **Г-Ж.** Иммуноэлектронная микроскопия клеток и экстраклеточного материала *R. leguminosarum*, гибридного с поликлональными антителами против RopA (**Г** и **Е**) или RopB (**Д** и **Ж**) и вторичными антителами, конъюгированными с коллоидным золотом. Масштабные линейки показаны на изображениях [Kosolapova *et al.*, 2019].

Белки RopA и RopB *R. leguminosarum* являются первыми идентифицированными у симбиотических бактерий амилоидами. В то время как роль амилоидогенеза во взаимодействиях «патоген-хозяин» хорошо известна [Kosolapova *et al.*, 2020], вовлеченность амилоидов в мутуалистические взаимодействия «симбионт-хозяин» до наших работ описана не была. Известно, что экспрессия генов *ropA* и *ropB* повышается на ранних стадиях симбиоза [Tolin *et al.*, 2013] и затем снижается при образовании азот-фиксирующих бактериоидов в клубеньках растений [Maagd de *et al.*, 1994; Roest *et al.*, 1995], что свидетельствует в пользу действия RopA и RopB в качестве факторов вирулентности. Наши данные не только показали, что эти белки формируют амилоиды *in vivo*, но и выявили увеличение количества амилоидов RopA в условиях, сходных с начальными стадиями симбиоза [Kosolapova *et al.*, 2019]. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют в пользу вовлеченности амилоидогенеза в формирование надорганизменных взаимодействий типа «симбионт-хозяин».

Можно предложить несколько возможных ролей амилоидов клубеньковых бактерий в таких взаимодействиях. С одной стороны, нельзя исключать их действие в качестве адгезинов, обеспечивающих

прикрепление бактериальных клеток к растениям на начальных этапах образования симбиоза, подобно тому, как действуют амилоиды некоторых патогенных для многоклеточных хозяев бактерий [Shanmugam *et al.*, 2019]. Нельзя также исключать наличия механической функции у амилоидов клубеньковых бактерий. Так, известно, что в формировании так называемых инфекционных нитей, то есть структур, по которым бактерии передвигаются до клубенькового примордия, а также в высвобождении бактериальных клеток в цитоплазму растительных клеток при образовании клубенька, участвует тубулиновый цитоскелет [Kitaeva *et al.*, 2016]. С учетом некоторого сходства свойств амилоидных фибрилл и полимеров белков цитоскелета, можно предположить, что секретлируемые бактериями амилоиды могли бы также опосредовать формирование инфекционных нитей и перемещение бактериальных клеток по ним.

Наконец, третьей возможной гипотезой является участие амилоидных белков клубеньковых бактерий в передаче сигналов. Некоторые амилоиды грибов, такие как [Het-s] *Podospora anserina* [Coustou *et al.*, 1997], принимают участие в специфичных сигнальных взаимодействиях, опосредованных рецепторными белками NLR (nucleotide-binding, leucine-rich repeat, нуклеотид-связывающий, лейцин-богатый повтор), связанных с контролем многоклеточности, защитой от патогенов и программированной клеточной гибелью [Bondarev *et al.*, 2018; Saupé, 2020]. В ходе таких взаимодействий амилоиды могут выступать в качестве матриц, вызывающих

олигомеризацию NLR, что активирует передачу соответствующих сигналов [Saure, 2020]. NLR-подобные белки есть у животных и растений, где они играют ключевую роль в активации путей ответа на действие патогенов [Maekawa, Kufer, Schulze-Lefert, 2011], а также вовлечены в контроль специфичности растительно-микробных симбиозов [Cao *et al.*, 2017]. Нельзя исключать, что бактериальные амилоиды также опосредуют конформационные переходы NLR или каких-либо других рецепторов, влияя таким образом на сигнальные пути взаимодействий клубеньковых бактерий с организмом-хозяином.

Необходимо отметить, что системы вирулентности, контролируемые у бактерий симбиотические и патогенные надорганизменные взаимодействия с хозяином, обладают значительной долей сходства, как по репертуару факторов вирулентности, так и по механизмам их действия [Soto, Sanjuán, Olivares, 2006]. В связи с этим, большой интерес представляло сравнение комплексов амилоидогенных белков в протеомах симбиотических и патогенных бактерий.

Мы провели протеомный скрининг амилоидных белков [Nizhnikov *et al.*, 2014b; Antonets *et al.*, 2016; Nizhnikov *et al.*, 2016b] в лабораторных штаммах распространенного патогена и компонента нормальной кишечной микрофлоры гаммапротеобактерии *E. coli* [Kaper, Nataro, Mobley, 2004]. В результате этого эксперимента был выявлен 61 белок, образующий детергент-устойчивые полимеры в протеоме *E. coli* [Antonets *et al.*, 2016], большая часть из которых, как и

в случае *R. leguminosarum*, была представлена ферментами, а почти четверть – мембранными белками, целый ряд из которых склонен формировать структуры типа «β-баррель» и ассоциирован с вирулентностью и патогенезом *E. coli* [Thoma *et al.*, 2018]. Например, среди идентифицированных белков были порины наружной мембраны *E. coli* OmpA, OmpC, OmpF, играющие важную роль в вирулентности и патогенезе этого микроорганизма [Hejair *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2012]. Для OmpA и OmpC в работах других исследовательских коллективов ранее была показана способность формировать фибриллы, проявляющие некоторые из свойств амилоидов [Danoff, Fleming, 2015; Joseph Sahaya Rajan *et al.*, 2016].

Мы решили проанализировать, не окажется ли среди выявленных нами детергент-устойчивых белков *E. coli* [Antonets *et al.*, 2016] представителей каких-либо функциональных групп белков, для которых амилоидогенные свойства ранее показаны не были. В качестве представителя такой ранее не изученной с позиций амилоидогенности группы белков мы выбрали муциновую металлопептидазу YghJ *E. coli*, которая является важным фактором вирулентности энтеротоксигенных штаммов этой бактерии [Kotloff *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2015]. Для проверки амилоидогенных свойств *in vitro* был использован эволюционно-консервативный домен YghJ, относящийся к семейству M60-подобных муциновых металлопептидаз [Nakjang *et al.*, 2012] и расположенный ближе к С-терминальному концу белка (Рисунок 13А) (работа с полноразмерным YghJ *in vitro* была невозможна из-за его больших размеров, более 1500 ак).

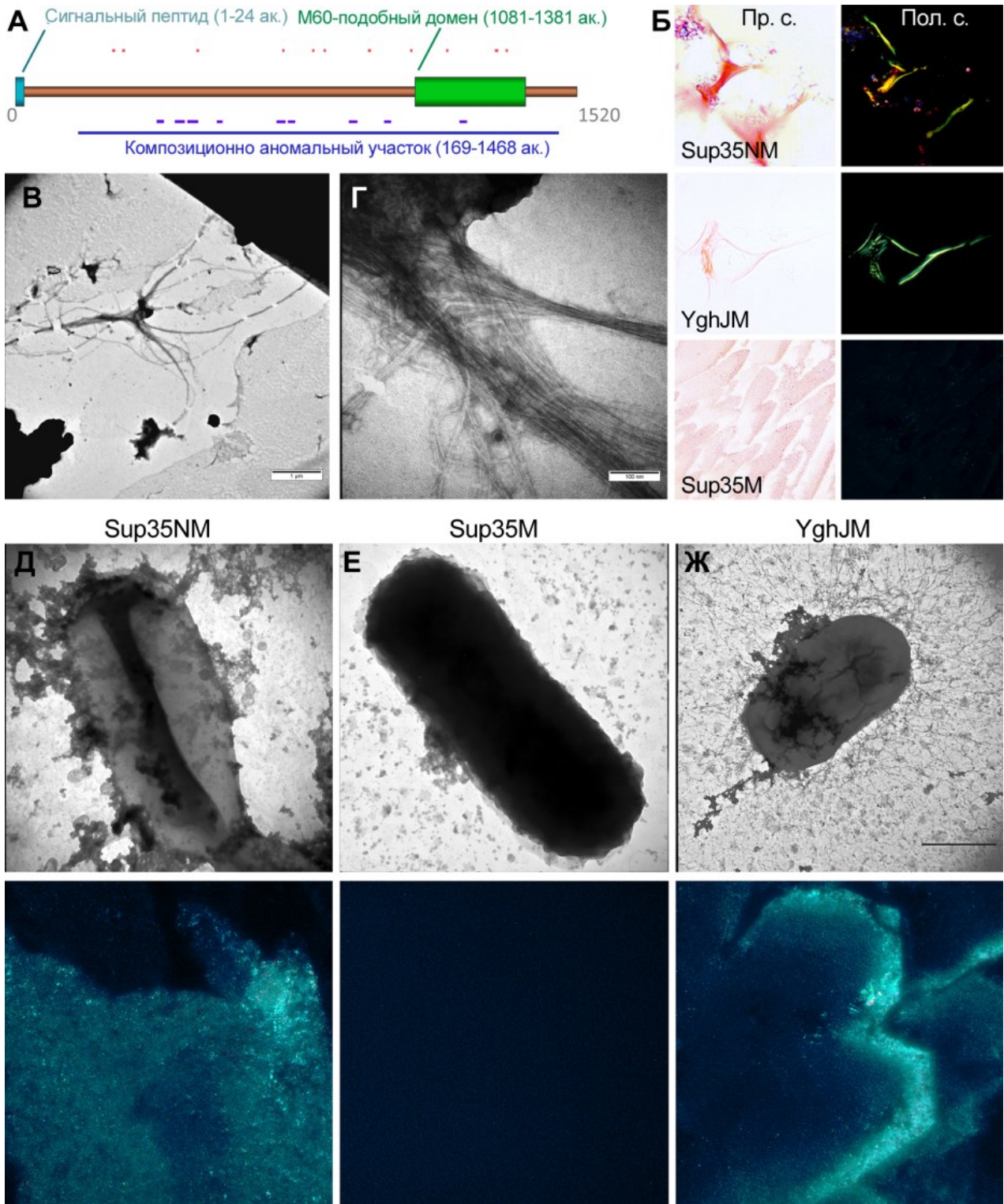


Рисунок 13. Амилоидогенные свойства М60-подобного домена металлопептидазы YghJ энтеробактерии *E. coli*. **А.** Схематическое изображение белка YghJ. Показаны сигнальный пептид (1-24 ак.) и М60-подобный домен (1081-1381 ак.) (YghJM). ПАУ, предсказанные программами WALTZ [Maurer-Stroh *et al.*, 2010] показаны красным; ArchCandy [Ahmed *et al.*, 2014] – фиолетовым; композиционно-аномальный участок, предсказанный SARP [Antonets, Nizhnikov, 2013], – синим. **Б.** Окрашивание полученных *in vitro* фибрилл YghJM красителем КК.

Левый столбец – проходящий свет; правый столбец – поляризованный свет. Амилоидные фибриллы Sup35NM и растворимый белок Sup35M использованы в качестве положительного и отрицательного контролей, соответственно. **В-Г.** Изображения ТЭМ фибрилл YghJ, полученных *in vitro*. **В.** Увеличение 20 000 раз. **Г.** Увеличение 200 000 раз. Масштабная линейка приведена на рисунке. **Д-Ж.** ТЭМ (верхний ряд) и поляризационная микроскопия клеток *E. coli*, выращенных на среде с КК (нижний ряд), секретирующих белок YghJM (**Ж**), а также контрольные амилоидный Sup35NM (**Д**) или растворимый Sup35M (**Е**) белки [Belousov *et al.*, 2018].

Проведенный нами анализ показал, что М60-подобный домен YghJ образует *in vitro* фибриллы, которые связывают КК и демонстрируют двойное лучепреломление яблочно-зеленого цвета в поляризованном свете (Рисунок 13Б), а также имеют характерную морфологию при визуализации при помощи трансмиссионной электронной микроскопии (Рисунок 13В и Г), то есть обладают ключевыми свойствами амилоидогенных белков [Belousov *et al.*, 2018]. Более того, этот домен формировал фибриллы, связывающие КК и вызывающие двойное лучепреломление в поляризованном свете при секреции на поверхность клеток *E. coli* в системе C-DAG [Sivanathan, Hochschild, 2013], то есть в условиях, приближенных к *in vivo* (Рисунок 13Д-Ж) [Belousov *et al.*, 2018]. Полученные нами данные позволяют заключить, что муциновая металлопептидаза *E. coli* YghJ образует *in vivo* детергент-устойчивые агрегаты, а ее эволюционно консервативный М60-подобный домен формирует амилоидные фибриллы *in vitro* и при секреции на поверхность клеток *E. coli*. Таким образом, муциновые металлопептидазы с М60-подобным

доменом являются новым семейством бактериальных амилоидогенных белков [Belousov *et al.*, 2018].

В целом, на основании полученных нами данных можно заключить, что детергент-устойчивые амилоидогенные белковые фракции симбиотических и патогенных протеобактерий сходны по функциональному составу белков и обогащены факторами вирулентности и белками, образующими структуры типа « β -баррель» [Antonets *et al.*, 2016; Kosolapova *et al.*, 2019]. Такие белки, примером которых являются RopA и RopB *R. leguminosarum* [Kosolapova *et al.*, 2019], являются *bona fide* амилоидами, по-видимому, вовлеченными в формирование надорганизменных систем «симбионт-хозяин» или «патоген-хозяин», в зависимости от специализации соответствующей бактерии [Kosolapova *et al.*, 2020]. Репертуар амилоидных белков прокариот, ассоциированных с вирулентностью и патогенезом, в реальности может быть значительно шире, чем считается сейчас, что показывают, в том числе, проведенные нами протеомные исследования [Antonets *et al.*, 2016; Kosolapova *et al.*, 2019] и демонстрация амилоидогенных свойств муциновой металлопептидазы YghJ *E. coli* [Belousov *et al.*, 2018].

ГЛАВА III. Прионизация белка: инактивация или изменение функции?

Несмотря на то, что амилоиды, вовлеченные в выполнение биологических функций идентифицированы у самых разнообразных групп прокариот и эукариот, открытым остается вопрос о том, как формирование амилоидных агрегатов влияет на функциональную активность соответствующего белка. Одной из наиболее удобных моделей для изучения структурных и функциональных особенностей амилоидогенеза являются инфекционные амилоиды – прионы дрожжей *S. cerevisiae* [Chernova, Wilkinson, Chernoff, 2014; Wickner *et al.*, 2015]. В настоящее время идентифицировано около десяти амилоидных дрожжевых прионов, большинство из которых имеет фенотипические проявления, сходные с делециями соответствующих структурных генов [Du *et al.*, 2008; Alberti *et al.*, 2009; Rogoza *et al.*, 2010; Patel, Gavin-Smyth, Liebman, 2009; Wickner, 1994; Wickner, Masison, Edskes, 1995]. Такой эффект, отмеченный в качестве одного из классических критериев дрожжевых прионов, предложенных Ридом Викнером в 1994 году [Wickner, 1994], объясняется тем, что в ходе прионизации обычно происходит изменение пространственной структуры белка, влекущее за собой его агрегацию и образование амилоидов, в составе которых, как предполагается, белок теряет свою активность [Ваха *et al.*, 2002; Wickner *et al.*, 2014]. В этой связи особый интерес представляют вопросы: полностью ли инактивирован белок в составе прионных агрегатов, и не приводит ли прионизация к

возникновению каких-либо новых функциональных активностей?

Для того чтобы получить ответы на эти вопросы, мы провели сравнительное исследование эффектов прионизации белка Swi1 дрожжей *S. cerevisiae* и делеции его структурного гена. Swi1 является компонентом глобального мультисубъединичного регулятора транскрипции SWI/SNF, регулирующего транскрипционную активность хроматина путем АТФ-зависимого изменения структуры нуклеосом [Dechassa *et al.*, 2008; Sudarsanam *et al.*, 2000]. Этот белок связывает активаторные элементы в промоторах сотен генов, связанных с репарацией, репликацией, метаболическими каскадами и переключением типов спаривания [Dutta *et al.*, 2014; Shivaswamy, Iyer, 2008]. Делеция *SWI1* не является летальной, однако имеет плейотропные проявления, выражающиеся в подавлении вегетативного роста, нарушении споруляции и переключения типов спаривания [Peterson, Herskowitz, 1992]. Прионизация Swi1 приводит к возникновению нехромосомного детерминанта [*SWI*⁺], который вызывает подавление роста дрожжей на средах с галактозой и некоторыми другими источниками углерода, но не глюкозой [Du *et al.*, 2008; Nizhnikov *et al.*, 2016b], а также ингибирует экспрессию гена *SUP45* [Kondrashkina *et al.*, 2014; Nizhnikov *et al.*, 2016b], кодирующего фактор терминации трансляции eRF1 [Frolova *et al.*, 1994; Zhouravleva *et al.*, 1995]. Это вызывает снижение эффективности терминации трансляции и рост штаммов [*SWI*⁺], несущих нонсенс-мутации в генах метаболизма аденина (*ade1-14_{UGA}*) и триптофана (*trp1-289_{UAG}*) на средах без добавления этих веществ (нонсенс-супрессию) [Nizhnikov *et*

al., 2014a; Nizhnikov *et al.*, 2012; Saifitdinova *et al.*, 2010] (Рисунок 14). Необходимым условием возникновения нонсенс-супрессии в присутствии [*SWI*⁺] является наличие в клетках мутантных вариантов фактора терминации трансляции eRF3 (Sup35) со сниженной функциональной активностью, действующих в качестве ко-супрессоров [Nizhnikov *et al.*, 2012; Nizhnikov, Kondrashkina, Galkin, 2013]. Делеция *SWI1* в таких штаммах имеет сходные с прионом [*SWI*⁺] фенотипические проявления, вызывая дефекты роста дрожжей на средах с галактозой и нонсенс-супрессию [Nizhnikov *et al.*, 2016b] (Рисунок 14). Это делает логичным предположение о сходстве молекулярных механизмов этих фенотипических проявлений у приона [*SWI*⁺] и делеции гена *SWI1*.

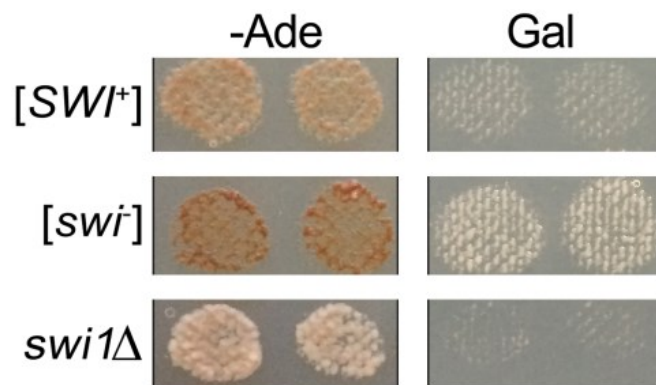


Рисунок 14. Фенотипические эффекты прионизации *Swi1* и делеции *SWI1* в гаплоидных дрожжевых штаммах, несущих мутантные варианты Sup35 со сниженной функциональной активностью (в данном случае, Aβ-Sup35MC) и нонсенс-аллель *ade1-14_{UGA}*. Фотографии дрожжей на селективных средах с галактозой (Gal) в качестве единственного источника углерода получены через 24 ч. инкубации при 30°C (дрожжи на среде с галактозой до этого дополнительно трехкратно пассировали по 24 ч. и переносили методом отпечатка на новые чашки). Фотографии на средах без аденина (-Ade) получены через пять суток роста дрожжей при 30°C.

Чтобы детально сравнить эффекты прионизации Swi1 и делеции *SWI1* и установить, сходны ли механизмы их фенотипических проявлений, мы провели секвенирование полных транскриптомов гаплоидных изогенных (*MATa sup35Δ:HIS3 ade1-14 his3 leu2 lys2 ura3 trp1-289* [pL-Aβ-Sup35MC]) штаммов дрожжей [*swi⁻*] (белок Swi1 в таких клетках находится в растворимой форме), [*SWI⁺*] (белок Swi1 в прионном состоянии) и *swi1Δ* (белок Swi1 отсутствует) [Malovichko *et al.*, 2019]. Дрожжи были выращены на среде с галактозой в качестве источника углерода, на которой наблюдались четкие фенотипические отличия штамма [*swi⁻*] от штаммов [*SWI⁺*] и *swi1Δ*. Секвенирование было выполнено на секвенаторе HiSeq 2500 (Illumina, США) в режиме парноконцевых прочтений длиной 2*100 пар оснований [Malovichko *et al.*, 2019].

Полученные нами данные показали, что делеция *SWI1* значительно сильнее влияет на транскриптом дрожжевых клеток, чем прионизация Swi1 (Рисунок 15). Так, прионизация Swi1 вызывает повышение экспрессии 40 генов и снижение 119, в то время как для делеции *SWI1* эти значения составляют 822 и 1156, соответственно (Таблица 1) [Malovichko *et al.*, 2019].

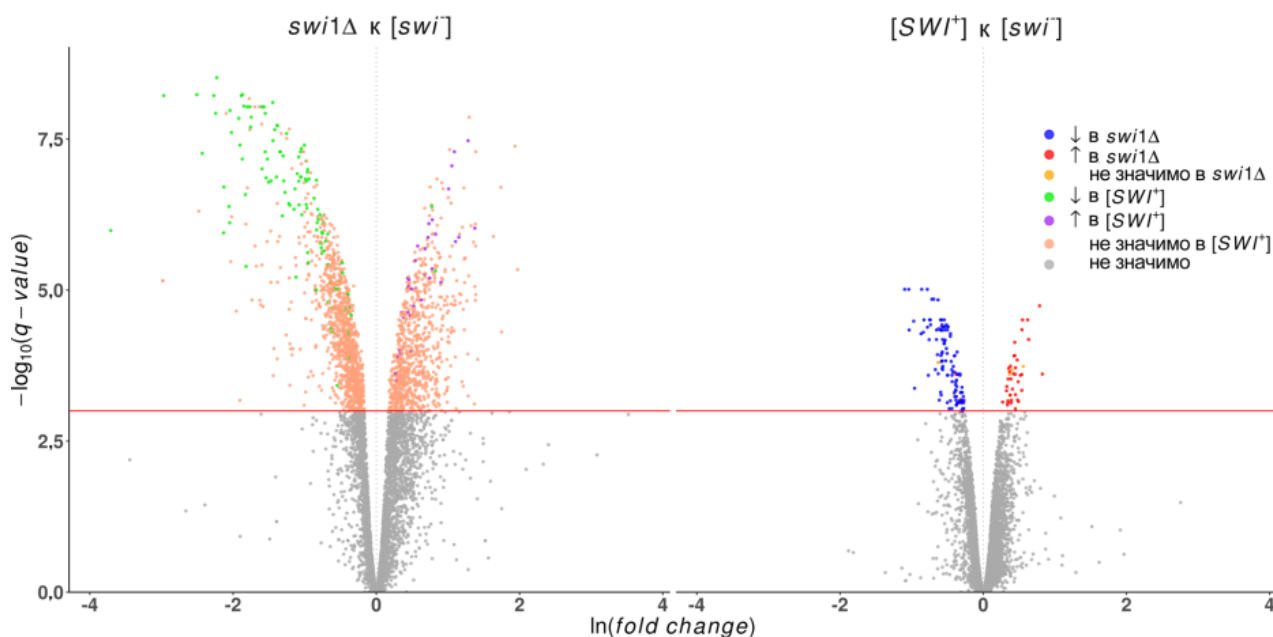


Рисунок 15. Графики, иллюстрирующие дифференциально экспрессируемые гены в штаммах $[SWI^+]$ и $swi1\Delta$ и по сравнению со штаммом $[swi^-]$ на селективной среде с галактозой в качестве источника углерода. По оси абсцисс отложен натуральный логарифм от кратной разницы в экспрессии между $[swi^-]$ и соответствующим штаммом ($\ln(\text{fold change})$). По оси ординат отмечен $-\log_{10}$ от значения q ($-\log_{10}(q\text{-value})$), вычисленный с помощью пакета R Sleuth [Pimentel *et al.*, 2017]. Гены, изменения экспрессии которых не является статистически достоверным показаны серым цветом ниже красной линии, в то время как дифференциально экспрессируемые гены ($FDR < 0,001$) отмечены как обозначено на рисунке (\downarrow - гены, экспрессия которых снижена в соответствующем штамме; \uparrow - повышена) [Malovichko *et al.*, 2019].

Таблица 1. Влияние приона $[SWI^+]$ и делеции $SWI1$ на экспрессию генома дрожжей на среде с галактозой в качестве единственного источника углерода [Malovichko *et al.*, 2019]

Изменения в экспрессии генов	Сравнение		
	$[SWI^+]$ со $[swi^-]$	$swi1\Delta$ со $[swi^-]$	$swi1\Delta$ со $[SWI^+]$
Увеличена ($FDR < 0,001$)	40	822	409
Уменьшена ($FDR < 0,001$)	119	1156	730
Всего	159	1978	1139

Анализ распределения дифференциально экспрессируемых генов по дрожжевым хромосомам показал, что в большинстве случаев такие гены распределены относительно равномерно (Рисунок 16). Тем не менее, значительные aberrации в профилях дифференциальной экспрессии были обнаружены в штамме *swi1Δ* для хромосомы I, у которой были сверхэкспрессированы примерно 50% генов (для остальных хромосом этот показатель составлял 6,9–14,4%), а также для участка хромосомы XII (основания 469317-489341), в котором расположен локус *RDN1*, кодирующий тандемные повторы рДНК, экспрессия которого была почти полностью репрессирована (Рисунок 16). В штамме [*SWI*⁺] эти эффекты отмечены не были [Malovichko *et al.*, 2019].

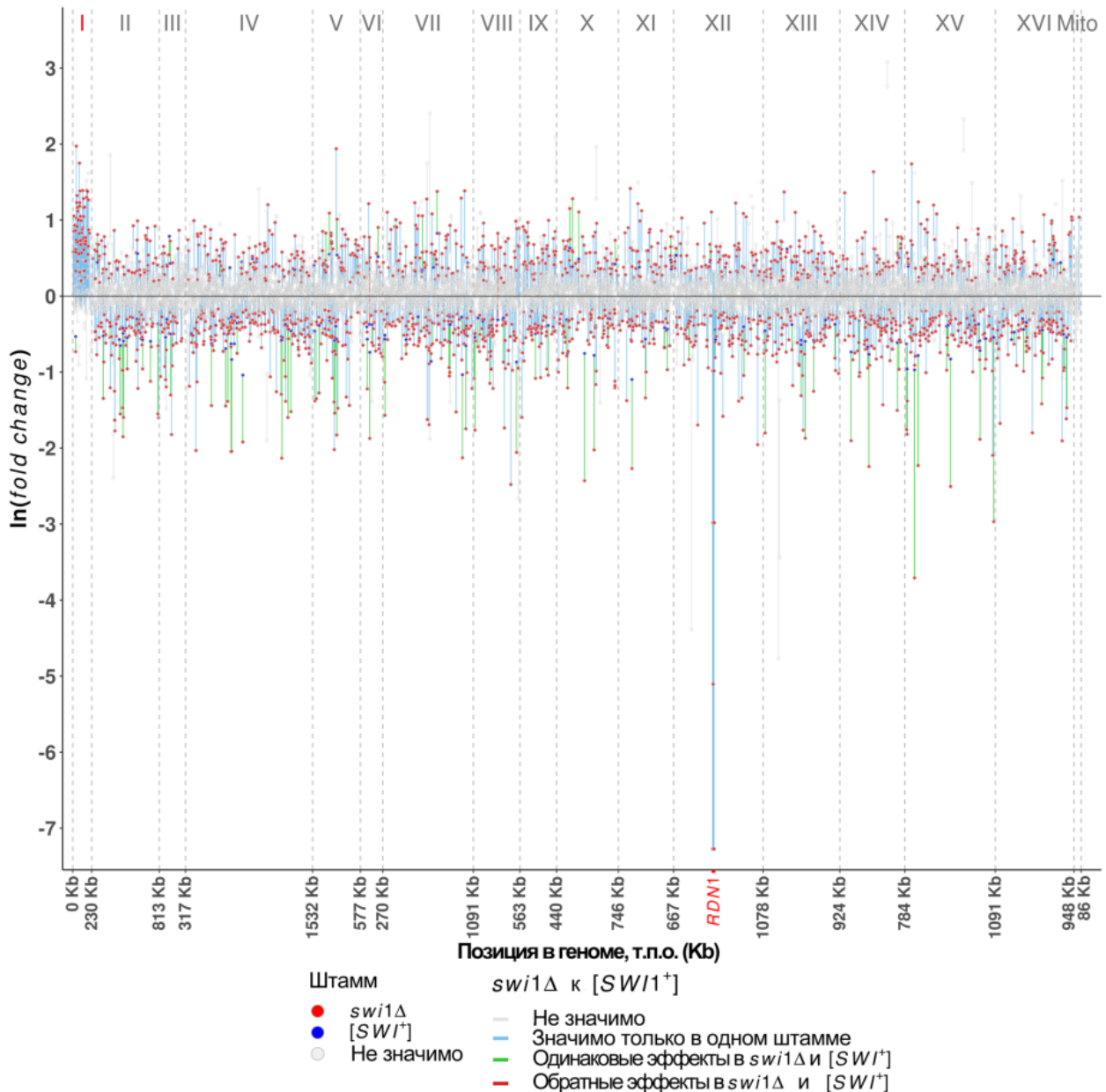


Рисунок 16. Распределение по хромосомам генов, экспрессия которых меняется на фоне приона $[SWI^+]$ и делеции *SWI1*, на селективной среде с галактозой в качестве источника углерода. По оси абсцисс отмечены геномные координаты, по оси ординат указана кратная \ln разница в экспрессии соответствующих генов в штаммах $[SWI^+]$ или *swi1Δ* по сравнению со $[swi^-]$ ($\ln(\text{fold change})$). Вертикальные пунктирные линии и римские цифры соответствуют границам и номерам хромосом. Красные точки показывают значимые отличия в экспрессии ($FDR < 0,001$) в штамме *swi1Δ*; синие – в штамме $[SWI^+]$; серые – изменения, не являющиеся значимыми. Линии, отражающие изменения экспрессии в одном и том же гене отмечены серым, если изменения экспрессии в *swi1Δ* и $[SWI^+]$ не являются значимыми; синим – если изменения значимы лишь в одном штамме (*swi1Δ* или $[SWI^+]$); зеленым – если экспрессия гена увеличена или уменьшена в обоих штаммах (*swi1Δ* и $[SWI^+]$); красным – если экспрессия гена увеличена в одном штамме и уменьшена в другом [Malovichko *et al.*, 2019].

Мы предположили, что делеция гена *SWI1*, в отличие от прионизации *Swi1*, вызывает дисомию по первой хромосоме. Для проверки этого предположения был проведен анализ экспрессии трех маркеров (*ade1-14*, *BUD14* и *CDC24*), расположенных в разных участках хромосомы I, при помощи количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Полученные данные показали (Рисунок 17А), что экспрессия всех этих трех генов повышена в штамме *swi1Δ* по сравнению со штаммами [*SWI*⁺] и [*swi*⁻] [Malovichko *et al.*, 2019]. Более того, анеуплоидия по хромосоме I стабильно поддерживалась в штамме *swi1Δ* на протяжении 6 суток пассирования на полной среде (Рисунок 17Б), однако постепенно утрачивалась при введении в штамм интактной копии *SWI1* на плазмиде, несущей участок хромосомы XVI с этим геном (Рисунок 17В). Таким образом, делеция *SWI1*, в отличие от прионизации *Swi1*, вызывает дисомию по первой хромосоме [Malovichko *et al.*, 2019].

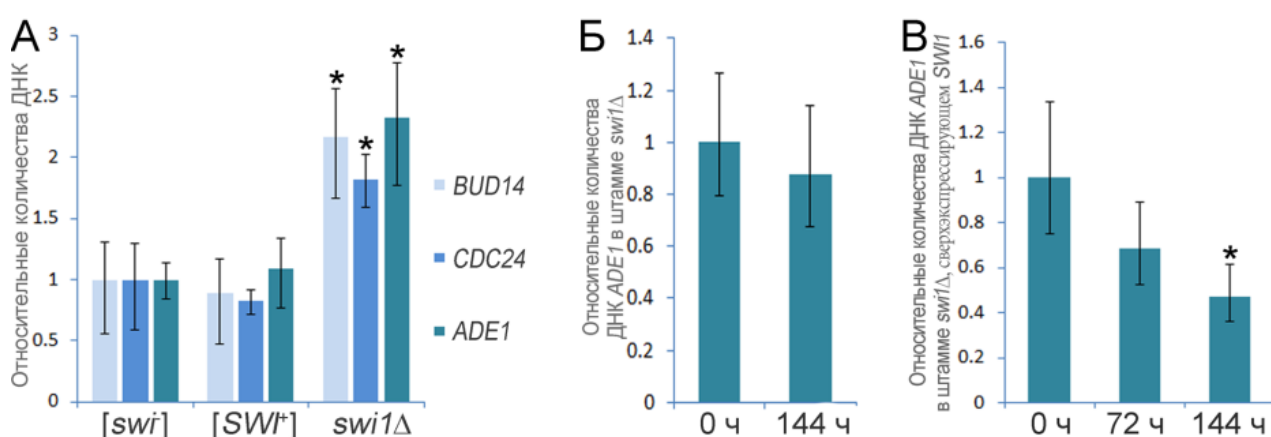


Рисунок 17. Подтверждение дисомии по хромосоме I в штамме *swi1Δ*, и изучение стабильности ее поддержания и элиминации при помощи количественной ПЦР в режиме реального времени. **А.** Сравнительный анализ числа копий генов *ADE1*, *BUD14* и *CDC24* в штаммах [*SWI*⁺], [*swi*⁻] и *swi1Δ*. **Б.** Анализ стабильности дисомии по хромосоме I в штамме *swi1Δ* (*ADE1* был использован в качестве маркера числа копий хромосомы I). **В.** Действие

экспрессии *SWI1* в штамме *swi1Δ* на число копий хромосомы I (*ADE1* был использован в качестве маркера числа копий). Во всех случаях ПЦР был выполнен с использованием геномной ДНК соответствующего штамма в качестве матрицы и опубликованных праймеров и зондов [Malovichko *et al.*, 2019]. Дрожжи выращивали при 30°C в течение указанного времени. Ген *ACT1* был использован в качестве контроля. Данные представлены как $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$ С. о. [Livak, Schmittgen, 2001]. Значения в контрольных образцах или в начальных точках экспериментов приведены к 1. Для каждого эксперимента выполнено пять биологических повторностей. Значимость отличий анализировали при помощи критерия Краскела-Уоллиса. Знак «*» обозначает уровень значимости $p \leq 0,01$ [Malovichko *et al.*, 2019].

Далее мы сравнили действие прионизации Swi1 и делеции соответствующего гена на биологические процессы и молекулярные функции, аннотированные в базе данных “Gene Ontology” (<http://geneontology.org/>). Результаты анализа показали, что на фоне делеции *SWI1* происходит подавление большинства процессов, связанных с трансляцией, включая биогенез рибосомы, инициацию и элонгацию трансляции, а также активация ответов на высокую осмолярность среды, нехватку питательных веществ и действие химикатов (Рисунок 18). На фоне приона [*SWI*⁺] такие эффекты отсутствуют, однако наблюдается специфичное снижение процессов транспорта аминокислот, углеводов и общего транспорта через мембрану (Рисунок 18) [Malovichko *et al.*, 2019].

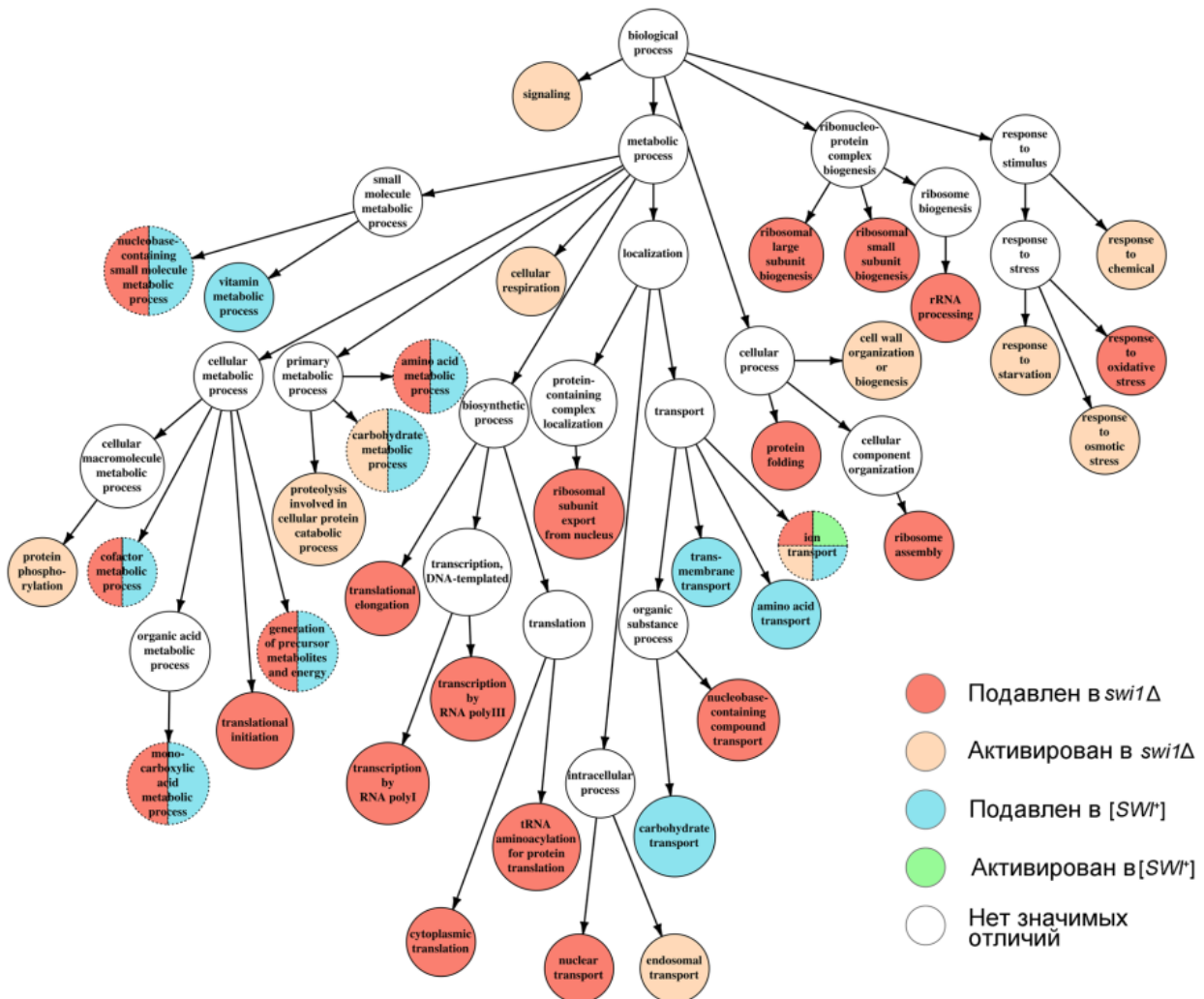


Рисунок 18. Схема, иллюстрирующая подавление и активацию биологических процессов, происходящее в штаммах $[SWI^+]$ и $swi1\Delta$ на среде с галактозой в качестве источника углерода, согласно анализу, выполненному при помощи пакета topGO [Alexa, Rahnenfuhrer, 2016] в базе данных “Gene Ontology” (<http://geneontology.org/>). Некоторые внутренние узлы на схеме были удалены для улучшения визуального восприятия. Используемые цвета расшифрованы на рисунке. Полная версия рисунка доступна в дополнительных материалах к ранее опубликованной нами работе [Malovichko *et al.*, 2019].

Анализ метаболических путей, активность которых изменяется на фоне делеции *SWI1* и прионизации Swi1 показал, что целый ряд путей метаболизма специфично регулируется на фоне приона $[SWI^+]$, и не изменяется на фоне делеции *SWI1* (Рисунок 19). При этом метаболизм 2-оксокарбоновых кислот и аргинина специфично

усиливается только на фоне $[SWI^+]$, но не изменяется под действием делеции $SWI1$ (Рисунок 19). Таким образом, полученные данные показывают, что прионизация $Swi1$ не только не тождественна делеции его структурного гена, но специфично изменяет некоторые клеточные функции и метаболические пути [Malovichko *et al.*, 2019].

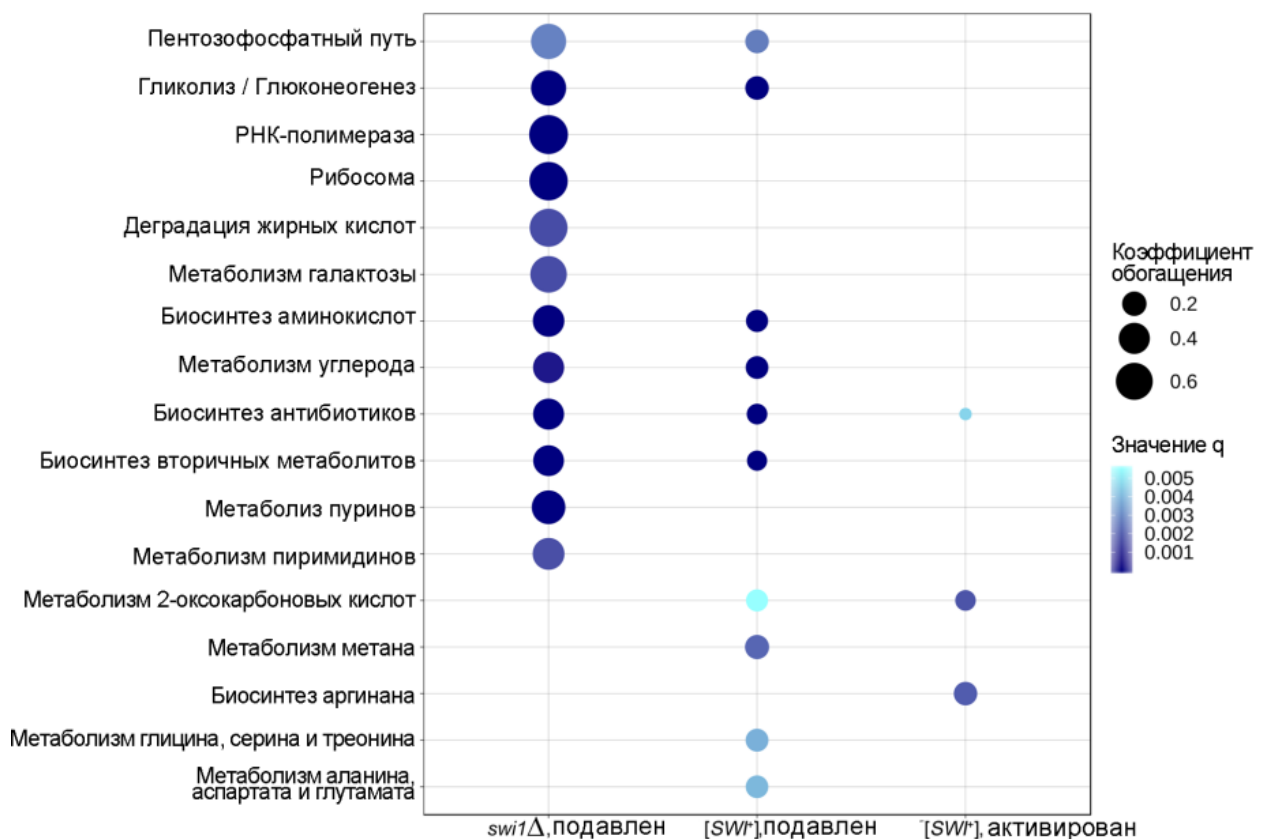


Рисунок 19. Метаболические пути, активация или подавление которых происходит в штаммах $[SWI^+]$ и $swi1\Delta$ на среде с галактозой в качестве источника углерода, согласно анализу KEGG Pathway test, выполненному при помощи пакета clusterProfiler [Yu *et al.*, 2012] и визуализированному посредством ggplot2 [Ginestet, 2011]. Размер точки представляет собой коэффициент обогащения, а цветовой градиент отображает экспериментальное значение q в соответствующем анализе. Пути отсортированы в порядке убывания на основе общего коэффициента обогащения во всех трех категориях (метаболический путь подавлен в $swi1\Delta$, подавлен в $[SWI^+]$ или активирован в $[SWI^+]$) [Malovichko *et al.*, 2019].

Принимая во внимание существенные отличия в выявленных нами эффектах прионизации Swi1 и делеции его структурного гена, мы решили вернуться к более детальному анализу механизмов фенотипических проявлений этих состояний Swi1. Поскольку нонсенс-супрессия в штаммах [SWI⁺], несущих мутантные варианты eRF3 (Sup35) со сниженной функциональной активностью возникает в результате снижения экспрессии гена *SUP45* [Kondrashkina *et al.*, 2014; Nizhnikov *et al.*, 2016b], мы сравнили количества мРНК *SUP45* в штаммах [swi⁻], [SWI⁺] и *swi1Δ* (Рисунок 20). Данные, полученные нами при помощи количественной ПЦР в реальном времени (qPCR), показали, что количества мРНК *SUP45* в штаммах [swi⁻] и *swi1Δ* не отличаются (Рисунок 20Б). Более того, увеличение экспрессии гена *SUP45* в штамме *swi1Δ* не вызывало подавление нонсенс-супрессии (Рисунок 20А). Таким образом, нонсенс-супрессия в штамме *swi1Δ*, в отличие от [SWI⁺], возникает не в результате снижения экспрессии гена *SUP45* [Antonets *et al.*, 2017].

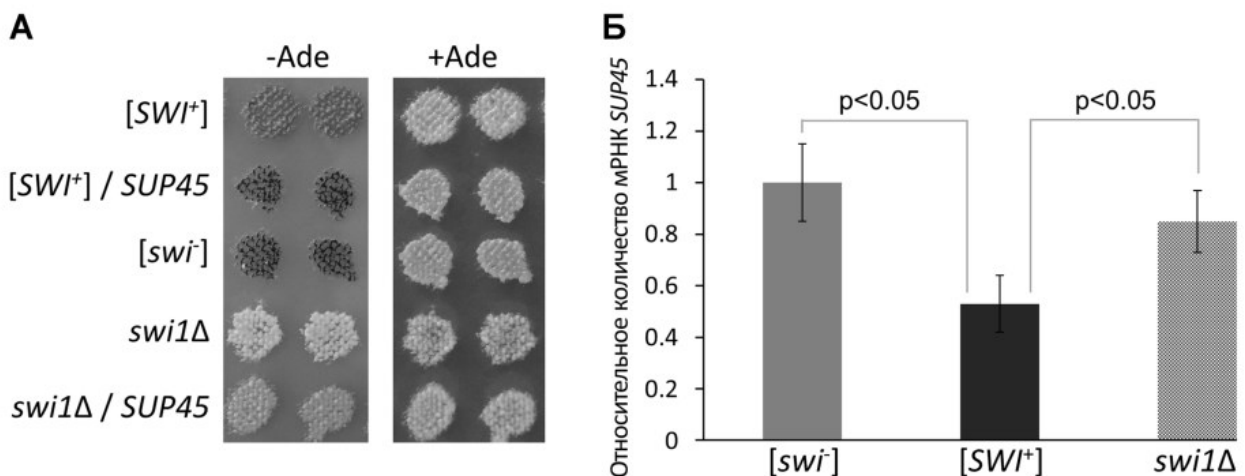


Рисунок 20. Влияние *SUP45* на фенотипическое проявление изогенных штаммов с различными состояниями Swi1. **А.** Увеличение экспрессии *SUP45* приводит к подавлению нонсенс-супрессии, вызываемой делецией *SWI1*.

Приведены фотографии штаммов [*SWI*⁺] и *swi1Δ* с увеличенной экспрессией *SUP45*, достигнутой за счет введения дополнительной копии *SUP45* на центромерной плазмиде (обозначены как «/ *SUP45*»), и без сверхэкспрессии, а также штамма [*swi*⁻] (в качестве контроля) на пятые сутки роста на селективных средах без (-Ade) и с аденином (+Ade) при 30°C. Б. Сравнительный анализ экспрессии *SUP45* в штаммах [*SWI*⁺], [*swi*⁻] и *swi1Δ* при помощи qPCR. Данные представлены как $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [Livak, Schmittgen, 2001], отмечены уровни значимости. Количество мРНК *SUP45* в клетках [*swi*⁻] приравнено к 1 [Antonets *et al.*, 2017].

Возникновение дупликации первой хромосомы, на которой располагается ген *ADE1* (в виде аллели *ade1-14_{UGA}*), на фоне делеции *SWI1* [Malovichko *et al.*, 2019] подтверждали и данные профиля экспрессии генов, расположенных на первой хромосоме, полученные при выращивании штаммов [*swi*⁻] и *swi1Δ* на полной среде [Antonets *et al.*, 2017]. Мы предположили, что нонсенс-супрессия на среде без аденина в штамме *swi1Δ* может возникать в результате сверхэкспрессии мутантной аллели *ade1-14_{UGA}*. Преждевременный стоп-кодон в транскрипте этой аллели на фоне общего дисбаланса аппарата трансляции, наблюдаемого в штамме *swi1Δ* (Рисунок 18) [Malovichko *et al.*, 2019], с более высокой частотой, чем в штамме с интактным *SWI1*, прочитывается как значащий, что может вызывать рост дрожжей на среде без аденина [Nizhnikov *et al.*, 2014a]. Сравнительный анализ количества мРНК *ade1-14_{UGA}* показал, что оно действительно выше в штамме *swi1Δ*, чем в штаммах [*swi*⁻] и [*SWI*⁺] (Рисунок 21) [Antonets *et al.*, 2017]. Более того, сверхэкспрессия *ade1-14_{UGA}* в штамме [*swi*⁻] вызывала возникновение фенотипа, сходного со *swi1Δ*, хотя и несколько более слабо выраженного (Рисунок 21). Таким

образом, нам удалось установить, что нонсенс-супрессия на среде без аденина в штамме *swi1Δ*, в отличие от $[SWI^+]$, возникает не в результате снижения экспрессии *SUP45*, а в результате увеличения экспрессии *ADE1* (*ade1-14_{UGA}*) [Antonets *et al.*, 2017], вызванной дупликацией хромосомы I [Malovichko *et al.*, 2019].

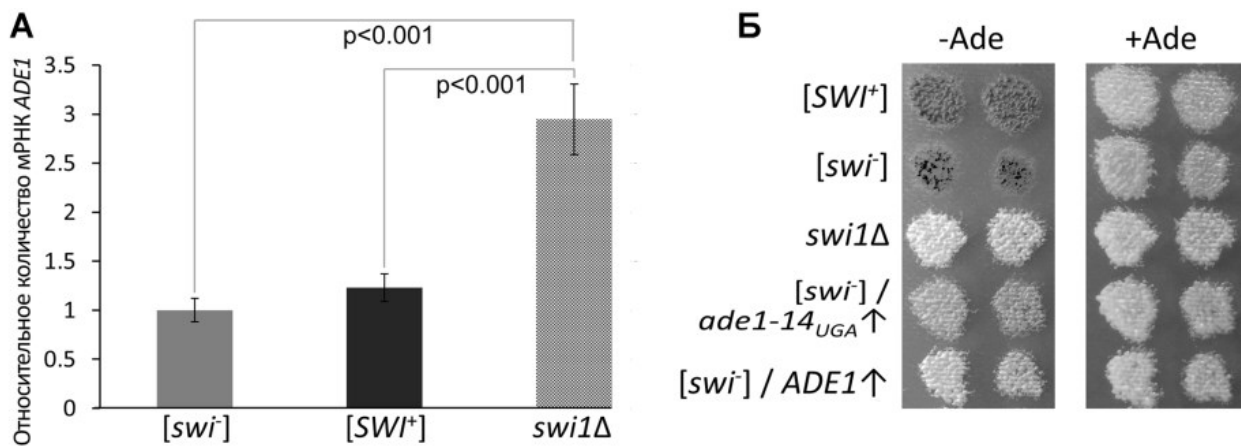


Рисунок 21. Уровень экспрессии *ADE1* влияет на фенотипические проявления штаммов с различными состояниями Swi1. **А.** Сравнение относительного количества мРНК *ade1-14_{UGA}* в штаммах $[SWI^+]$, $[swi^-]$ и *swi1Δ* при помощи qPCR. Данные показаны как $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [Livak, Schmittgen, 2001], отмечены уровни значимости. Количество мРНК *ADE1* у $[swi^-]$ приравнено к 1. **Б.** Действие сверхэкспрессии *ade1-14_{UGA}* на нонсенс-супрессию в штаммах $[swi^-]$. Приведены фотографии штаммов дрожжей $[SWI^+]$, $[swi^-]$, *swi1Δ* и $[swi^-]$ со сверхэкспрессией *ade1-14_{UGA}* или *ADE1* (↑) на селективных средах без (-Ade) и с добавлением аденина (+Ade) на пятые сутки роста при 30°C [Antonets *et al.*, 2017].

Несмотря на то, что сверхэкспрессия *ade1-14_{UGA}* в штамме *swi1Δ* частично объясняет его нонсенс-супрессорный фенотип, этот эффект является более слабым, чем на фоне делеции *SWI1* (Рисунок 22) [Malovichko *et al.*, 2019]. Кроме того, делеция *SWI1* вызывает и нонсенс-супрессию на среде без триптофана (Рисунок 14) [Malovichko

et al., 2019]. Основываясь на этих данных, мы предположили, что нонсенс-супрессия в штаммах *swi1Δ* является двухкомпонентной. Результаты секвенирования транскриптомов свидетельствовали в пользу того, что этим вторым компонентом является глобальное нарушение в штамме *swi1Δ* работы трансляционного аппарата, возникающее, в том числе, в результате подавления экспрессии локуса *RDN1*, кодирующего повторы рДНК [Venema, Tollervey, 1999] (Рисунок 16). Для проверки этого предположения мы заместили в штаммах *swi1Δ*, [*swi*⁻] и [*SWI*⁺] мутантный вариант фактора терминации трансляции eRF3 (Sup35) со сниженной функциональной активностью (Ab-Sup35MC) [Nizhnikov *et al.*, 2012] на нативный Sup35. Как и ожидалось, штаммы [*swi*⁻] и [*SWI*⁺], несущие интактную последовательность *SUP35* не росли на селективных средах без аденина или триптофана (Рисунок 22А) [Malovichko *et al.*, 2019]. В то же время штамм *swi1Δ* обладал способностью к росту на обеих этих средах, то есть онипотентной нонсенс-супрессией, отражающей наличие у него глобальных нарушений эффективности терминации трансляции, не связанных с эффективностью работы eRF3 (Рисунок 22) [Malovichko *et al.*, 2019]. Добавление аминогликозидного антибиотика паромомицина, который также вызывает нарушения терминации трансляции, приводило к возникновению роста уже у штамма [*SWI*⁺] и дополнительному усилению роста штамма *swi1Δ* (Рисунок 22А) [Malovichko *et al.*, 2019], что окончательно подтверждало наше предположение.

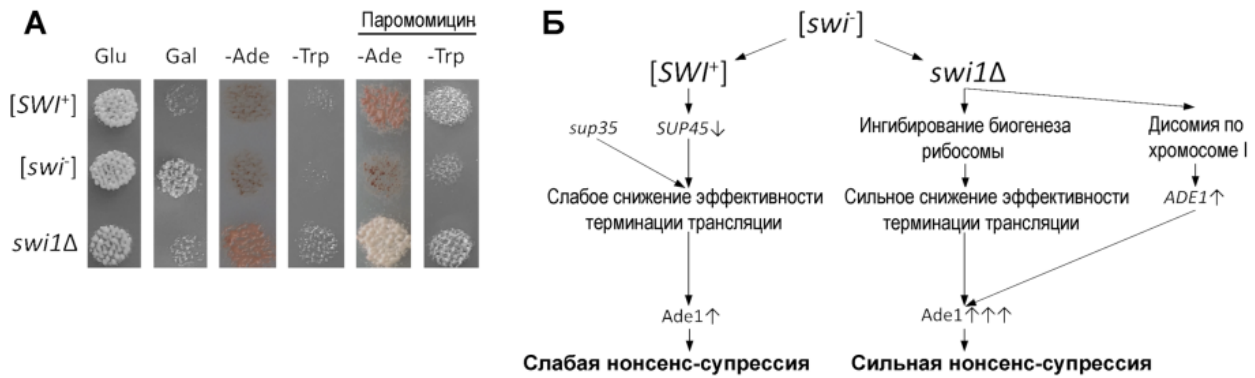


Рисунок 22. Механизмы нонсенс-супрессии в штаммах [SWI⁺] и swi1Δ. **А.** Аминогликозидный антибиотик паромомицин вызывает нонсенс-супрессию в штаммах [SWI⁺] и swi1Δ. Показан рост штаммов [SWI⁺], [swi⁻] и swi1Δ, несущих полноразмерный SUP35 и нонсенс-аллели *ade1-14_{UGA}* и *trp1-289_{UAG}*. Фотографии дрожжей на селективных средах с глюкозой (Glu) и галактозой (Gal) в качестве единственного источника углерода получены через 24 ч. инкубации при 30°C (дрожжи на среде с галактозой до этого дополнительно трехкратно пассировали по 24 ч. и переносили методом отпечатка на новые чашки). Фотографии на средах без аденина (-Ade) и триптофана (-Trp) получены через пять суток роста дрожжей при 30°C. **Б.** Схема, иллюстрирующая различия в механизмах нонсенс-супрессии, возникающей в ходе прионизации Swi1 и на фоне делеции SWI1 [Malovichko *et al.*, 2019].

Таким образом, в рамках наших исследований удалось провести детальный сравнительный анализ эффектов прионизации Swi1 и его делеционной инактивации. Полученные данные убедительно показали, что, несмотря на наличие частичного сходства между группами генов, экспрессия которых меняется на фоне приона [SWI⁺] и делеции гена SWI1, делеция вызывает целый ряд специфичных проявлений, отсутствующих в штаммах, несущих [SWI⁺]: (1) дисомию по хромосоме I; (2) общее подавление экспрессии генов трансляционного аппарата; (3) специфичное изменение экспрессии генов, контролирующих ряд молекулярных процессов, включая активацию ответов на высокую осмолярность среды, нехватку питательных веществ и действие химикатов [Malovichko *et al.*, 2019].

На фоне приона [*SWI*⁺] также наблюдаются специфичные эффекты, включающие: (1) снижение экспрессии генов, контролирующих транспорт различных веществ через мембрану; (2) активацию метаболизма 2-оксокарбоновых кислот и аргинина [Malovichko *et al.*, 2019]; (3) подавление экспрессии гена *SUP45* [Kondrashkina *et al.*, 2014; Nizhnikov *et al.*, 2016b]. Даже фенотипические проявления приона [*SWI*⁺] при внешнем сходстве с проявлением делеции *SWI1* опосредованы разными механизмами. Так, нонсенс-супрессия в штаммах [*SWI*⁺] возникает за счет подавления экспрессии гена *SUP45* [Kondrashkina *et al.*, 2014; Nizhnikov *et al.*, 2016b] в присутствии мутантных вариантов *Sup35* со сниженной функциональной активностью [Nizhnikov *et al.*, 2012; Nizhnikov, Kondrashkina, Galkin, 2013], а на фоне делеции *SWI1* – за счет общего снижения эффективности работы трансляционного аппарата, вызванного, в том числе, репрессией хромосомного локуса *RDN1*, а также сверхэкспрессии гена *ADE1* на фоне дисомии по хромосоме I (Рисунок 22) [Antonets *et al.*, 2017; Malovichko *et al.*, 2019].

В целом, полученные нами данные показывают, что конверсия белков в прионы, выступающие в качестве конформационных матриц, преобразующих молекулы растворимого белка в агрегаты, не приводит к полной инактивации белка, а скорее влечет за собой изменение его функции. В этом контексте с позиций классической генетической терминологии прионы могут быть рассмотрены не как мутации, приводящие к потере функции (loss-of-function), но как мутации, изменяющие функции гена (gain-of-function).

ГЛАВА IV. Условные прионы

В предыдущих главах нашего исследования было установлено, что белковые конформационные матрицы распространены в природе значительно шире, чем предполагали до этого, образуясь, в частности, у растений и клубеньковых бактерий в физиологических условиях *in vivo*. Также было показано, что возникновение конформационных матриц может приводить не только к инактивации белка, но и к изменению его функции [Antonets *et al.*, 2017; Antonets *et al.*, 2020; Antonets, Kliver, Nizhnikov, 2018; Antonets, Nizhnikov, 2017a; Kosolapova *et al.*, 2019; Malovichko *et al.*, 2019]. Поскольку протеом является динамической системой, многие компоненты которой способны изменять структуру и функции [Picotti *et al.*, 2009], мы решили изучить, могут ли белки приобретать и поддерживать свойства прионов только в определенных условиях продукции, которые для многих белков способны многократно изменяться *in vivo* под действием различных стимулов [Chong *et al.*, 2015; Soufi *et al.*, 2009].

Белок Gln3 дрожжей представляет собой транскрипционный регулятор катаболизма азота [Cox *et al.*, 2000; Kulkarni *et al.*, 2001], влияющий на эффективность терминации трансляции [Nizhnikov *et al.*, 2014a; Nizhnikov *et al.*, 2014c] и имеющий QN-обогащенный амилоидогенный участок (Gln3QN) 166–242 ак. Этот участок формирует при сверхпродукции агрегаты, обладающие прионоподобными [Alberti *et al.*, 2009] и амилоидоподобными свойствами [Alberti *et al.*, 2009; Antonets, Sargsyan, Nizhnikov, 2016], а

также взаимодействует с агрегатами дрожжевых прионов [PSI^+] и [PIN^+], причем эффективность агрегации Gln3QN значительно возрастает в присутствии [PIN^+] [Antonets, Sargsyan, Nizhnikov, 2016]. Агрегаты фрагмента Gln3QN, слитого с желтым флуоресцентным белком YFP, проявляют цитоплазматическую локализацию (Рисунок 23А) [Antonets, Sargsyan, Nizhnikov, 2016].

Мы сверхпродуцировали полноразмерный Gln3, слитый с YFP, в клетках дрожжей. Этот химерный белок не агрегирует при сверхпродукции ни в штаммах, лишенных прионов, ни в штаммах, несущих прион [PIN^+], выступающий в качестве индуктора агрегации и прионизации многих белков дрожжей [Derkatch, Liebman, 2007a; Derkatch *et al.*, 2001]. Сигнал Gln3-YFP при сверхпродукции в штамме 1-OT56 [PIN^+] демонстрирует ядерную локализацию (Рисунок 23Б) [Antonets *et al.*, 2019; Antonets, Sargsyan, Nizhnikov, 2016].

Мы провели совместную сверхпродукцию фрагмента Gln3QN, слитого с синим флуоресцентным белком CFP, и полноразмерного Gln3, слитого с YFP в дрожжевом штамме 1-OT56 [PIN^+], предположив, что агрегаты Gln3QN могли бы служить в качестве конформационной матрицы для агрегации полноразмерного Gln3. В результате проведенного эксперимента нам действительно удалось выявить несколько клонов, в которых полноразмерный Gln3-YFP агрегировал, причем его агрегаты демонстрировали полную колокализацию с агрегатами Gln3QN-CFP (Рисунок 23В) [Antonets *et al.*, 2019].

Далее, для того, чтобы выяснить, наследуется ли агрегация Gln3-YFP, мы провели потерю плазмиды для сверхпродукции Gln3QN-CFP. В

результате этого эксперимента нам удалось установить, что у некоторых клонов после потери плазмиды для сверхпродукции Gln3QN-CFP сохранилась агрегация полноразмерного Gln3-YFP, причем агрегаты этого белка располагались в цитоплазме (Рисунок 23Г, белая стрелка), но часть белка демонстрировала диффузное свечение в ядре (Рисунок 23Г, черная стрелка). Таким образом, индуцированная нами агрегация полноразмерного Gln3-YFP наследуется в ряду митотических потомков. Далее клоны, у которых Gln3-YFP агрегирует в цитоплазме, мы отмечали как [*GLN3*↑⁺] («↑» обозначает, что агрегация поддерживается при сверхпродукции), а клоны, у которых Gln3-YFP проявляет диффузную ядерную локализацию – [*gln3*↑[~]] [Antonets *et al.*, 2019].

Проверка стабильности наследования [*GLN3*↑⁺] показала, что доля клеток с агрегатами через семь суток пассирования достоверно не отличается от начальной точки ($p > 0,05$) (Рисунок 23Д). Снижение уровня продукции Gln3-YFP за счет ингибирования активности контролирующего его продукцию промотора *CUP1* путем прекращения добавления сульфата меди II в среду, напротив, вызывало полную элиминацию [*GLN3*↑⁺] уже через три пассажа продолжительностью одни сутки каждый (всего около 30 поколений) (Рисунок 23Е). Таким образом, [*GLN3*↑⁺] поддерживается только при сверхпродукции его структурного белка [Antonets *et al.*, 2019].

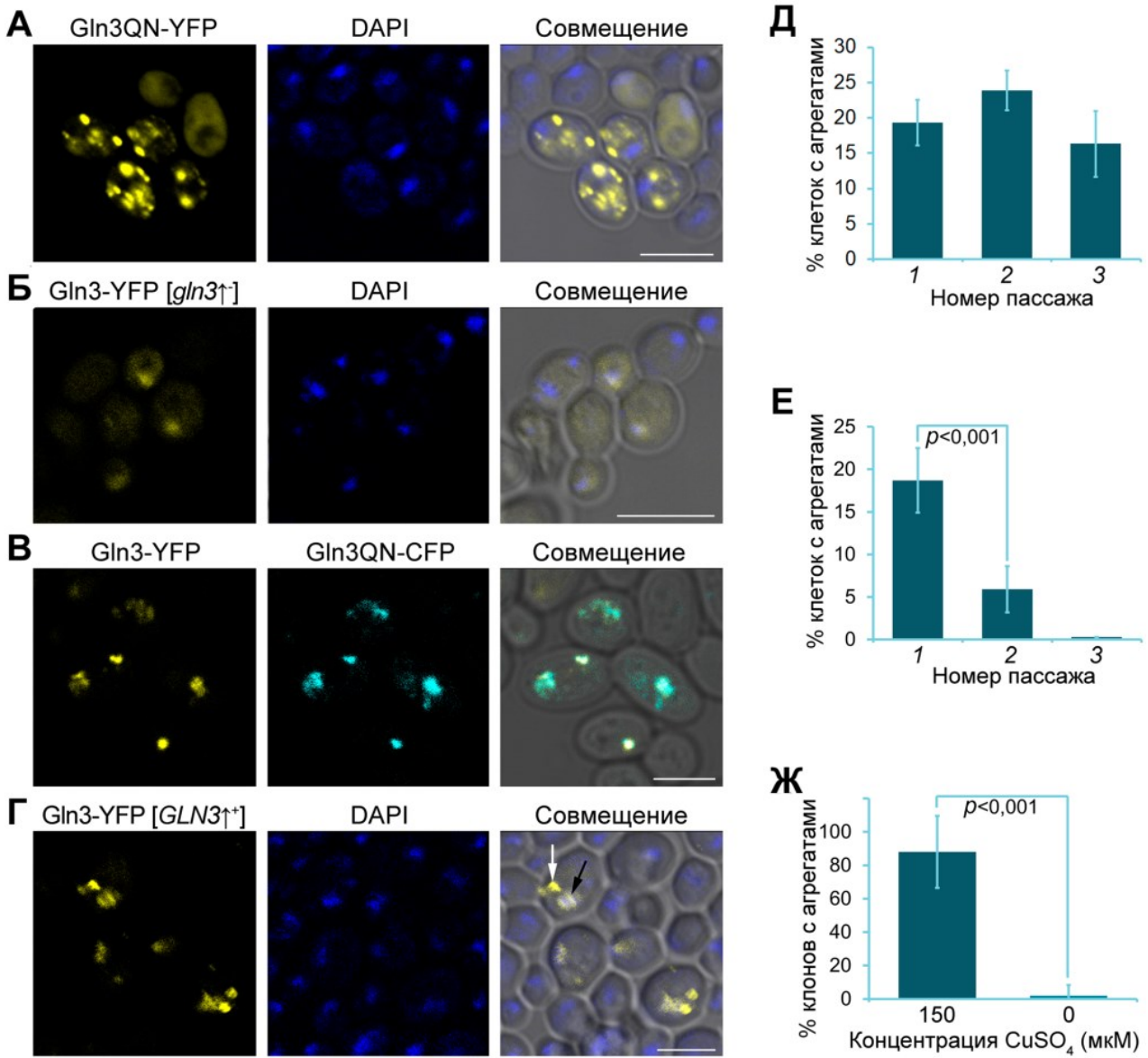


Рисунок 23. Совместная сверхпродукция с Gln3QN-CFP индуцирует агрегацию Gln3-YFP. **А.** Сверхпродукция Gln3QN-YFP на фоне приона [*PIN*⁺] приводит к возникновению агрегатов, расположенных вне ядра. **Б.** Полноразмерный Gln3-YFP при сверхпродукции не агрегирует и локализован преимущественно в ядре. **В.** Агрегация Gln3-YFP возникает при совместной сверхпродукции с Gln3QN-CFP на фоне [*PIN*⁺]. **Г.** Агрегация Gln3-YFP сохраняется без сверхпродукции Gln3QN-CFP. Черная стрелка – колокализация растворимого Gln3-YFP с ядром, белая - агрегат Gln3-YFP в цитоплазме. Показаны канал флуоресценции соответствующих белков и связывающего ДНК красителя DAPI. «Совмещение» - наложение каналов флуоресценции на канал фазового контраста. Масштабная линейка - 5 мкМ. **Д.** Агрегация Gln3-YFP наследуется в митозе при сверхпродукции. Показаны номера пассажей по 24 ч. при 30°C. **Е.** При прекращении сверхпродукции Gln3-YFP происходит потеря его агрегации, которая не восстанавливается при возобновлении сверхпродукции. Отмечены % клеток с агрегатами после указанного числа

пассажей по 24 ч при 30°C. **Ж.** Нативный Gln3 поддерживает состояние $[GLN3\uparrow^+]$ при сверхпродукции. Отмечен % клонов, сохранивших $[GLN3\uparrow^+]$ при замене Gln3-YFP на Gln3 и пассировании на селективных средах с добавлением 150 мкМ $CuSO_4$ (сверхпродукция по контролю индуцируемого ионами меди II промотора *CUP1*) или без $CuSO_4$ (нет сверхпродукции). Планки погрешностей соответствуют С. о.; показаны уровни значимости. Анализ агрегации во всех случаях проводили через 48 ч. роста клеток на селективных средах [Antonets *et al.*, 2019].

Далее нами была проведена замена плазмиды для сверхпродукции Gln3-YFP на плазмиду для сверхпродукции нативного Gln3 в штамме $[GLN3\uparrow^+]$. Полученные клоны, сверхпродуцирующие Gln3, в течение пяти суток пассировали на селективной среде, после чего вновь вводили плазмиду для сверхпродукции Gln3-YFP и анализировали агрегацию этого химерного белка. В результате эксперимента было установлено, что агрегация Gln3-YFP наблюдалась у 88% потомков исходных клонов (Рисунок 23Ж). Это доказывало, что детерминант $[GLN3\uparrow^+]$ поддерживается как при сверхпродукции химерного белка Gln3-YFP, так и немодифицированного полноразмерного Gln3 [Antonets *et al.*, 2019].

Полученные данные позволили нам предположить наличие у $[GLN3\uparrow^+]$ прионных свойств. Для проверки этого предположения мы изучили зависимость $[GLN3\uparrow^+]$ от антиприонного соединения гидрохлорида гуанидина (ГГХ) [Ferreira *et al.*, 2001]. Полученные данные показали, что 5 мМ ГГХ вызывает примерно десятикратное снижение доли клеток $[GLN3\uparrow^+]$ через три пассажа продолжительностью одни сутки каждый (Рисунок 24А). При пассировании штамма $[GLN3\uparrow^+]$ на среде без ГГХ в качестве контроля снижение доли клеток $[GLN3\uparrow^+]$ отмечено не было (Рисунок 24А).

Поскольку действие ГГХ на прионы связано с тем, что это соединение инактивирует АТФ-азный домен [Masison, Reidy, 2015; Romanova, Chernoff, 2009] шаперона Hsp104 [Chernoff *et al.*, 1995], обеспечивающего фрагментацию прионных агрегатов для их эффективной передачи дочерним клеткам [Kushnirov, Ter-Avanesyan, 1998], мы проанализировали эффекты сверхпродукции и инактивации Hsp104 на $[GLN3\uparrow^+]$. Результаты эксперимента показали, что делеция *HSP104* приводит к практически полному исчезновению $[GLN3\uparrow^+]$, в то время как сверхпродукция Hsp104 не оказывает влияния на этот нехромосомный детерминант (Рисунок 24Б), как и на большинство дрожжевых прионов. Одним из основных свойств прионов является инфекционность, для анализа которой мы использовали белковую трансформацию [Tanaka *et al.*, 2004; Tanaka, 2010]. В качестве донора агрегатов были использованы лизаты гаплоидного штамма $[GLN3\uparrow^+]$, а реципиента – сферопласты гаплоидного штамма $[gln3\uparrow^-]$ (для того, чтобы избежать возможных артефактов, эти штаммы были снабжены различными селективными маркерами, а полученные трансформанты проверяли на предмет сохранения гаплоидного статуса). В результате проведенного эксперимента было установлено, что $[GLN3\uparrow^+]$ передается при белковой трансформации с эффективностью около 2% (Таблица 2). В контрольном эксперименте, где в качестве донора был использован лизат $[gln3\uparrow^-]$, появления трансформантов $[GLN3\uparrow^+]$ отмечено не было (Таблица 2) [Antonets *et al.*, 2019].

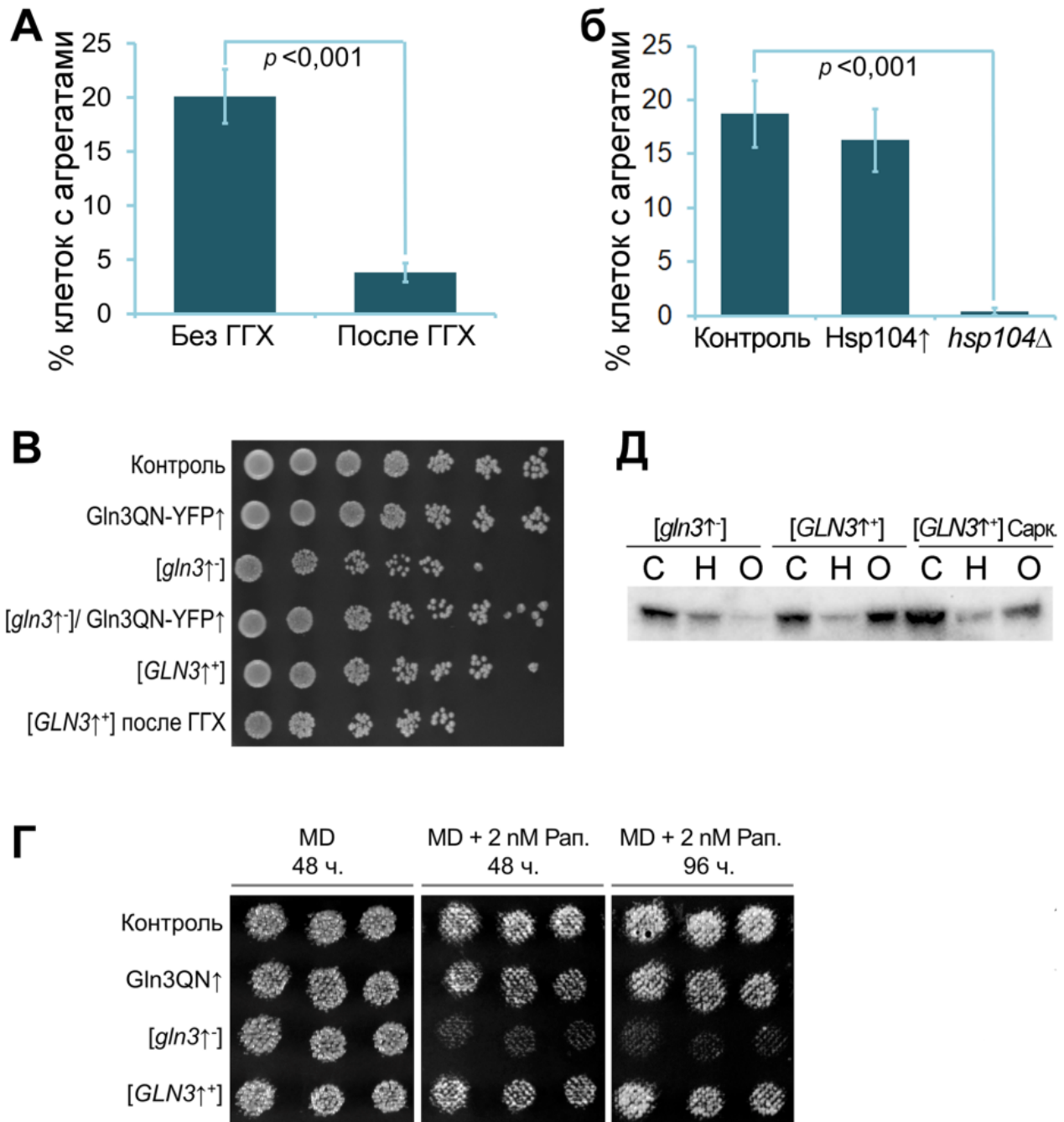


Рисунок 24. Прионные свойства детерминанта $[GLN3\uparrow^+]$. **А.** Зависимость $[GLN3\uparrow^+]$ от ГГХ. Показан % клеток с агрегатами Gln3-YFP после пассирования на средах с 5 мМ ГГХ и без. **Б.** $[GLN3\uparrow^+]$ зависит от шаперона Hsp104. Показаны эффекты сверхпродукции Hsp104 (Hsp104↑) и делеции *HSP104* (*hsp104Δ*). Планки погрешностей соответствуют с. о.; показаны уровни значимости. **В.** Отличие роста штаммов, отличающихся по агрегации Gln3-YFP. $[GLN3\uparrow^+]$ после ГГХ – штамм после трехкратного пассирования на среде с 5 мМ ГГХ. **Г.** Влияние 5 нг/мл рапамицина на рост штаммов $[GLN3\uparrow^+]$ и $[gln3\uparrow^-]$ на селективных средах при 30°C. **Д.** Gln3-YFP образует агрегаты, устойчивые к лаурил-саркозинату натрия в штаммах $[GLN3\uparrow^+]$, но не в

штаммах [*gln3*[↑]]. Представлены результаты седиментационного анализа с последующей вестерн-блот гибридизацией с антителами против GFP. «С» – суммарный белок, «Н» – надосадочная фракция, «О» – осадочная, «Сарк.» – пробы обработаны 3% лаурил-саркозинатом натрия [Antonets *et al.*, 2019].

Таблица 2. Инфекционность условного приона [*GLN3*[↑]] при белковой трансформации [Antonets *et al.*, 2019]

Штамм- донор белкового лизата	Номер экспери- мента	Всего трансфор- мантов отобрано	Количество трансфор- мантов [<i>GLN3</i> [↑]]	Эффективность передачи [<i>GLN3</i> [↑]] (%)
[<i>GLN3</i> [↑]]	1	112	2	1,8
	2	143	4	2,8
	3	98	1	1,0
[<i>gln3</i> [↑]]	1	128	0	0,0
	2	75	0	0,0
	3	140	0	0,0

Далее мы изучили фенотипические эффекты возникновения [*GLN3*[↑]]. Использование теста на разведение позволило установить, что [*GLN3*[↑]] снижает токсичность, наблюдаемую при сверхэкспрессии *GLN3*: штаммы [*GLN3*[↑]] растут лучше, чем [*gln3*[↑]] (Рисунок 24В). Поскольку инактивация Gln3 влечет за собой повышение устойчивости клеток к рапамицину [Cardenas *et al.*, 1999], представляющему собой ингибитор TOR-киназного каскада [Zaragoza *et al.*, 1998], мы сравнили рост штаммов [*GLN3*[↑]] и [*gln3*[↑]] на среде с рапамицином. В результате проведенных экспериментов было установлено, что сверхпродукция Gln3 ([*gln3*[↑]]) вызывает сильное подавление роста дрожжей на среде с 5 нг/мл рапамицина, в то время как прионизация Gln3 восстанавливает устойчивость штаммов к рапамицину (Рисунок 24Г) [Antonets *et al.*, 2019].

Поскольку детерминант $[GLN3\uparrow^+]$ продемонстрировал соответствие всем основным свойствам дрожжевого приона, а также показал наличие собственного фенотипического проявления, для финального подтверждения прионных свойств $[GLN3\uparrow^+]$ мы провели проверку его агрегации при помощи седиментационного анализа. Полученные данные показали, что в штамме $[GLN3\uparrow^+]$ большая часть белка Gln3-YFP находится в осадочной фракции, а в штамме $[gln3\uparrow^-]$ – в растворимой (Рисунок 24Д). Более того, обработка проб $[GLN3\uparrow^+]$ ионным детергентом N-лаурил саркозинатом натрия (3%, 10 мин. при 4°C) выявила устойчивость агрегатов $[GLN3\uparrow^+]$ к этому детергенту (Рисунок 24Д). Таким образом, белок Gln3-YFP формирует два биохимически отличающихся состояния: детергент-устойчивое агрегированное в штаммах $[GLN3\uparrow^+]$ и растворимое в штаммах $[gln3\uparrow^-]$ [Antonets *et al.*, 2019].

В целом, можно констатировать, что $[GLN3\uparrow^+]$ обладает ключевыми свойствами прионов дрожжей: инфекционностью, доминантностью по отношению к $[gln3\uparrow^-]$, зависимостью от антиприонных агентов и индуцируемостью при сверхпродукции структурного белка на особом генетическом фоне (при совместной сверхпродукции с QN-обогащенным фрагментом Gln3 в присутствии приона $[PIN^+]$, являющегося индуктором агрегации Gln3QN (Рисунок 25)) [Antonets *et al.*, 2019].

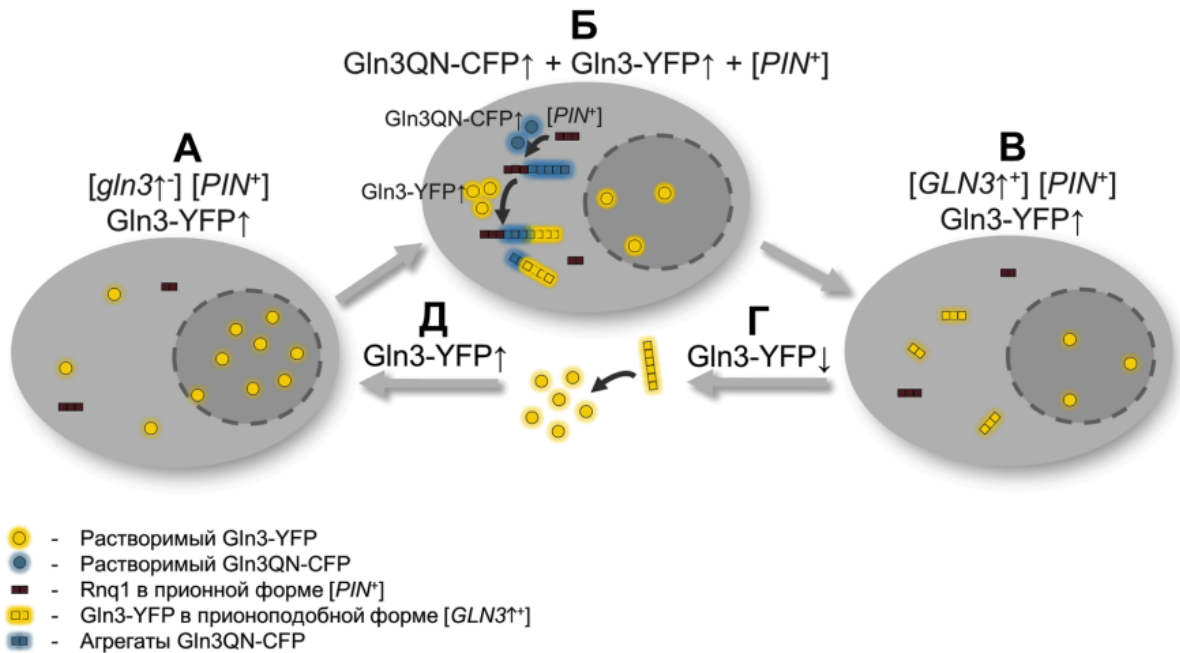


Рисунок 25. «Жизненный цикл» нехромосомного детерминанта [GLN3↑⁺]: индукция, поддержание, элиминация. **А.** При сверхэкспрессии Gln3-YFP не происходит его агрегация, белок локализован в ядре. **Б.** Прион [PIN⁺] вызывает агрегацию Gln3QN-CFP при сверхпродукции, что влечет за собой образование агрегатов Gln3-YFP в цитоплазме. **В.** Агрегированное состояние Gln3-YFP стабильно поддерживается и наследуется в митозе после прекращения сверхпродукции Gln3QN-CFP. **Г.** Прекращение сверхпродукции Gln3-YFP вызывает потерю [GLN3↑⁺]. **Д.** Сверхпродукция Gln3-YFP после элиминации [GLN3↑⁺] не приводит к возникновению [GLN3↑⁺] *de novo* [Antonets *et al.*, 2019].

Наиболее явно выраженным отличием прионного детерминанта [GLN3↑⁺] от ранее описанных дрожжевых прионов является поддержание только при постоянной сверхпродукции его структурного белка Gln3 (Рисунок 25). Мы предлагаем термин «условные прионы» [Antonets *et al.*, 2019] для таких белков как Gln3, чтобы отличать их от истинных (*bona fide*) прионов, поддержание которых эффективно происходит при физиологическом уровне продукции, а также «искусственных» прионов, формируемых белками

с измененной по сравнению с нативной первичной структурой (такими как изолированные прионогенные фрагменты или синтетические пептиды с прионными свойствами [Alberti *et al.*, 2009; Crist *et al.*, 2003; Osherovich *et al.*, 2004]). К истинным прионам могут быть отнесены соответствующие конформационные изоформы белков Sup35, Ure2, Rnq1, Mot3, Swi1, Cys8, Mod5, Sfp1 и Prb [Nizhnikov *et al.*, 2016a; Wickner *et al.*, 2015], а к искусственным – QN-обогащенные фрагменты 18 белков, обладающих прионными свойствами, включая Gln3QN [Alberti *et al.*, 2009; Antonets *et al.*, 2019; Antonets, Sargsyan, Nizhnikov, 2016]. К условным прионам, помимо Gln3, вероятно, мог бы быть отнесен белок Lsb2, формирующий при сверхпродукции, возникающей в ответ на тепловой шок, метастабильное состояние [LSB^+] [Chernova *et al.*, 2017]. Детерминант [LSB^+] соответствует основным критериям прионов, однако для него не была в явной форме показана инфекционность [Chernova *et al.*, 2017], поэтому делать однозначное заключение о его прионной природе представляется преждевременным.

Помимо уже описанных прионных детерминантов в протеоме дрожжей потенциально может быть найдено значительное число новых прионов, в том числе и взаимодействующих друг с другом. Так, десять дрожжевых регуляторных комплексов в своем составе несколько QN-обогащенных белков, потенциально склонных к прионизации, причем в состав трех из этих комплексов (Cys8/Tup1, Swi/Snf, Pub1/Sup35) входят прионные белки [Nizhnikov *et al.*, 2016a]. Нельзя исключать, что в случае действия биотических и абиотических

стрессовых факторов или каких-либо иных воздействий уровень продукции белков, составляющих эти комплексы, мог бы меняться, и их компоненты приобретали бы свойства условных прионов, придающих, подобно прионоподобному состоянию [*LSB⁺*] [Chernova *et al.*, 2017], определенные адаптивные преимущества штаммам, которые их продуцируют.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании впервые описаны функциональные амилоиды у растений. Так, в результате биоинформатического анализа протеомов 75 видов наземных растений установлено, что эволюционно консервативные запасные белки семян 7S-глобулины обогащены амилоидогенными участками у большинства растений [Antonets, Nizhnikov, 2017a]. В результате экспериментальной проверки показано, что 7S-глобулин Вицилин гороха *Pisum sativum* обладает амилоидными свойствами *in vivo* и *in vitro* [Antonets *et al.*, 2020]. Вицилин представляет собой бикупиновый белок, имеющий два консервативных домена Cupin-1 со структурой типа «β-баррель»; оба этих домена образуют амилоиды *in vitro* и являются амилоидогенными детерминантами в молекуле полноразмерного белка. Амилоиды вицилина накапливаются по мере созревания семян, а затем разбираются при прорастании, вероятно, путем ограниченного протеолиза. Эти амилоиды экстремально стабильны, присутствуют в консервированных семенах гороха, выдерживают обработку ферментами пищеварительного тракта в физиологических концентрациях, обладают токсичностью для клеток грибов и млекопитающих [Antonets *et al.*, 2020]. Таким образом, нами впервые показано, что амилоидогенез является физиологическим механизмом, контролирующим запасание белка в семенах растений, являющихся важным компонентом рациона питания человека и источником аллергенов. Полученные данные могут иметь

существенную ценность для сельского хозяйства и пищевой биотехнологии в контексте создания путем направленного редактирования генома новых сортов растений со сниженными амилоидогенными свойствами запасных белков семян для увеличения их пищевой ценности и снижения аллергенности. Согласно мнению, высказанному в недавнем обзоре Сантоса и Вентуры, идентификация функциональных амилоидов у растений завершила картину, иллюстрирующую глобальную распространенность амилоидов и их ключевую роль в адаптационных стратегиях различных систематических групп живых организмов [Santos, Ventura, 2021].

В данной работе впервые идентифицированы амилоидные белки у симбиотических бактерий. Так, описанные нами амилоиды белков наружной мембраны RopA и RopB, обладающих структурой типа « β -баррель», образуются *in vivo* у клубеньковой бактерии *R. leguminosarum*. Количество амилоидов RopA увеличивается при стимуляции бактериальных клеток флавоноидом лютеолином, который вызывает у этих микроорганизмов ответ, сходный с наблюдаемым на начальных стадиях формирования растительно-микробного симбиоза [Kosolapova *et al.*, 2019]. Эти данные свидетельствуют в пользу вовлеченности амилоидогенеза в симбиотические надорганизменные взаимодействия [Kosolapova *et al.*, 2020].

Экспериментальное сравнение фракций потенциально амилоидогенных детергент-устойчивых белков в протеомах

патогенных (*Escherichia coli*) [Antonets *et al.*, 2016] и симбиотических протеобактерий (*Rhizobium leguminosarum*) [Kosolapova *et al.*, 2019] показало их сходство и присутствие в составе этих фракций значительного количества факторов вирулентности, часть из которых представлена белками со структурой типа « β -баррель». Подобные результаты были получены и биоинформатическими методами при анализе протеомов патогенных и симбиотических видов порядка *Rhizobiales* [Antonets, Kliver, Nizhnikov, 2018]. Таким образом, амилоидогенез ассоциирован с вирулентностью как патогенных, так и симбиотических бактерий, а белки со структурой типа « β -баррель» представляют собой важные амилоидогенные детерминанты не только у прокариот, но и у эукариот, например, растений.

Данные, полученные нами при помощи вычислительных и экспериментальных протеомных подходов, свидетельствуют в пользу того, что реальное число амилоидов прокариот может быть значительно шире, чем предполагается сейчас. Например, муциновая металлопептидаза YghJ, контролирующая патогенез энтеротоксигенных штаммов *E. coli*, была выявлена нами во фракции белков этой бактерии, образующих детергент-устойчивые полимеры [Antonets *et al.*, 2016]. Анализ свойств ее консервативного M60-подобного пептидазного домена показал, что он образует амилоидные фибриллы как *in vitro*, так и при секреции на поверхность клеток *E. coli* [Belousov *et al.*, 2018]. Это позволяет предположить роль амилоидов подобных белков в качестве защитных структур, предохраняющей от преждевременной деградации бактериальные

факторы вирулентности в агрессивной внутренней среде многоклеточного организма-хозяина.

В настоящее время ведется активная дискуссия о роли амилоидогенеза в регуляции функциональной активности белка. Большинство исследователей склоняется к тому, что амилоидогенез инактивирует белки вследствие включения в агрегаты. В рамках настоящего исследования проведен детальный сравнительный анализ эффектов делеционной инактивации и прионизации (образования инфекционных амилоидов) белка Swi1 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Показано, что, несмотря на фенотипическое сходство проявлений делеции и прионизации Swi1, в их основе лежат различные молекулярные механизмы. Так, делеция *SWI1* вызывает у гаплоидных штаммов дрожжей, исследованных нами, комплекс аномалий, включающих стабильно наследуемую дисомию по первой хромосоме, подавление экспрессии локусов *RDN*, контролирующих продукцию структурных белков и РНК рибосомы, а также общую репрессию почти всех компонентов трансляционного аппарата [Antonets *et al.*, 2017; Malovichko *et al.*, 2019]. Прионизация Swi1 не только не вызывает таких эффектов, но селективно влияет на экспрессию генома, вызывая активацию и репрессию ряда метаболических каскадов [Malovichko *et al.*, 2019]. Таким образом, результаты настоящей работы вносят вклад в понимание функциональных основ работы конформационных белковых матриц, демонстрируя, что прионизация белка не только не тождественна делеции кодирующего его гена (loss-of-function), но может действовать и подобно мутации, изменяющей функцию гена (gain-of-function).

Другим аспектом системы конформационных белковых матриц, который был изучен в данной работе, явилось изучение особенностей их поддержания. Нами был впервые описан прион белка Gln3, названный [*GLN3*[↑]], который поддерживается и передается в ряду клеточных поколений только при сверхпродукции [Antonets *et al.*, 2019; Antonets, Sargsyan, Nizhnikov, 2016]. Таким образом, в рамках настоящего исследования охарактеризован новый класс белков, не способных к прионизации в физиологических условиях, но приобретающих и поддерживающих прионные свойства при изменении условий продукции без изменения первичной структуры. Такие прионы были названы нами «условными» [Antonets *et al.*, 2019]. На основании полученных данных нами предложена следующая система классификации прионов: истинные (белки, обладающие прионными свойствами в физиологических условиях), условные (приобретающие прионные свойства без изменения аминокислотной последовательности, но при изменении условий, например, сверхпродукции) и искусственные (образующиеся при изменении первичной структуры белка) [Antonets *et al.*, 2019].

Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные вносят значительный вклад как в изучение биологического разнообразия белковых конформационных матриц – амилоидов, впервые идентифицированных нами у растений и симбиотических бактерий, так и в понимание закономерностей их формирования и поддержания (на примере условных прионов), а также действия (в качестве факторов, изменяющих функцию белка).

ВЫВОДЫ

1. Амилоидогенез является механизмом запасания и хранения белка в семенах наземных растений.

1.1. Запасные белки семян являются одними из наиболее обогащенных амилоидогенными участками белков в протеомах наземных растений, причем консервативные домены запасных белков семян, относящиеся к семейству Cupin-1, содержат такие участки у большинства видов наземных растений и образуют амилоиды *in vitro*.

1.2. Запасной белок семян вицилин гороха *P. sativum* образует амилоиды *in vivo* и *in vitro*, причем амилоиды вицилина выдерживают обработку протеазами желудочно-кишечного тракта, сохраняются при консервировании семян и обладают токсичностью для клеток эукариот.

2. Амилоидогенез опосредует вирулентность бактерий, причем амилоидными свойствами обладают факторы вирулентности, вовлеченные как в патогенез, так и в формирование симбиотических отношений.

2.1. Белки наружной мембраны RopA и RopB альфапротеобактерии *R. leguminosarum*, вовлеченные в формирование микробно-растительного симбиоза, образуют амилоиды *in vivo* и *in vitro*.

2.2. Муциновая металлопептидаза YghJ, опосредующая патогенез энтеротоксигенных штаммов гаммапротеобактерии *E. coli*, обладает амилоидогенными свойствами.

3. Белки, обладающие структурой типа «β-баррель», являются амилоидогенными детерминантами в протеомах прокариот и эукариот.

4. Прионизация белка может приводить не к его инактивации, а к изменению функций.

4.1. Прионизация *Swi1* и делеция его структурного гена оказывают глобальное влияние на экспрессию дрожжевого генома, причем как делеция, так и прионизация вызывают целый ряд специфичных эффектов, включающих в себя и активацию, и подавление различных клеточных процессов.

4.2. Делеционная инактивация гена *SWI1* и прионизация белка *Swi1* имеют сходные фенотипические проявления, в основе которых лежат разные молекулярные механизмы.

5. Показано, что существуют прионные детерминанты, поддержание которых происходит только при сверхпродукции их структурных белков.

5.1. Предложена классификация прионов на истинные (обладающие прионными свойствами в нативных условиях без изменения первичной структуры), условные (обладающие прионными свойствами при сверхпродукции или каком-либо ином изменении условий, но без изменения первичной структуры) и искусственные (белки с измененной первичной структурой).

5.2. Транскрипционный регулятор *Gln3* дрожжей *S. cerevisiae* обладает свойствами условного приона.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Antonets K.S., Belousov M.V., Sulatskaya A.I., Belousova M.E., Kosolapova A.O., Sulatsky M.I., Andreeva E.A., Zykin P.A., Malovichko Y.V., Shtark O.Y., Lykholay A.N., Volkov K.V., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Kochetkova E.Y., Bobylev A.G., Usachev K.S., Demidov O.N., Tikhonovich I.A., Nizhnikov A.A. Accumulation of storage proteins in plant seeds is mediated by amyloid formation // PLOS Biology, 2020, V.18(7), e3000564. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000564>

2. Kosolapova A.O., Antonets K.S., Belousov M.V., Nizhnikov A.A. Biological functions of prokaryotic amyloids in the interspecies interactions: facts and assumptions // International Journal of Molecular Sciences, 2020, V.21(19), e7240. <https://doi.org/10.3390/ijms21197240>

3. Malovichko Y.V., Shtark O.Y., Vasileva E.N., Nizhnikov A.A., Antonets K.S. Transcriptomic insights into mechanisms of early seed maturation in garden pea (*Pisum sativum* L.) // Cells, 2020, V.9(3), e779. <https://doi.org/10.3390/cells9030779>

4. Kosolapova A.O., Belousov M.V., Sulatskaya A.I., Belousova M.E., Sulatsky M.I., Antonets K.S., Volkov K.V., Lykholay A.N., Shtark O.Y., Vasilieva E.N., Zhukov V.A., Ivanova A.N., Zykin P.A., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Tikhonovich I.A., Nizhnikov A.A. Two Novel Amyloid Proteins, RopA and RopB, from the Root Nodule Bacterium *Rhizobium leguminosarum* // Biomolecules, 2019, V.9(11), e694. <https://doi.org/10.3390/biom9110694>

5. 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, V.10(3), e212. <https://doi.org/10.3390/genes10030212>

6. Antonets K.S., Belousov M.V., Belousova M.E., Nizhnikov A.A. The Gln3 transcriptional regulator of *Saccharomyces cerevisiae* manifests prion-like properties upon overproduction // *Biochemistry (Moscow)*, 2019, V.84(4), P.441-451. <https://doi.org/10.1134/S0006297919040126>

7. Antonets K.S., Kliver S.F., Nizhnikov A.A. Exploring proteins containing amyloidogenic regions in the proteomes of bacteria of the order *Rhizobiales* // *Evolutionary Bioinformatics*, 2018, V.14, 1176934318768781. <https://doi.org/10.1177/1176934318768781>

8. Belousov M.V., Bondarev S.A., Kosolapova A.O., Antonets K.S., Sulatskaya A.I., Sulatsky M.I., Zhouravleva G.A., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Nizhnikov A.A. M60-like metalloprotease domain of the *Escherichia coli* YghJ protein forms amyloid fibrils // *PLOS One*, 2018, V.13(1), e0191317. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191317>

9. Bondarev S.A., Antonets K.S., Kajava A.V., Nizhnikov A.A., Zhouravleva G.A. Protein co-aggregation related to amyloids: methods of investigation, diversity and classification // *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, V.19(8), e2292. <https://doi.org/10.3390/ijms19082292>

10. Antonets K.S., Nizhnikov A.A. Predicting amyloidogenic proteins in the proteomes of plants // International Journal of Molecular Sciences, 2017, V.18(10), e2155. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18102155>

11. Antonets K.S., Nizhnikov A.A. Amyloids and prions in plants: facts and perspectives // Prion, 2017, V.11(5), P.300-312. <https://doi.org/10.1080/19336896.2017.1377875>

12. Antonets K.S., Kliver S.F., Polev D.E., Shuvalova A.R., Andreeva E.A., Inge-Vechtomov S.G., Nizhnikov A.A. Distinct Mechanisms of Phenotypic Effects of Inactivation and Prionization of Swi1 Protein in *Saccharomyces cerevisiae* // Biochemistry (Moscow), 2017, V.82(10), P.1147-1157. <https://doi.org/10.1134/S0006297917100078>

13. 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, V.12(12), e1006504. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006504>

14. Nizhnikov A.A., Antonets K.S., Bondarev S.A., Inge-Vechtomov S.G., Derkatch I.L. Prions, Amyloids, and RNA: Pieces of a Puzzle // Prion, 2016, V.10(3), P.182-206. <https://doi.org/10.1080/19336896.2016.1181253>

15. Antonets K.S., Sargsyan H.M., Nizhnikov A.A. A glutamine/asparagine-rich fragment of Gln3, but not the full-length protein, aggregates in *Saccharomyces cerevisiae* // Biochemistry (Moscow), 2016, V.81(4), P.407-413. <https://doi.org/10.1134/S0006297916040118>
16. Antonets K.S., Volkov K.V., Maltseva A.L., Arshakian L.M., Galkin A.P., Nizhnikov A.A. Proteomic analysis of *Escherichia coli* protein fractions resistant to solubilization by ionic detergents // Biochemistry (Moscow), 2016, V.81(1), P.34-46. <https://doi.org/10.1134/S0006297916010041>
17. Nizhnikov A.A., Antonets K.S., Inge-Vechtomov S.G. Amyloids: from pathogenesis to function // Biochemistry (Moscow), 2015, V.80(9), P.1127-1144. <https://doi.org/10.1134/S0006297915090047>
18. 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, V.9(12), e116003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116003>
19. Nizhnikov A.A., Antonets K.S., Inge-Vechtomov S.G., Derkatch I.L. Modulation of efficiency of translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*: turning nonsense into sense // Prion, 2014, V.8(3), P.247-260. <https://doi.org/10.4161/pri.29851>
20. Antonets K.S., Nizhnikov A.A. SARP: a novel algorithm to assess compositional biases in protein sequences // Evolutionary Bioinformatics, 2013, V.9, P.263-273. <https://doi.org/10.4137/EBO.S12299>

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

<i>Ак.</i>	Аминокислота (аминокислоты)
<i>Амилоид</i>	Фибриллярный белковый агрегат, обладающий кросс- β структурой и образующийся <i>in vivo</i>
<i>Амилоидом</i>	Совокупность амилоидных белков (включая инфекционные прионные амилоиды) клетки, ткани, органа, организма или надорганизменной системы
<i>Амилоидогенез</i>	Совокупность процессов, обуславливающих образование амилоидных фибрилл какого-либо белка (белков)
<i>Амилоидогенный белок</i>	Белок, способный образовывать амилоидные фибриллы <i>in vitro</i>
<i>ВЭЖХ</i>	Высокоэффективная жидкостная хроматография
<i>ГГХ</i>	Гуанидин гидрохлорид
<i>ГФИП</i>	Растворитель гексафторизопропанол
<i>ДСН</i>	Ионный детергент додецил-сульфат натрия
<i>КК</i>	Краситель конго красный
<i>Мин.</i>	Минуты

<i>Потенциально амилоидогенный белок</i>	Белок, содержащий потенциально амилоидогенные участки, предсказанные каким-либо биоинформатически алгоритмом (алгоритмами)
<i>Потенциально амилоидогенный участок, ПАУ</i>	Участок белка, потенциально склонный к формированию амилоидных фибрилл, на основе биоинформатических предсказаний
<i>Прион</i>	Белок, одна или несколько конформаций которого обладает инфекционными свойствами <i>in vivo</i> (большинство известных прионов представляют собой инфекционные амилоиды)
<i>С. о.</i>	Стандартное отклонение
<i>ТфТ</i>	Краситель тиофлавин-Т
<i>Ч.</i>	Часы
<i>Аβ</i>	Амилоидный пептид β человека (1-40 ак.)
<i>CFP</i>	Cyan Fluorescent Protein, Синий флуоресцентный белок
<i>FDR</i>	False Discovery Rate, Ожидаемая доля ложных отклонений
<i>IVPD</i>	<i>In vitro</i> Protein Digestibility Assay, методика переваривания белков <i>in vitro</i>
<i>SDD-AGE</i>	Полуденатурирующий детергентами гель-электрофорез белка в агарозном геле

<i>SDS-PAGE</i>	Электрофорез белков по Лэммли в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия
<i>qPCR</i>	Количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
<i>YFP</i>	Yellow Fluorescent Protein, Желтый флуоресцентный белок

В работе использованы стандартные однобуквенные обозначения аминокислот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ahmed A.B. et al. A structure-based approach to predict predisposition to amyloidosis // *Alzheimers Dement.* 2014. V. 11. № 6. P. 681–690.
2. Akkerdaas J. et al. Protease resistance of food proteins: A mixed picture for predicting allergenicity but a useful tool for assessing exposure // *Clin. Transl. Allergy.* 2018. V. 8. P. 30.
3. Alberti S. et al. A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins // *Cell.* 2009. V. 137. № 1. P. 146–158.
4. Alexa A., Rahnenfuhrer J. topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology. R package version 2.28.0 // 2016.
5. Angelovici R. et al. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination // *Trends Plant Sci.* 2010. V. 15. № 4. P. 211–218.
6. Ano Bom A.P. et al. Mutant p53 aggregates into prion-like amyloid oligomers and fibrils: implications for cancer // *J Biol Chem.* 2012. V. 287. № 33. P. 28152–28162.
7. Antonets K.S., Nizhnikov A.A. SARP: A Novel Algorithm to Assess Compositional Biases in Protein Sequences // *Evol. Bioinform.* 2013. V. 9. P. 263–273.
8. Antonets K.S., Sargsyan H.M., Nizhnikov A.A. A glutamine/asparagine-rich fragment of Gln3, but not the full-length protein, aggregates in *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochemistry (Mosc.)*. 2016. V. 81. № 4. P. 407–413.

9. Antonets K.S. *et al.* Proteomic analysis of *Escherichia coli* protein fractions resistant to solubilization by ionic detergents // Biochemistry (Mosc.). 2016. V. 81. № 1. P. 34–46.
10. Antonets K.S. *et al.* Distinct mechanisms of phenotypic effects of inactivation and prionization of Swi1 protein in *Saccharomyces cerevisiae* // Biochemistry (Mosc.). 2017. V. 82. № 10. P. 1147–1157.
11. Antonets K.S., Nizhnikov A.A. Predicting amyloidogenic proteins in the proteomes of plants // Int. J. Mol. Sci. 2017a. V. 18. № 10. P. e2155.
12. Antonets K.S., Nizhnikov A.A. Amyloids and prions in plants: facts and perspectives // Prion. 2017b. V. 11. № 5. P. 300–312.
13. Antonets K.S., Kliver S.F., Nizhnikov A.A. Exploring Proteins Containing Amyloidogenic Regions in the Proteomes of Bacteria of the Order *Rhizobiales* // Evol. Bioinform. 2018. V. 14. P. 1176934318768781.
14. Antonets K.S. *et al.* The Gln3 transcriptional regulator of *Saccharomyces cerevisiae* manifests prion-like properties upon overproduction // Biochemistry (Mosc.). 2019. V. 84. № 4. P. 441–451.
15. Antonets K.S. *et al.* Accumulation of storage proteins in plant seeds is mediated by amyloid formation // PLOS Biol. 2020. V. 18. № 7. P. e3000564.
16. Aoyagi A. *et al.* A β and tau prion-like activities decline with longevity in the Alzheimer's disease human brain // Sci. Transl. Med. 2019. V. 11. № 490. P. eaat8462.

17. Araki K. *et al.* Parkinson's disease is a type of amyloidosis featuring accumulation of amyloid fibrils of α -synuclein // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2019. V. 116. № 36. P. 17963–17969.
18. Audas T.E. *et al.* Adaptation to stressors by systemic protein amyloidogenesis // Dev. Cell. 2016. V. 39. № 2. P. 155–168.
19. Baker K.R., Rice L. The amyloidoses: clinical features, diagnosis and treatment // Methodist Debaquey Cardiovasc. J. 2012. V. 8. № 3. P. 3–7.
20. Bateman D.A., Wickner R.B. The [PSI⁺] Prion Exists as a Dynamic Cloud of Variants // PLOS Genet. 2013. V. 9. № 1. P. e1003257.
21. Baxa U. *et al.* Mechanism of inactivation on prion conversion of the *Saccharomyces cerevisiae* Ure2 protein // Proc Natl Acad Sci U S A. 2002. V. 99. № 8. P. 5253–5260.
22. Belousov M.V. *et al.* M60-like metalloprotease domain of the *Escherichia coli* YghJ protein forms amyloid fibrils // PLOS One. 2018. V. 13. № 1. P. e0191317.
23. Bennhold H. Specific staining of amyloid by Congo red // Muenchen. Med. Wochenschr. 1922. V. 69. P. 1537–1538.
24. Benson M.D. *et al.* Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee // Amyloid. 2018. V. 25. № 4. P. 215–219.
25. Berthelot K. *et al.* *Hevea brasiliensis* prohevein possesses a conserved C-terminal domain with amyloid-like properties *in vitro* // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics. 2016. V. 1864. № 4. P. 388–399.

26. Blancas-Mejía L.M., Ramirez-Alvarado M. Systemic amyloidoses // *Annu. Rev. Biochem.* 2013. V. 82. P. 745–774.
27. Blanco L.P. *et al.* Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids // *Trends Microbiol.* 2012. V. 20. № 2. P. 66–73.
28. Bolton D.C., McKinley M.P., Prusiner S.B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion // *Science.* 1982. V. 218. № 4579. P. 1309–1311.
29. Bondarev S.A. *et al.* Protein co-aggregation related to amyloids: Methods of investigation, diversity, and classification // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 8. P. e2292.
30. Borisov A.Y. *et al.* Sequential functioning of *Sym-13* and *Sym-31*, two genes affecting symbiosome development in root nodules of pea (*Pisum sativum* L.) // *Mol. Gen. Genet.* 1997. V. 254. № 5. P. 592–598.
31. Cao Y. *et al.* The role of plant innate immunity in the legume-*Rhizobium* symbiosis // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2017. V. 68. P. 535–561.
32. Cao Y., Mezzenga R. Food protein amyloid fibrils: Origin, structure, formation, characterization, applications and health implications // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2019. V. 269. P. 334–356.
33. Cardenas M.E. *et al.* The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients // *Genes Dev.* 1999. V. 13. № 24. P. 3271–3279.
34. Carneiro K.M.M. *et al.* Amyloid-like ribbons of amelogenins in enamel mineralization // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. e23105.

35. Carvalho F.M. *et al.* Genomic and evolutionary comparisons of diazotrophic and pathogenic bacteria of the order *Rhizobiales* // BMC Microbiol. 2010. V. 10. P. e37.

36. Chakrabortee S. *et al.* Luminidependens (LD) is an *Arabidopsis* protein with prion behavior. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2016. V. 113. № 21. P. 6065–6070.

37. Chakravarty A.K. *et al.* A Non-amyloid Prion Particle that Activates a Heritable Gene Expression Program // Mol. Cell. 2020. V. 77. № 2. P. 251–265.e9.

38. Chaturvedi D., Mahalakshmi R. Transmembrane β -barrels: Evolution, folding and energetics // Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 2017. V. 1859. № 12. P. 2467–2482.

39. Chernoff Y.O. *et al.* Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [*psi*⁺] // Science. 1995. V. 268. № 5212. P. 880–884.

40. Chernova T.A., Wilkinson K.D., Chernoff Y.O. Physiological and environmental control of yeast prions // FEMS Microbiol. Rev. 2014. V. 38. № 2. P. 326–344.

41. Chernova T.A. *et al.* Yeast short-lived actin-associated protein forms a metastable prion in response to thermal stress // Cell Rep. 2017. V. 18. № 3. P. 751–761.

42. Chimileski S., Franklin M.J., Papke R.T. Biofilms formed by the archaeon *Haloferax volcanii* exhibit cellular differentiation and social motility, and facilitate horizontal gene transfer // BMC Biol. 2014. V. 12. № 1. P. 65.

43. Chiti F., Dobson C.M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease // *Annu. Rev. Biochem.* 2006. V. 75. P. 333–366.
44. Chong Y.T. *et al.* Yeast proteome dynamics from single cell imaging and automated analysis // *Cell.* 2015. V. 161. № 6. P. 1413–1424.
45. Chrispeels M.J., Higgins T.J.V., Spencer D. Assembly of storage protein oligomers in the endoplasmic reticulum and processing of the polypeptides in the protein bodies of developing pea cotyledons // *J. Cell Biol.* 1982. V. 93. № 2. P. 306–313.
46. Cobb N.J., Surewicz W.K. Prion diseases and their biochemical mechanisms // *Biochemistry.* 2009. V. 48. № 12. P. 2574–2585.
47. Cohen A.S., Calkins E. Electron Microscopic Observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins // *Nature.* 1959. V. 183. № 4669. P. 1202–1203.
48. Colaco M., Park J., Blanch H. The kinetics of aggregation of poly-glutamic acid based polypeptides // *Biophys. Chem.* 2008. V. 136. № 2–3. P. 74–86.
49. Costerton J.W. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection // *Trends Microbiol.* 2001. V. 9. № 2. P. 50–52.
50. Coustou V. *et al.* The protein product of the *het-s* heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997. V. 94. № 18. P. 9773–9778.

51. Cox K. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* GATA sequences function as TATA elements during nitrogen catabolite repression and when Gln3p is excluded from the nucleus by overproduction of Ure2p // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 23. P. 17611–17618.
52. Crick F. Central dogma of molecular biology // *Nature.* 1970. V. 227. № 5258. P. 561-563.
53. Crist C.G. *et al.* [*PHI*⁺], a novel Sup35-prion variant propagated with non-Gln/Asn oligopeptide repeats in the absence of the chaperone protein Hsp104 // *Genes to Cells.* 2003. V. 8. № 7. P. 603–618.
54. Danoff E.J., Fleming K.G. Aqueous, Unfolded OmpA forms amyloid-like fibrils upon self-association // *PLOS One.* 2015. V. 10. № 7. P. e0132301.
55. Dechassa M.L. *et al.* Architecture of the SWI/SNF-nucleosome complex. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. № 19. P. 6010–6021.
56. Derkatch I.L. *et al.* Prions affect the appearance of other prions: The story of [*PIN*⁺] // *Cell.* 2001. V. 106. № 2. P. 171–182.
57. Derkatch I.L., Liebman S.W. Prion-prion interactions // *Prion.* 2007a. V. 1. № 3. P. 161–169.
58. Derkatch I.L., Liebman S.W. Prion-prion interactions // *Prion.* 2007b. V. 1. № 3. P. 161–169.
59. DiFiglia M. *et al.* Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain // *Science.* 1997. V. 277. № 5334. P. 1990–1993.
60. Divry P., Florkin M. Sur les proprietes optiques de l'amyloid // *Soc. Biol.* 1927. № 97. P. 1808–1810.

61. Dobson C.M. Protein folding and misfolding // Nature. 2003. V. 426. № 6968. P. 884–890.
62. Dobson C.M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation // Semin. Cell Dev. Biol. 2004. V. 15. № 1. P. 3–16.
63. Du Z. *et al.* Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae* // Nat Genet. 2008. V. 40. № 4. P. 460–465.
64. Dueholm M.S. *et al.* The tubular sheaths encasing *Methanosaeta thermophila* filaments are functional amyloids // J Biol Chem. 2015. V. 290. № 33. P. 20590–20600.
65. Dunwell J.M., Purvis A., Khuri S. Cupins: The most functionally diverse protein superfamily? // Phytochemistry. 2004. V. 65. № 1. P. 7–17.
66. Dutta A. *et al.* Swi/Snf dynamics on stress-responsive genes is governed by competitive bromodomain interactions // Genes Dev. 2014. V. 28. № 20. P. 2314–2330.
67. Eanes E.D., Glenner G.G. X-ray diffraction studies on amyloid filaments // J Histochem Cytochem. 1968. V. 16. № 11. P. 673–677.
68. Ferreira P.C. *et al.* The elimination of the yeast $[PSI^+]$ prion by guanidine hydrochloride is the result of Hsp104 inactivation // Mol Microbiol. 2001. V. 40. № 6. P. 1357–1369.
69. Fioriti L. *et al.* The Persistence of Hippocampal-Based Memory Requires Protein Synthesis Mediated by the Prion-like Protein CPEB3 // Neuron. 2015. V. 86. № 6. P. 1433–1448.

70. Fitzpatrick A.W.P. *et al.* Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2013. V. 110. № 14. P. 5468–5473.
71. Fowler D.M. *et al.* Functional amyloid formation within mammalian tissue // PLOS Biol. 2006. V. 4. № 1. P. e6.
72. Friedreich N., Kekule F.A. Zur Amyloidfrage // Virchows Arch. Path. Anat. Physiol. 1859. V. 16. P. 50–65.
73. Frolova L. *et al.* A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor // Nature. 1994. V. 372. № 6507. P. 701–703.
74. Garnczarska M., Zalewski T., Wojtyła Ł. A comparative study of water distribution and dehydrin protein localization in maturing pea seeds // J. Plant Physiol. 2008.
75. Garvey M. *et al.* A radish seed antifungal peptide with a high amyloid fibril-forming propensity // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics. 2013. V. 1834. № 8. P. 1615–1623.
76. Gerven N. Van *et al.* The Role of Functional Amyloids in Bacterial Virulence // J. Mol. Biol. 2018. V. 430. № 20. P. 3657–3684.
77. Ginestet C. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis // J. R. Stat. Soc. Ser. A (Statistics Soc.) 2011. V. 174. № 1. P. 245–246.
78. Gomes V.M. *et al.* Vicilin Storage Proteins from *Vigna unguiculata* (Legume) Seeds Inhibit Fungal Growth // J. Agric. Food Chem. 1997. V. 45. № 10. P. 4110–4115.

79. Gour S. *et al.* Antimicrobial peptide (Cn-AMP2) from liquid endosperm of *Cocos nucifera* forms amyloid-like fibrillar structure // J. Pept. Sci. 2016. V. 22. № 4. P. 201–207.

80. Hafeez F.Y. *et al.* Symbiotic effectiveness and bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from agriculture soils in Faisalabad // Environ. Exp. Bot. 2005. V. 54. № 2. P. 142–147.

81. Harrison P.M., Gerstein M. A method to assess compositional bias in biological sequences and its application to prion-like glutamine/asparagine-rich domains in eukaryotic proteomes // Genome Biol. 2003. V. 4. № 6. P. R40.

82. Harvey Z.H. *et al.* A Prion epigenetic switch establishes an active chromatin state // Cell. 2020. V. 180. № 5. P. 928–940.e14.

83. Hejair H.M.A. *et al.* Functional role of ompF and ompC porins in pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli* // Microb. Pathog. 2017. V. 107. P. 29–37.

84. Hobbs J.R., Morgan A.D. Fluorescence microscopy with thioflavine-t in the diagnosis of amyloid // J. Pathol. Bacteriol. 1963. V. 86. P. 437–442.

85. Hoiczyk E. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins // EMBO J. 2000. V. 19. № 22. P. 5989–5999.

86. Holmes D.L. *et al.* Heritable remodeling of yeast multicellularity by an environmentally responsive prion // Cell. 2013. V. 153. № 1. P. 153–165.

87. Howie A.J. *et al.* Physical basis of colors seen in Congo red-stained amyloid in polarized light // *Lab. Investig.* 2008. V. 88. № 3. P. 232–242.
88. Iconomidou V.A., Vriend G., Hamodrakas S.J. Amyloids protect the silkworm oocyte and embryo // *FEBS Lett.* 2000. V. 479. № 3. P. 141–145.
89. Imam J., Singh P.K., Shukla P. Plant microbe interactions in post genomic era: Perspectives and applications // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 1488.
90. Inge-Vechtomov S.G. [The template principle: paradigm of modern genetics]. // *Genetika.* 2013. V. 49. № 1. P. 9–15.
91. Inge-Vechtomov S.G. From chromosome theory to the template principle // *Russ. J. Genet.* 2015. V. 51. № 4. P. 397–408.
92. Itakura A.K. *et al.* Widespread Prion-based control of growth and differentiation strategies in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell.* 2020. V. 77. № 2. P. 266–278.e6.
93. Jansens K.J.A. *et al.* Rational design of amyloid-like fibrillary structures for tailoring food protein techno-functionality and their potential health implications // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2019. V. 18. № 1. P. 84–105.
94. Jones K.M. *et al.* How rhizobial symbionts invade plants: The *Sinorhizobium - Medicago* model // *Nat. Rev. Microbiol.* 2007. V. 5. № 8. P. 619–633.

95. Joseph Sahaya Rajan J. *et al.* Outer membrane protein C (OmpC) of *Escherichia coli* induces neurodegeneration in mice by acting as an amyloid // *Biotechnol. Lett.* 2016. V. 38. № 4. P. 689–700.

96. Kalebina T.S. *et al.* Amyloid-like properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucantransferase Bgl2p: prediction and experimental evidences. // *Prion.* 2008. V. 2. № 2. P. 91–96.

97. Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2004. V. 2. P. 123-140.

98. Katsnelson A. Did disordered proteins help launch life on earth? // *ACS Cent. Sci.* 2020. V. 6. № 11. P. 1854–1857.

99. Kayed R. *et al.* Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers // *Mol. Neurodegener.* 2007. V. 2. P. 18.

100. Kitaeva A.B. *et al.* Comparative analysis of the tubulin cytoskeleton organization in nodules of *Medicago truncatula* and *Pisum sativum*: Bacterial release and bacteroid positioning correlate with characteristic microtubule rearrangements // *New Phytol.* 2016. V. 210. № 1. P. 168–183.

101. Kondrashkina A.M. *et al.* Prion-like determinant [NSI⁺] decreases the expression of the *SUP45* gene in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol Biol.* 2014. V. 48. № 5. P. 790–796.

102. Kosolapova A.O. *et al.* Two novel amyloid proteins, RopA and RopB, from the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* // *Biomolecules.* 2019. V. 9. № 11. P. e694

103. Kosolapova A.O. *et al.* Biological functions of prokaryotic amyloids in interspecies interactions: Facts and assumptions // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 19. P. e7240.

104. Kotloff K.L. *et al.* Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A prospective, case-control study // *Lancet.* 2013. V. 382. № 9888. P. 209–222.

105. Kraus A., Groveman B.R., Caughey B. Prions and the potential transmissibility of protein misfolding diseases // *Annu. Rev. Microbiol.* 2013. V. 67. P. 543–564.

106. Kulkarni A.A. *et al.* Gln3p Nuclear Localization and Interaction with Ure2p in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 34. P. 32136–32144.

107. Kundu D. *et al.* Advances in protein misfolding, amyloidosis and its correlation with human diseases // *3 Biotech.* 2020. V. 10. № 5. P. 193.

108. Kushnirov V. V., Ter-Avanesyan M.D. Structure and replication of yeast prions // *Cell.* 1998. V. 94. № 1. P. 13–16.

109. Kyle R.A. Amyloidosis: a convoluted story // *Br J Haematol.* 2001. V. 114. № 3. P. 529–538.

110. Lasagna-Reeves C.A. *et al.* Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau // *Sci. Rep.* 2012. V. 2. P. 700.

111. Lasagna-Reeves C.A. *et al.* Dual role of p53 amyloid formation in cancer; loss of function and gain of toxicity // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. V. 430. № 3. P. 963–968.

112. Lashuel H.A. *et al.* Protofilaments, filaments, ribbons, and fibrils from peptidomimetic self-assembly: Implications for amyloid fibril formation and materials science // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. V. 122. № 22. P. 5262–5277.

113. Linhartová I. *et al.* RTX proteins: A highly diverse family secreted by a common mechanism // *FEMS Microbiol. Rev.* 2010. V. 34. № 6. P. 1076–1112.

114. Liu Y.F. *et al.* Loss of outer membrane protein C in *Escherichia coli* contributes to both antibiotic resistance and escaping antibody-dependent bactericidal activity // *Infect. Immun.* 2012. V. 80. № 5. P. 1815–1822.

115. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. // *Methods.* 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.

116. Luk K.C. *et al.* Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice // *Science.* 2012. V. 338. № 6109. P. 949–953.

117. Luo Q. *et al.* Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes a highly conserved mucin-degrading metalloprotease to effectively engage intestinal epithelial cells // *Infect. Immun.* 2014. V. 82. № 2. P. 509–521.

118. Luo Q. *et al.* Conservation and Immunogenicity of Novel Antigens in Diverse Isolates of Enterotoxigenic *Escherichia coli* // *PLOS Negl. Trop. Dis.* 2015. V. 9. № 1. P. e0003446.

119. Maagd R.A. de *et al.* Down-regulation of expression of the *Rhizobium leguminosarum* outer membrane protein gene *ropA* occurs abruptly in interzone II-III of pea nodules and can be uncoupled from *nif* gene activation // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1994. V. 7. № 2. P. 276–281.

120. Maekawa T., Kufer T.A., Schulze-Lefert P. NLR functions in plant and animal immune systems: So far and yet so close // *Nat. Immunol.* 2011. V. 12. № 9. P. 817–826.

121. Maji S.K. *et al.* Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules // *Science.* 2009. V. 325. № 5938. P. 328–332.

122. Majumdar A. *et al.* Critical role of amyloid-like oligomers of *Drosophila* Orb2 in the persistence of memory // *Cell.* 2012. V. 148. № 3. P. 515–529.

123. Makin O.S. *et al.* Molecular basis for amyloid fibril formation and stability // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. V. 102. № 2. P. 315–320.

124. Malovichko Y.V. *et al.* RNA sequencing reveals specific transcriptomic signatures distinguishing effects of the [SWI⁺] prion and *SWI1* deletion in yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes.* 2019. V. 10. № 3. P. 212.

125. Malovichko Y.V. *et al.* Transcriptomic Insights into Mechanisms of Early Seed Maturation in the Garden Pea (*Pisum sativum* L.) // *Cells.* 2020. V. 9. № 3. P. 779.

126. Masison D.C., Reidy M. Yeast prions are useful for studying protein chaperones and protein quality control // *Prion*. 2015. V. 9. № 3. P. 174–183.

127. Maurer-Stroh S. *et al.* Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices // *Nat Methods*. 2010. V. 7. № 3. P. 237–242.

128. Maury C.P.J. Self-Propagating β -sheet polypeptide structures as prebiotic informational molecular entities: The amyloid world // *Orig. Life Evol. Biosph.* 2009. V. 39. № 2. P. 141–150.

129. Maury C.P.J. Amyloid and the origin of life: self-replicating catalytic amyloids as prebiotic informational and protometabolic entities // *Cell. Mol. Life Sci.* 2018. V. 75. № 9. P. 1499–1507.

130. McGlinchey R.P., Kryndushkin D., Wickner R.B. Suicidal [*PSI*⁺] is a lethal yeast prion // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. V. 108. № 13. P. 5337–5341.

131. McKinley M.P., Bolton D.C., Prusiner S.B. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion // *Cell*. 1983. V. 35. № 1. P. 57–62.

132. Meeto D., McGovern P., Safadi R. An epidemiological overview of diabetes across the world // *Br. J. Nurs.* 2007. V. 16. № 16. P. 1002–1007.

133. Melckebeke H.Van *et al.* Atomic-resolution three-dimensional structure of HET-s(218-289) amyloid fibrils by solid-state NMR spectroscopy // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. № 39. P. 13765–13775.

134. Michelitsch M.D., Weissman J.S. A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions // Proc Natl Acad Sci U S A. 2000. V. 97. № 22. P. 11910–11915.

135. Mostaert A.S. *et al.* Nanoscale mechanical characterisation of amyloid fibrils discovered in a natural adhesive // J. Biol. Phys. 2006. V. 32. № 5. P. 393–401.

136. Mostaert A.S. *et al.* Characterisation of amyloid nanostructures in the natural adhesive of unicellular subaerial algae // J. Adhes. 2009. V. 85. № 8. P. 465–483.

137. Naiki H. *et al.* Fluorometric determination of amyloid fibrils *in vitro* using the fluorescent dye, thioflavine T // Anal. Biochem. 1989. V. 177. № 2. P. 244–249.

138. Nakayashiki T. *et al.* Yeast prions [*URE3*] and [*PSI*⁺] are diseases // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005. V. 102. № 30. P. 10575–10580.

139. Nakjang S. *et al.* A novel extracellular metallopeptidase domain shared by animal Host-Associated mutualistic and pathogenic microbes // PLOS One. 2012. V. 7. № 1. P. e30287.

140. Nan H. *et al.* A viral expression factor behaves as a prion // Nat. Commun. 2019. V. 10. № 1. P. 359.

141. Nelson R. *et al.* Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils // Nature. 2005. V. 435. № 7043. P. 773–778.

142. Niewold T.A. *et al.* Characterization of proteoglycans and glycosaminoglycans in bovine renal AA-type amyloidosis // Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol. 1991. V. 60. № 5. P. 321–328.

143. Nizhnikov A.A. *et al.* [*NSI*⁺] determinant has a pleiotropic phenotypic manifestation that is modulated by *SUP35*, *SUP45*, and *VTS1* genes. // *Curr. Genet.* 2012. V. 58. № 1. P. 35–47.

144. Nizhnikov A.A., Kondrashkina A.M., Galkin A.P. Interactions of [*NSI*⁺] Prion-Like Determinant with *SUP35* and *VTS1* Genes in *Saccharomyces cerevisiae* // *Russ. J. Genet.* 2013. V. 49. P. 1004–1012.

145. Nizhnikov A.A. *et al.* Modulation of efficiency of translation termination in *Saccharomyces cerevisiae* // *Prion.* 2014a. V. 8. № 3. P. 247–260.

146. Nizhnikov A.A. *et al.* Proteomic screening for amyloid proteins // *PLOS One.* 2014b. V. 9. № 12. P. e116003.

147. Nizhnikov A.A. *et al.* Overexpression of genes encoding asparagine-glutamine-rich transcriptional factors causes nonsense suppression in *Saccharomyces cerevisiae* // *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2014c. V. 4. № 2. P. 122-130.

148. Nizhnikov A.A., Antonets K.S., Inge-Vechtomov S.G. Amyloids: from pathogenesis to function // *Biochemistry (Mosc.).* 2015. V. 80. № 9. P. 1127–1144.

149. Nizhnikov A.A. *et al.* Prions, Amyloids, and RNA: Pieces of a Puzzle // *Prion.* 2016a. V. 10. № 3. P. 182–206.

150. Nizhnikov A.A. *et al.* Interaction of prions causes heritable traits in *Saccharomyces cerevisiae* // *PLOS Genet.* 2016b. V. 12. № 12. P. e1006504.

151. Oh J. *et al.* Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. № 18. P. 13601–13609.

152. Osherovich L.Z. *et al.* Dissection and design of yeast prions. // PLOS Biol. 2004. V. 2. № 4. P. e86.

153. Otzen D., Riek R. Functional amyloids // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2019. V. 11. № 12. P. a033860.

154. Patel B.K., Gavin-Smyth J., Liebman S.W. The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion // Nat Cell Biol. 2009. V. 11. № 3. P. 344–349.

155. Perutz M.F. *et al.* Glutamine repeats as polar zippers: Their possible role in inherited neurodegenerative diseases // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1994. V. 91. № 12. P. 5355–5358.

156. Perutz M.F. *et al.* Aggregation of proteins with expanded glutamine and alanine repeats of the glutamine-rich and asparagine-rich domains of Sup35 and of the amyloid β -peptide of amyloid plaques // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002. V. 99. № 8. P. 5596–5600.

157. Peterson C.L., Herskowitz I. Characterization of the yeast *SWI1*, *SWI2*, and *SWI3* genes, which encode a global activator of transcription // Cell. 1992. V. 68. № 3. P. 573–583.

158. Picken M.M. The pathology of amyloidosis in classification: a review // Acta Haematol. 2020. V. 143. № 4. P. 322–334.

159. Picotti P. *et al.* Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics // Cell. 2009. V. 138. № 4. P. 795-806.

160. Pimentel H. *et al.* Differential analysis of RNA-seq incorporating quantification uncertainty // *Nat. Methods*. 2017. V. 14. № 7. P. 687–690.

161. Pras M. *et al.* The characterization of soluble amyloid prepared in water // *J. Clin. Invest.* 1968. V. 47. № 4. P. 924–933.

162. Qiang W. *et al.* Antiparallel β -sheet architecture in Iowa mutant β -amyloid fibrils // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. V. 109. № 12. P. 4443–4448.

163. Ramsook C.B. *et al.* Yeast cell adhesion molecules have functional amyloid-forming sequences // *Eukaryot. Cell*. 2010. V. 9. № 3. P. 393–404.

164. Roest H.P. *et al.* Isolation of *ropB*, a gene encoding a 22-kDa *Rhizobium leguminosarum* outer membrane protein // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1995. V. 8. № 4. P. 576–583.

165. Rogoza T. *et al.* Non-Mendelian determinant [*ISP*⁺] in yeast is a nuclear-residing prion form of the global transcriptional regulator Sfp1 // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. V. 107. № 23. P. 10573–10577.

166. Rollauer S.E. *et al.* Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2015. V. 370. № 1679. P. 20150023.

167. Romanova N.V, Chernoff Y.O. Hsp104 and prion propagation. // *Protein Pept. Lett.* 2009. V. 16. № 6. P. 598–605.

168. Romero D., Kolter R. Functional amyloids in bacteria // *Int Microbiol.* 2014. V. 17. № 2. P. 65–73.

169. Rose T.L. *et al.* Effect of sugars on the association between cowpea vicilin (7S storage proteins) and fungal cells // *Biocell*. 2003. V. 27. № 2. P. 173–179.

170. Rout S.K. *et al.* A prebiotic template-directed peptide synthesis based on amyloids // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 234.

171. Rubio L.A. *et al.* Characterization of pea (*Pisum sativum*) seed protein fractions // *J. Sci. Food Agric.* 2014. V. 94. № 2. P. 280–287.

172. Ryzhova T.A. *et al.* Screening for amyloid proteins in the yeast proteome // *Curr. Genet.* 2017. V. 64. № 2. P. 469–478.

173. Saifitdinova A.F. *et al.* [*NSI*[†]]: a novel non-Mendelian nonsense suppressor determinant in *Saccharomyces cerevisiae* // *Curr. Genet.* 2010. V. 56. № 5. P. 467–478.

174. Sales M.P. *et al.* Do legume storage proteins play a role in defending seeds against Bruchids? // *Plant Physiol.* 2000. V. 124. № 2. P. 515–522.

175. Sanchez-Monge R. *et al.* Vicilin and convicilin are potential major allergens from pea // *Clin. Exp. Allergy.* 2004. V. 34. № 11. P. 1747–1753.

176. Santos J. *et al.* Computational prediction of protein aggregation: Advances in proteomics, conformation-specific algorithms and biotechnological applications // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 1403–1413.

177. Santos J., Ventura S. Functional Amyloids Germinate in Plants // *Trends Plant Sci.* 2021. V. 26. № 1. P. 7–10.

178. Saupe S.J. Amyloid Signaling in Filamentous Fungi and Bacteria // *Annu. Rev. Microbiol.* 2020. V. 74. № 1. P. 673–691.

179. Scherpelz K.P. *et al.* Preparation of amyloid fibrils seeded from brain and meninges // *Methods Mol. Biol.* 2016. V. 1345. P. 299–312.

180. Schwartz K., Boles B.R. Microbial amyloids--functions and interactions within the host // *Curr Opin Microbiol.* 2013a. V. 16. № 1. P. 93–99.

181. Schwartz K., Boles B.R. Microbial amyloids - functions and interactions within the host // *Curr. Opin. Microbiol.* 2013b. V. 16. № 1. P. 93–99.

182. Selkoe D.J., Ihara Y., Salazar F.J. Alzheimer's disease: Insolubility of partially purified paired helical filaments in sodium dodecyl sulfate and urea // *Science.* 1982. V. 215. № 4537. P. 1243–1245.

183. Selkoe D.J. *et al.* Isolation of low-molecular-weight proteins from amyloid plaque fibers in Alzheimer's disease // *J. Neurochem.* 1986. V. 46. № 6. P. 1820–1834.

184. Shanmugam N. *et al.* Microbial functional amyloids serve diverse purposes for structure, adhesion and defence // *Biophys. Rev.* 2019. V. 11. № 3. P. 287–302.

185. Shaw L.P. *et al.* The phylogenetic range of bacterial and viral pathogens of vertebrates // *Mol. Ecol.* 2020. V. 29. № 17. P. 3361–3379.

186. Shen-Miller J. *et al.* Exceptional seed longevity and robust growth: Ancient Sacred Lotus from China // *Am. J. Bot.* 1995. V. 82. № 11. P. 1367–1380.

187. Shen-Miller J. *et al.* Centuries-old viable fruit of sacred lotus *Nelumbo nucifera* Gaertn var. China Antique // Trop. Plant Biol. 2013. V. 6. № 2-3. P. 10.1007/s12042-013-9124-2.

188. Shivaswamy S., Iyer V.R. Stress-dependent dynamics of global chromatin remodeling in yeast: dual role for SWI/SNF in the heat shock stress response. // Mol. Cell. Biol. 2008. V. 28. № 7. P. 2221–2234.

189. Si K. *et al.* A neuronal isoform of CPEB regulates local protein synthesis and stabilizes synapse-specific long-term facilitation in *Aplysia* // Cell. 2003. V. 115. № 7. P. 893–904.

190. Sipe J.D., Cohen A.S. Review: history of the amyloid fibril // J Struct Biol. 2000a. V. 130. № 2–3. P. 88–98.

191. Sipe J.D., Cohen A.S. Review: history of the amyloid fibril // J. Struct. Biol. 2000b. V. 130. № 2–3. P. 88–98.

192. Sipe J.D. *et al.* Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis // Amyloid. 2014. V. 21. № 4. P. 221–224.

193. Sivanathan V., Hochschild A. A bacterial export system for generating extracellular amyloid aggregates // Nat. Protoc. 2013. V. 8. № 7. P. 1381–1390.

194. Smaoui M.R. *et al.* Computational assembly of polymorphic amyloid fibrils reveals stable aggregates // Biophys. J. 2013. V. 104. № 3. P. 683–693.

195. Soto M.J., Sanjuán J., Olivares J. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: Common infection weapons // Microbiology. 2006. V. 152. № 11. P. 3167–3174.

196. Soufi B. *et al.* Global analysis of the yeast osmotic stress response by quantitative proteomics // *Mol. Biosyst.* 2009. V. 5. № 11. P. 1337–1346.

197. Sudarsanam P. *et al.* Whole-genome expression analysis of *snf/swi* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000. V. 97. № 7. P. 3364–3369.

198. Sunde M. *et al.* Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 273. № 3. P. 729–739.

199. Suzuki G., Shimazu N., Tanaka M. A yeast prion, Mod5, promotes acquired drug resistance and cell survival under environmental stress // *Science.* 2012. V. 336. № 6079. P. 355–359.

200. Taglialegna A., Lasa I., Valle J. Amyloid structures as biofilm matrix scaffolds // *J. Bacteriol.* 2016. V. 198. № 19. P. 2579–2588.

201. Tahir Y. El, Skurnik M. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin // *Int. J. Med. Microbiol.* 2001. V. 291. № 3. P. 209–218.

202. Tanaka M. *et al.* Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences // *Nature.* 2004. V. 428. № March. P. 323–328.

203. Tanaka M. A protein transformation protocol for introducing yeast prion particles into yeast // *Methods Enzymol.* 2010. V. 470. P. 681–693.

204. Thoma J. *et al.* Protein-enriched outer membrane vesicles as a native platform for outer membrane protein studies // *Commun. Biol.* 2018. V. 1. P. 23.

205. Tolin S. *et al.* Quantitative analysis of the naringenin-inducible proteome in *Rhizobium leguminosarum* by isobaric tagging and mass spectrometry // *Proteomics*. 2013. V. 13. № 12–13. P. 1961–1972.

206. Tsolis A.C. *et al.* A consensus method for the prediction of "aggregation-prone" peptides in globular proteins // *PLOS One*. 2013. V. 8. № 1. P. e54175.

207. Tsyganov V.E. *et al.* Developmental downregulation of rhizobial genes as a function of symbiosome differentiation in symbiotic root nodules of *Pisum sativum* // *New Phytol.* 2003. V. 159. № 2. P. 521–530.

208. Tycko R. *et al.* Evidence for novel β -sheet structures in Iowa mutant β -amyloid fibrils // *Biochemistry*. 2009. V. 48. № 26. P. 6072–6084.

209. Tycko R., Wickner R.B. Molecular structures of amyloid and prion fibrils: Consensus versus controversy // *Acc. Chem. Res.* 2013. V. 46. № 7. P. 1487–1496.

210. Vanik D.L., Surewicz K.A., Surewicz W.K. Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions // *Mol. Cell*. 2004. V. 14. № 1. P. 139–145.

211. Vassar P.S., Culling C.F. Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues // *Arch Pathol.* 1959. V. 68. P. 487–498.

212. Venema J., Tollervey D. Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* // *Annu. Rev. Genet.* 1999. V. 33. P. 261–311.

213. Virchow R. Ueber eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefunde Substanz mit der chemischen Reaction der Cellulose // Virchows Arch. Path. Anat. Physiol. 1854. V. 6. P. 135–138.

214. Vocht M.L. de *et al.* Structural and functional role of the disulfide bridges in the hydrophobin SC3 // J Biol Chem. 2000. V. 275. № 37. P. 28428–28432.

215. Westermark P. *et al.* A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986. V. 140. № 3. P. 827–831.

216. Wickner R.B. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae* // Science. 1994. V. 264. № 5158. P. 566–569.

217. Wickner R.B., Masison D.C., Edskes H.K. [PSI] and [URE3] as yeast prions // Yeast. 1995. V. 11. № 16. P. 1671–1685.

218. Wickner R.B. *et al.* Prions of fungi: Inherited structures and biological roles // Nat. Rev. Microbiol. 2007. V. 5. № 8. P. 611–618.

219. Wickner R.B. *et al.* Amyloid diseases of yeast: prions are proteins acting as genes // Essays Biochem. 2014. V. 56. P. 193–205.

220. Wickner R.B. *et al.* Yeast prions: structure, biology, and prion-handling systems // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2015. V. 79. № 1. P. 1–17.

221. Wickner R.B., Son M., Edskes H.K. Prion variants of yeast are numerous, mutable, and segregate on growth, affecting prion pathogenesis, transmission barriers, and sensitivity to anti-prion systems // Viruses. 2019. V. 11. № 3. P. 238.

222. Wiggins R.C. Prion Stability and infectivity in the environment // *Neurochem. Res.* 2009. V. 34. № 1. P. 158–168.

223. Xu J. *et al.* Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors // *Nat. Chem. Biol.* 2011. V. 7. № 5. P. 285–295.

224. Yang J., Zhang Y. I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. № W1. P. 174–181.

225. Yu G. *et al.* ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters // *Omi. A J. Integr. Biol.* 2012. V. 16. № 5. P. 284–287.

226. Zaat S.A.J. *et al.* Induction of the *nodA* promoter of *Rhizobium leguminosarum* sym plasmid pRL1JI by plant flavanones and flavones // *J. Bacteriol.* 1987. V. 169. № 1. P. 198–204.

227. Zanten M.van *et al.* Control and consequences of chromatin compaction during seed maturation in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Signal. Behav.* 2012. V. 7. № 3. P. 338–341.

228. Zaragoza D. *et al.* Rapamycin Induces the G0 Program of Transcriptional Repression in Yeast by Interfering with the TOR Signaling Pathway // *Mol. Cell. Biol.* 1998. V. 18. № 8. P. 4463–4470.

229. Zha Z. *et al.* LptD is a promising vaccine antigen and potential immunotherapeutic target for protection against *Vibrio* species infection // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 38577.

230. Zhouravleva G. *et al.* Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3 // *EMBO J.* 1995. V. 14. № 16. P. 4065–4072.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор рад выразить благодарность сотрудникам лаборатории протеомики надорганизменных систем ФГБНУ ВНИИСХМ, без которых данная диссертация вряд ли состоялась бы. Особенно хочу поблагодарить к.б.н. К.С. Антонца, к.б.н. М.В. Белоусова, к.б.н. М.Е. Белоусову, А.О. Косолапову и Ю.В. Маловичко. Автор глубоко признателен академику РАН С.Г. Инге-Вечтомову за его многолетнее участие в подготовке данной диссертации в качестве научного консультанта и всестороннюю поддержку; академику РАН И.А. Тихоновичу за детальное прочтение диссертации, ценные советы и конструктивную критику. Также автор благодарен С.Г. Инге-Вечтомову и И.А. Тихоновичу за неоценимый опыт, приобретенный за время работы с ними. Рад поблагодарить коллег, долговременное сотрудничество с которыми внесло значительный вклад в выполнение исследований и публикацию работ в ведущих периодических изданиях, на которых основана эта диссертация: к.б.н. А.И. Сулацкую, М.И. Сулацкого, к.б.н. Е.А. Андрееву, к.б.н. П.А. Зыкина, к.б.н. К.В. Волкова, к.х.н. А.Н. Лыхолай, к.б.н. О.Ю. Штарк, д.м.н. О.Н. Демидова, д.б.н. А.П. Галкина, д.б.н. Г.А. Журавлеву, к.б.н. С.А. Бондарева. В заключение автор выражает глубокую благодарность своим родным и близким, которые создавали благоприятный и очень позитивный фон для написания этой работы.

SAINT PETERSBURG STATE UNIVERSITY

Manuscript

Anton A. Nizhnikov

**FEATURES OF THE FORMATION AND ACTION
OF CONFORMATIONAL PROTEIN TEMPLATES
IN THE PROTEOMES OF PROKARYOTES AND EUKARYOTES**

Scientific Specialty 03.02.07 – GENETICS

A DISSERTATION
submitted for the degree of
Doctor of Biological Sciences

Translation from Russian

Scientific Advisor: Doctor of Biological Sciences,
Academician RAS Sergey G. Inge-Vechtomov

Saint Petersburg, 2020

CONTENT

INTRODUCTION. Amyloidogenesis and Prion Formation: from Pathology to Function.....	- 131 -
CHAPTER I: Functional Amyloids of Plants	- 144 -
CHAPTER II: Amyloidogenesis and Supra-Organismal Interactions	- 163 -
CHAPTER III: Prion Formation: Loss- or Gain-of-Function?	- 179 -
CHAPTER IV: Conditional Prions	- 195 -
SUMMARY	- 206 -
CONCLUSIONS.....	- 211 -
MAIN PUBLICATIONS RELEVANT FOR THE DISSERTATION.....	- 213 -
DESIGNATIONS AND ABBREVIATIONS	- 217 -
REFERENCES	- 219 -
ACKNOWLEDGEMENTS.....	- 246 -

INTRODUCTION. Amyloidogenesis and Prion Formation: from Pathology to Function

The template principle in biology was formulated in 1928 by Nikolai K. Koltsov to explain the mechanism of chromosome reproduction [see: Inge-Vechtomov, 2015] and later generalized by Francis Crick as the key principle of molecular biology [Crick, 1970]. This principle saw transcription and translation as linear copying sequences of elements of biological macromolecules, i.e., templates of the first kind [see: Inge-Vechtomov, 2013; Nizhnikov, Antonets, Inge-Vechtomov, 2015]. Amyloid proteins also adhere to the template principle when forming the protein fibrils with a particular organized cross- β spatial structure [Sipe, Cohen, 2000b]. This structure has the properties of a conformational template or template of the second kind [Inge-Vechtomov, 2013], that provides autocatalytic acquisition of a corresponding protein by monomers of the amyloid conformation when incorporated into oligomers or fibrils [Nizhnikov, Antonets, Inge-Vechtomov, 2015]. The term "cross- β " is derived from the cross-shaped pattern observed in two-dimensional x-ray diffraction of amyloid fibrils, which forms two maxima of approximately 10 and 4.7 Å [Eanes and Glenner, 1968]. Those maxima emerge due to regular alignment of intermolecular β -layers along the axis of the fibril and predominantly perpendicular orientation of the β -chains in these layers, respectively [Nelson *et al.*, 2005]. However, the spatial structure of amyloids is very heterogeneous and may include, for example, parallel and antiparallel β -layers as well as β -helices in different amyloids [Melckebeke Van *et al.*, 2010; Qiang *et al.*, 2012; Smaoui *et al.*, 2013; Tycko *et al.*, 2009;

Tycko, Wickner, 2013]. Such structure of amyloid fibrils, consisting of elements repeated at regular intervals, leads to specific effects upon binding by different dyes. For example, when thioflavin-T (TFT) interacts with amyloids, there is an increase in fluorescence [Hobbs, Morgan, 1963; Vassar, Culling, 1959; Naiki *et al.*, 1989], and when Congo red (CR) binds [Bennhold, 1922], there is a double refraction in polarized light [Divry, Florkin, 1927]. A significant number of hydrogen bonds in the intermolecular β -layers contribute to the amyloids stabilization [Makin *et al.*, 2005], allowing them to acquire unique physical and chemical properties such as resistance to ionic detergents [Selkoe, Ihara, Salazar, 1982] or protease treatment [Bolton, McKinley, Prusiner, 1982; McKinley, Bolton, Prusiner, 1983], which destroys most non-amyloid protein complexes [Nizhnikov *et al.*, 2014b]. Some amyloids are exceptionally stable for biogenic particles, and maintain their structure and properties in the external environment for decades [Wiggins, 2009].

Historically, the term "amyloid" (from Latin *amylum* – starch) was coined by Matthias Schleiden in 1838 to refer to starchy conglomerates in plant cells that were stained blue with iodine [see: Kyle, 2001; Nizhnikov, Antonets, Inge-Vechtomov, 2015]. In 1854, Rudolf Virchow used the term amyloids to name small pathological inclusions in the human nervous tissue, which, like starch grains in plant cells, were stained blue with iodine [Virchow, 1854]. Later many internal organs of humans and animals were found to undergo some irreversible transformations when infiltrated by pathological amyloid inclusions [Kyle, 2001]. Since the 17th century these conglomerates were called "fat-like" or "waxy" in the medical literature of that time (French and British pathoanatomic schools, respectively)

assuming their cellulose-like nature [Kyle, 2001]. However, as early as in 1859, August Kekule and Karl Friedrich showed that the pathological "wax" inclusions in the spleen are enriched with nitrogen indicating their protein nature [Friedreich, Kekule, 1859]. Iodine staining of these protein inclusions was associated with proteoglycans and glycosaminoglycans in their composition [Niewold *et al.*, 1991]. In 1927, the aforementioned method was developed to analyze the apple-green birefringence of amyloids stained with the CR dye in polarized light [Divry, Florkin, 1927] (The dye, in fact, can be of different colors, including blue and yellow [Howie *et al.*, 2008]). This approach has long been considered as the "golden standard" in the pathoanatomic description of amyloid inclusions [Sipe *et al.*, 2014]. Further, the electron microscopy was introduced into the practice of amyloid studies. In 1959 the electron microscopy was used to show the fibrillar properties of amyloids [Cohen, Calkins, 1959] and later to describe the levels of amyloid organization including protofilaments. They join the filaments laterally at first and then combine into larger, almost unbranched formations – fibrils, the most typical form of supramolecular organization for amyloids [Sipe, Cohen, 2000a; Fitzpatrick *et al.*, 2013; Iashuel *et al.*, 2000]. In 1968, a new method of water extraction of amyloids made it possible to isolate these fibrils from tissues and opened up prospects for studying them *in vitro* [Pras *et al.*, 1968]. In the same year, a study utilizing X-ray diffraction of fibrils isolated from tissues infiltrated by pathological amyloid inclusions described a "cross- β " pattern [Eanes, Glenner, 1968], which was later interpreted as a general, although polymorphic in terms of the exact position of regularly repeated elements, model of the amyloid cross- β structure. [Sunde *et al.*, 1997].

Such a significant interest in the amyloids which continues to this day, has not been accidental. Numerous human and animal diseases characterized by pathological accumulation of amyloid inclusions are called amyloidosis [Kyle, 2001; Sipe, Cohen, 2000a; Blancas-Mejía, Ramirez-Alvarado, 2013; Chiti, Dobson, 2006]. These diseases are mostly incurable [Baker, Rice, 2012; Picken, 2020] and also quite diverse in the terms of occurrence and the nature of localization (localized and systemic) [Benson *et al.*, 2018]. A number of incurable neurodegenerative diseases, including Alzheimer's [Selkoe *et al.*, 1986], Parkinson's [Araki *et al.*, 2019], and Huntington's [DiFiglia *et al.*, 1997] diseases, are also associated with the amyloid aggregation of certain proteins, probably as well as with some interactions between amyloid proteins [Bondarev *et al.*, 2018]. Recently, the amyloid formation by certain proteins has been noticed in some types of cancer [Ano Bom *et al.*, 2012; Lasagna-Reeves *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2011]. The causal correlation between protein aggregation and pathology is not always clear, as, for example, in the case of type II diabetes, in which amyloid aggregation of the IAPP peptide is observed [Westermarck *et al.*, 1986]. Type II diabetes is affecting up to half a billion people [Meetoo, McGovern, Safadi, 2007]. A special group of human and animal amyloid diseases consists of neurodegenerative prion diseases caused by the PrP protein in the amyloid Sc conformation (scrapie, the historical name of sheep prion disease) [Bolton, McKinley, Prusiner, 1982], which remains infectious when digested in the digestive tract [McKinley, Bolton, Prusiner, 1983] and is able to overcome some interspecies barriers (for example, transmitted from cows to humans when eating infected meat) [Cobb,

Surewicz, 2009; Kraus, Groveman, Caughey, 2013; Vanik, Surewicz, Surewicz, 2004]. Currently, the term "prions" refers to proteins whose specific (usually amyloid) conformations have infectious properties [Wickner *et al.*, 2015]. Despite the fact that there are no data on infectivity for the most of known amyloids, some recent studies show that α -synuclein associated with the development of Parkinson's disease, Tau protein (taupathies and Alzheimer's disease) and the amyloid peptide- β (Alzheimer's disease) have prion-like properties [Aoyagi *et al.*, 2019; Lasagna-Reeves *et al.*, 2012; Luk *et al.*, 2012]. Thus, the number of prions among pathological human amyloids may increase significantly in the future. More than 40 proteins, whose extracellular and intracellular amyloid aggregation is associated with the development of incurable human diseases, have been identified so far [Benson *et al.*, 2018]. Among those are the aforementioned diseases of high social significance, such as type II diabetes and Alzheimer's disease. According to the Christopher Dobson's hypothesis, the regions potentially prone to amyloidogenesis are present in the majority of the proteins of a proteome, but specialized cellular systems of protein synthesis, folding, and degradation control the formation of amyloids *in vivo* and prevent the formation of those that may be pathogenic. The disruption of these systems leads to the development of amyloidoses, many of which are senile diseases [Dobson, 2003; Dobson, 2004].

However, another role of the amyloid proteins was discovered in 2000. Amyloids were identified in the silkworm eggs chorion, protecting the embryo *in vivo* [Iconomidou, Vriend, Hamodrakas, 2000] and hydrophobins of the basidiomycete *Schizophyllum commune* [Vocht de *et al.*, 2000]. To date, such amyloids, called functional, have been found in all three domains of the living world: in archaea [Dueholm *et al.*, 2015; Chimileski, Franklin, Papke, 2014], bacteria [Blanco *et al.*, 2012; Romero, Kolter, 2014; Schwartz, Boles, 2013b], eukaryotes [Nizhnikov *et al.*, 2016a; Nizhnikov, Antonets, Inge-Vechtomov, 2015; Otzen, Riek, 2019]. Even viruses have functional amyloid-like proteins [Nan *et al.*, 2019], and the total number of functional amyloids identified in various phylogenetic groups exceeded the number of the pathological amyloids [Otzen, Riek, 2019].

Thus, dozens of functional amyloids, involved predominantly in the biofilm formation, toxin storage, and protein envelope formation, have been identified in prokaryotes [Gerven Van *et al.*, 2018; Shanmugam *et al.*, 2019]. While most prokaryotic amyloids perform a structural or storage function, some bacterial toxins are active in the amyloid form only [Oh *et al.*, 2007]. Many prokaryotic amyloids serve as the virulence factors in the pathogen-host supraorganismal interactions [Schwartz, Boles, 2013a]. Thus, the role of amyloid components of biofilms, functional for bacteria but pathogenic for a multicellular host, in the development of infectious diseases in humans has been shown [Gerven Van *et al.*, 2018]. It should be taken into account that: (i) amyloids are a structural component of biofilms of a number of phylogenetically remote prokaryotic species

[Taglialegna, Lasa, Valle, 2016]; (ii) the number of species of pathogenic bacteria for humans is about 1500 [Shaw *et al.*, 2020] and (iii) 65% of species of bacteria pathogenic for humans form biofilms associated with infectious diseases [Costerton, 2001]. Thus, the real number of amyloids of pathogenic bacteria alone, which are components of biofilms, can mount to a thousand. So, pathological amyloids, whose structural proteins are encoded in the human genome, represent only a small part of the amyloids associated with the development of thousands of diseases [Kosolapova *et al.*, 2020]. Although the issue of the prokaryotic amyloids involvement in pathogen-host interactions has already been tackled, any data on the presence of amyloid proteins in symbiotic bacteria, which represent the second key vector of supra-organismal interactions, were not available at the start of this thesis research.

The functional amyloids have also been identified in eukaryotes, in particular in humans and other mammals. They play a key role in melanin polymerization [Fowler *et al.*, 2006], hormone storage [Maji *et al.*, 2009], biomineralization of tooth enamel [Carneiro *et al.*, 2016], formation of long-term memory [Fioriti *et al.*, 2015], and a number of other biological processes [Bondarev *et al.*, 2018]. In most cases, the amyloids are necessary either for the formation of ordered structures used as a "framework" (as in the case of polymerization of melanin [Fowler *et al.*, 2006] or tooth enamel [Carneiro *et al.*, 2016]), or for the storage of certain proteins or peptides active in the monomeric state (for example, hormones [Maji *et al.*, 2009]). Thus, even functional amyloidogenesis can be associated with either permanent or temporary functional inactivation

of a protein that terminates when this protein converts from amyloid to a monomeric state (or some other state). To make this change possible, special molecular mechanisms can be used, such as pH changes in compartments where proteins are stored in the amyloid form [Maji *et al.*, 2009]. The functional amyloids were also identified in fungi [Ramsook *et al.*, 2010], mollusks [Si *et al.*, 2003], and insects [Majumdar *et al.*, 2012]. However, plants remained to be the most important group of organisms where proteins that form amyloids under physiological conditions had not been identified before our studies [Antonets, Nizhnikov, 2017b].

Fungi use the functional amyloids to build cell wall structures [Kalebina *et al.*, 2008; Ramsook *et al.*, 2010; Ryzhova *et al.*, 2017]. However, a particular interest is focused on amyloids of ascomycete fungi due to the presence of infectious amyloid-prions [Wickner, 1994]. The prions of fungi and, above all, *Saccharomyces cerevisiae* yeast can be either functional or harmful to cells [McGlinchey, Kryndushkin, Wickner, 2011; Nakayashiki *et al.*, 2005; Wickner *et al.*, 2007] or have no noticeable effects [Chernova, Wilkinson, Chernoff, 2014; Derkatch, Liebman, 2007b]. Prions can exist in the form of various structural states, called variants, with different phenotypic manifestations [Bateman, Wickner, 2013; Wickner, Son, Edskes, 2019]. The functional yeast prions control pseudomulticellularity [Holmes *et al.*, 2013] or the resistance of these organisms to various chemical compounds [Suzuki, Shimazu, Tanaka, 2012; Harvey *et al.*, 2020], increasing their survival under certain conditions [Chakravarty *et al.*, 2020; Itakura *et al.*, 2020]. Despite its participation in the control of certain biological functions, prionization, as well as

amyloidogenesis in general, is associated with the functional inactivation of the corresponding structural proteins [Kundu *et al.*, 2020]. One of the classic postulates proposed by Reed Wickner concerning the yeast prions states that the phenotypes of the prion and deletions of its structural gene coincide [Wickner, 1994]. However, the problem of similarity of the effects of the protein prionization and deletion of its structural gene at the molecular level remains poorly understood. We cannot rule out that in the case of prion formation the protein inactivation may be only partial and even lead to some new functions gained by this protein. It is also unclear whether proteins can acquire prion properties when the conditions, for example, the level of production, change. Some evidence has already been obtained that the “amyloidome” or a set of all amyloid (including prion) proteins of the cell [Nizhnikov, Antonets, Inge-Vechtomov, 2015] is a dynamic system [Audas *et al.*, 2016].

The ability for autocatalytic template reproduction, high stability, and relatively simple primary structure (amyloids are formed, for example, by polypeptides consisting of repeats Q [Perutz *et al.*, 1994], N [Perutz *et al.*, 2002] or E [Colaco, Park, Blanch, 2008]) led Karl Peter Maury to hypothesize that amyloids could be one of the oldest variants of the structural and functional organization of the biological macromolecules at the dawn of the life formation on our planet [Maury, 2009; Maury, 2018]. Assuming that this hypothesis could be correct, which is supported by several studies [Katsnelson, 2020; Rout *et al.*, 2018], one would expect that amyloids could be quite widespread among the currently existing large taxa.

Thus, the data accumulated to date allow us to state a change in the "amyloid – pathogen" paradigm and show that these protein fibrils as conformational templates are one of the most important variants of the functional quaternary protein structure [Nizhnikov, Antonets, Inge-Vechtomov, 2015]. Nevertheless, despite the significant number of amyloids identified in different groups of organisms, there are serious gaps in understanding the scale of amyloid diversity, the features of their formation, and biological functions. This lack of understanding is caused primarily by the fact that most amyloids were identified by analyses of individual genes and their products, which did not allow us to assess the prevalence of amyloids throughout the proteome. The proteomic standpoint, which gives the opportunity to consider amyloids as a set of proteins with different sequences united by a spatial structure that has a number of common features, has formed the basis of the research performed in the framework of this dissertation.

The **purpose** of this study was to identify new features of formation and functions of protein conformational templates at the proteomic level. The study was aimed at solving the following **tasks**:

1. To analyze the amyloid properties of the proteins in plant proteomes.
2. To compare the complexes of amyloidogenic proteins and identify new amyloids in the proteomes of symbiotic and pathogenic species of proteobacteria.

3. To compare the functional effects of the protein prionization at the genome-wide level with the effects of inactivation of the corresponding structural genes.

4. To study the effects of the primary structure and level of production on the prion properties of proteins.

Novelty: In this work, for the first time, amyloid proteins have been identified in plants and symbiotic bacteria, and the association of the amyloid formation with the protein storage in seeds and supra-organismal interactions has been demonstrated. We have shown that the prion formation can lead to the alterations in the functions of the corresponding structural protein rather than to their inhibition. We have described a new protein group capable of sustaining prion properties in non-native conditions called "conditional prions".

The discovery of the amyloidogenesis of seed storage proteins, which are an important component of the human diet explains the **practical significance** of this study. Those amyloids could influence the nutritional value of the seeds as well as provoke food allergies.

The following **statements** are presented for the consideration:

1. For the first time, a functional amyloid protein, which is a storage protein of the *P. sativum* L. seeds, vicilin, has been identified in plants.

2. The amyloids in symbiotic bacteria, formed by the porins of the outer membrane of the root nodule bacterium *R. leguminosarum*, RopA и RopB, have been identified for the first time.

3. It was established that the protein prionization effects are not equal to the effects of the corresponding structural gene deletion. Thus prion formation can trigger not inactivation but change of the protein function.

4. Based on the features of the Gln3 transcription regulator of *S. cerevisiae* yeast it has been shown that proteins called “conditional prions” acquire and sustain the prion properties only in non-native conditions.

The results of the dissertation were tested in reports at more than fifty significant international conferences, including the congresses of the Vavilov Society of Geneticists and Breeders (2019, 2014), the Federation of European Biochemical Societies (2019, 2018, 2017), the Federation of Biochemical Societies of France, Spain and Portugal (2015), the European Association of Molecular Biology (2014), the Congress on Analytical Proteomics (2015), Conferences on Yeast Genetics and Molecular Biology (2015, 2019), prion proteins (2016), the European Symposium on Top-Down Proteomics (2019), BGRS/SB (2016, 2018, 2020), PLAMIC (2018), the International Forum "Biotechnology: State and Prospects of Development" (2019, 2018, 2017), the Anniversary Conference "50 years of Vavilov Society of Geneticists and Breeders: Progress and Prospects (2015) and a number of other events. The results are presented and discussed in 20 full-text articles in the journals indexed in international databases. The applicant has made major contributions to planning, obtaining and interpreting the results of the dissertation. The applicant's personal

contribution is confirmed by the fact that in almost all key publications he is the corresponding author or the first author. Experiments on protein fibrillogenesis were carried out jointly with A. I. Sulatskaya and M. I. Sulatsky, histological studies of plant seeds – with E. A. Andreeva and P. A. Zykin. A detailed description of the methods and approaches used is given in the articles published on the results of the work. Unique genetic collections of plants and bacteria (All-Russian Institute of Agricultural Microbiology (ARRIAM)), as well as yeast (Department of Genetics and Biotechnology, St. Petersburg State University (SPbSU)) were used as a source of research material. The proteome studies were performed in the "Development of Molecular and Cell Technologies" Centre of the Scientific Park, St. Petersburg State University; sequencing was performed at the Centre for Collective Use "Genome Technology, Proteomics and Cell Biology" of ARRIAM. The results presented in the dissertation were obtained with the support of grants from the President of the Russian Federation (MK-3240.2017.4, MK-4854.2015.4), the Russian Science Foundation (17-16-01100, 17-16-01100P), the Russian Foundation for Basic Research (16-34-60153, 17-04-00816), and the Committee for Science and Higher Education of the Government of St. Petersburg.

This Dissertation includes an Introduction, four Chapters and a Conclusion, consists of 118 pages, and contains 25 figures, three tables and 230 references.

CHAPTER I: Functional Amyloids of Plants

The functional amyloids have been described in various groups of eukaryotes, including chordates, arthropods, mollusks, and fungi but plants, despite their extreme significance for humans, remained a poorly studied group in the field of amyloid biology [Nizhnikov, Antonets, Inge-Vechtomov, 2015; Otzen, Riek, 2019]. However, several plant proteins or their fragments have been shown to form fibrils that demonstrate some amyloid properties *in vitro* (Figure 1). Such properties are shown for the C-terminal domain of the prohevein protein of *Hevea brasiliensis* [Berthelot *et al.*, 2016], *Zea mays* transglutaminase, *Raphanus sativus* defensin fragments RsAFP1 and RsAFP2 [Garvey *et al.*, 2013], and the antimicrobial peptide Cn-AMP2 from *Cocos nucifera* [Gour *et al.*, 2016] (a detailed description of plant amyloidogenic proteins is given in the review [Antonets, Nizhnikov, 2017b]). Some QN-rich transcription regulators of the plants, associated with the control of the Autonomous Flowering Pathway (AFP), showed amyloid-like and prion-like properties in heterologous production in *S. cerevisiae* yeast [Chakrabortee *et al.*, 2016]. The data on the amyloid properties of polymer substances released when attached to the substrate by green algae were of the greatest interest. However, no specific proteins were identified in these studies [Mostaert *et al.*, 2006; Mostaert *et al.*, 2009].

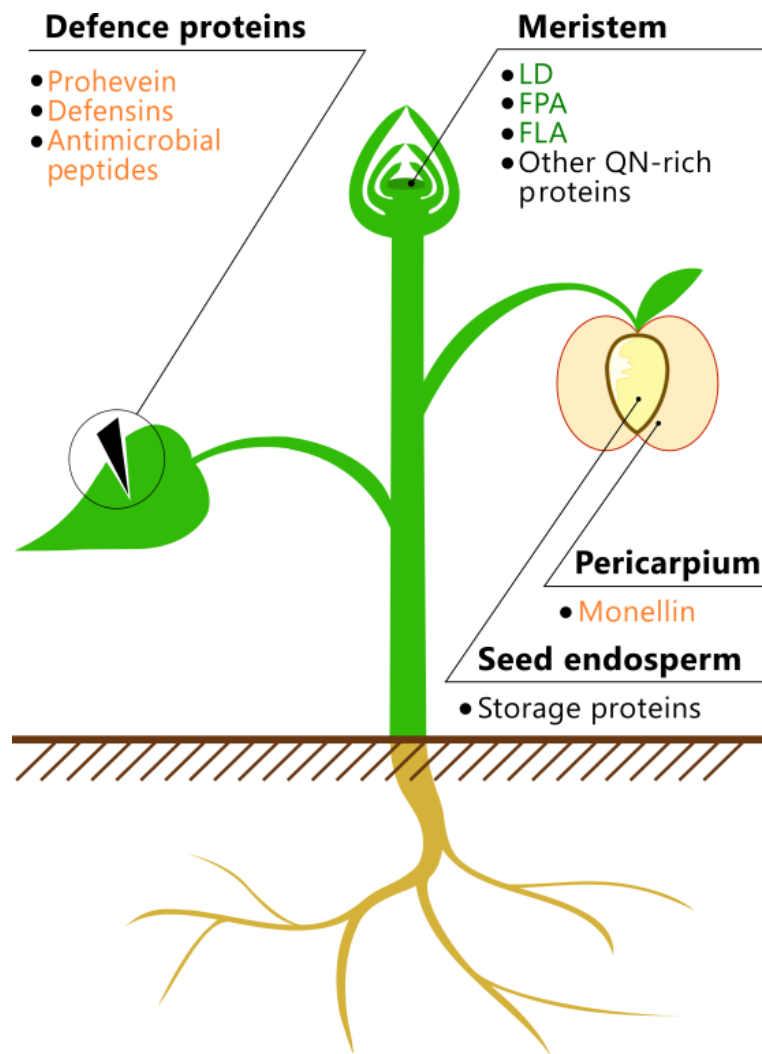


Figure 1. Amyloidogenic proteins in plants. A schematic representation of the plant is shown. The names of proteins or peptides whose amyloidogenic properties are partially characterized *in vivo* (green) or *in vitro* (orange), as well as protein fragments which have amyloidogenic properties (black) are indicated [Antonets, Nizhnikov, 2017b].

It is well-known that the ability of fragments of plant seed proteins to form fibrillar aggregates results from incomplete acid hydrolysis (when boiled in a solution with $\text{pH} \leq 2.0$). This property suggests for the presence of amyloidogenic regions in their sequences (the amyloidogenic properties of hydrolysates of various food products are reviewed in [Cao, Mezzenga, 2019; Jansens *et al.*, 2019]) Thus, despite the fact that at the beginning of our research, no proteins that form amyloids *in vivo* under physiological

conditions were known in plants, based on the available data, such proteins were assumed to exist and probably perform certain biological functions in these organisms.

We started the study of plant amyloid proteins with the bioinformatic analysis of the occurrence of amyloidogenic regions in their proteomes and the association of the amyloidogenic regions enrichment with the specific functional groups of plant proteins. The work included proteomes of all land plant species with sequenced and functionally annotated genomes at that time. The proteomes of these 75 species contained approximately 2.9 million proteins analyzed for the presence of potentially amyloidogenic regions (PARs) [Antonets, Nizhnikov, 2017a] using the Waltz algorithm [Maurer-Stroh *et al.*, 2010] and the SARP algorithm (Sequence Analysis Based on the Ranking of Probability) [Antonets, Nizhnikov, 2013]. It should be noted that all currently existing algorithms for predicting potential amyloidogenic properties of proteins assess the potential amyloidogenic properties in the individual regions of the primary protein structure. Consequently, the amyloid properties of a full-size protein *in vivo* are less likely to be predicted, due to the interactions of amyloidogenic and non-amyloidogenic regions in its structure and the influence of the external environment [Santos *et al.*, 2020]. However, the bioinformatic analysis allows a researcher to select a protein functional groups or protein domain with an increased content of amyloidogenic regions indicating probable location of the amyloid proteins. Further confirmation of the amyloid properties should be carried out by the experimental biochemical and molecular biological methods [Nizhnikov, Antonets, Inge-Vechtomov, 2015]. The Waltz algorithm (we used the following parameters: maximum specificity; pH 7.0) is based on

the positional matrices and predicts PARs enriched primarily with hydrophobic amino acids. Each amino acid residue position in such sites can be critical, and even a switching of two amino acids can lead to the loss of amyloidogenic properties of the region [Maurer-Stroh *et al.*, 2010]. The SARP algorithm is based on detection of the protein regions with prevalence of one or more amino acid residues (also called “low complexity regions”) [Antonets, Nizhnikov, 2013]. In particular, many known amyloid proteins are characterized by an increased content of N, or Q, or both of them [Harrison, Gerstein, 2003; Michelitsch, Weissman, 2000]. These regions were predicted with SARP (using a probability threshold of 10^{-8}) [Antonets, Nizhnikov, 2013].

Our bioinformatic screening of the proteomes of 75 land plants species revealed a number of features describing the distribution of potentially amyloidogenic regions in the proteins of this systematic group of eukaryotes. In particular, the analysis of the biological processes representation based on the data from the Gene Ontology (GO) database showed that a significant proportion of potentially amyloidogenic proteins predicted by Waltz are involved in various types of transport of substances across the membrane [Antonets, Nizhnikov, 2017a]. This result seems logical, given that the transmembrane proteins often tend to form a structure enriched with β -sheets called a “ β -barrel” [Chaturvedi, Mahalakshmi, 2017]. The SARP algorithm showed that the amyloidogenic sites were enriched in proteins that bind clathrin and phosphatidylinositol or act as transcription cofactors. Also more than two-thirds of the analyzed species had potentially amyloidogenic regions enriched in proteins that function as a nutrient reservoir, most of which are seed storage proteins (Figure 2).

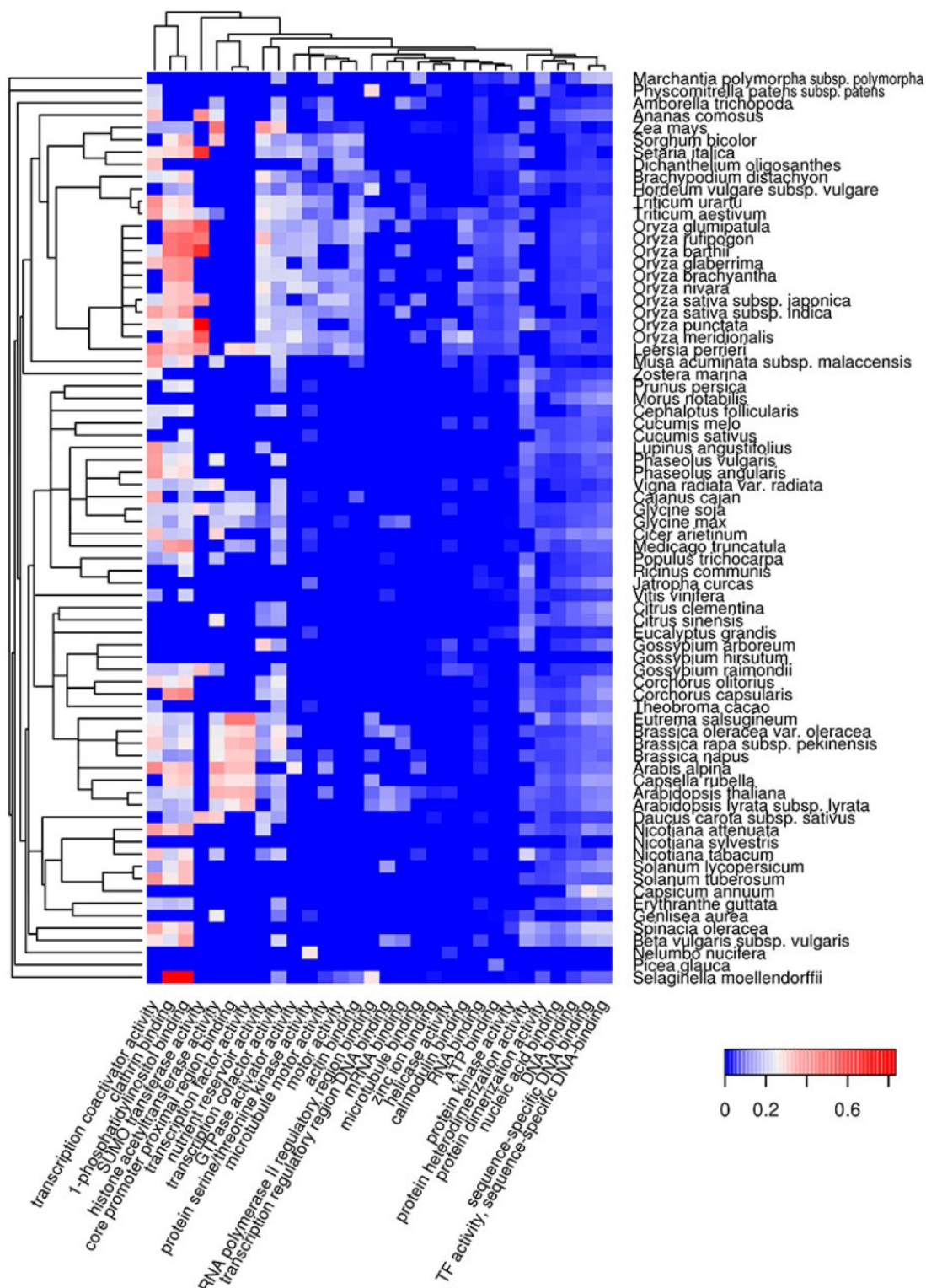


Figure 2. GO molecular functions, where potentially amyloidogenic Q- and N-enriched proteins predicted by SARP are the most represented. For such proteins, 30 basic GO terms from the ontology of molecular functions are shown. The cell color indicates the proportion of potentially amyloidogenic proteins predicted by SARP among all proteins labeled with this term. All cells with p -values more than 0.01 are equal to 0 (dark blue). The dendrogram of the plant species corresponds to their phylogenetic tree [Antonets, Nizhnikov, 2017a].

The further bioinformatic screening of the protein domains enriched with the potentially amyloidogenic regions (PARs) predicted by the SARP algorithm allowed us to establish [Antonets, Nizhnikov, 2017a] that the domains of the Cupin-1 family with a β -barrel structure inherent in seed storage proteins (7S and 11S globulins) [Dunwell, Purvis, Khuri, 2004] are most enriched with such PARs. 302 PARs of the seed storage proteins with Cupin-1 domains were identified in 54 out of the 75 analyzed species belonging to both monocotyledonous and dicotyledonous angiosperms, which suggests that this property is evolutionary conserved (Figure 3). Thus, the data obtained during a large-scale bioinformatic screening of potentially amyloidogenic proteins in plant proteomes [Antonets, Nizhnikov, 2017a] allowed us to put forward a hypothesis that amyloidogenesis can potentially be involved in the mechanisms of protein storage in plant seeds. This hypothesis was tested experimentally.

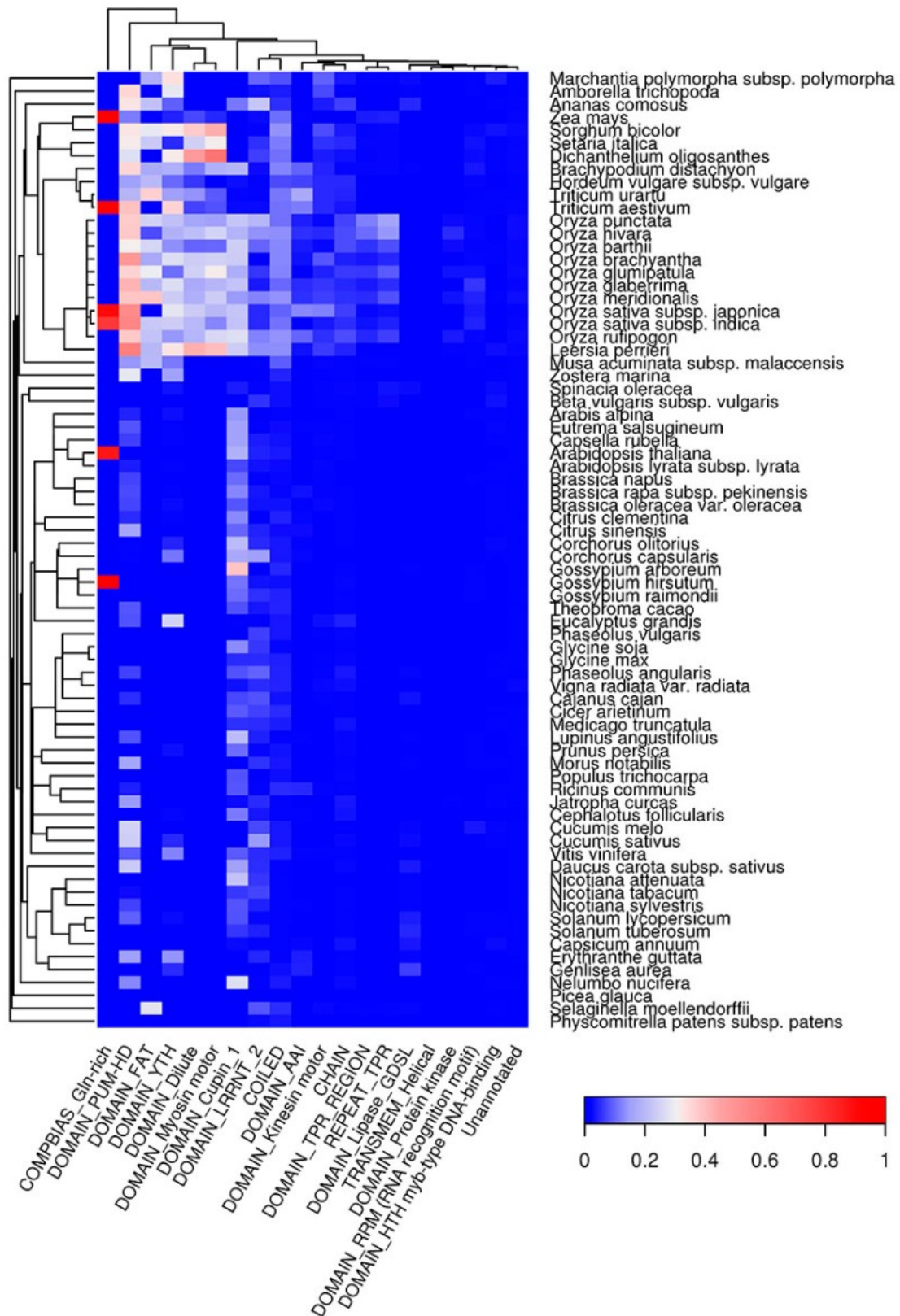


Figure 3. 20 groups of plant protein domains most enriched with potentially amyloidogenic regions predicted by SARP. The cell color indicates the proportion of proteins with potentially amyloidogenic regions among all proteins with this trait. The dendrogram of plant species corresponds to their phylogenetic tree [Antonets, Nizhnikov, 2017a].

We performed the proteomic screening of amyloid proteins in mature seeds (30 days after pollination) of the early-maturing *Sprint-2* line [Borisov *et al.*, 1997; Malovichko *et al.*, 2020] of the garden pea *Pisum sativum* L., in which the accumulation of seed storage proteins approached the maximum as a result of strong overexpression of genes encoding storage proteins at earlier stages of seed development [Malovichko *et al.*, 2020]. After maturation, so called “orthodox” seeds undergo natural dehydration, accompanied by compaction of the genetic material [Zanten van *et al.*, 2012], and stabilization of the nutrient reservoir. As a result of this complex of processes, seeds transit to dormancy to survive unfavorable conditions for a very long time [Angelovici *et al.*, 2010]. For example, the seeds of the Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.), whose storage proteins are most enriched with potentially amyloidogenic regions [Antonets, Nizhnikov, 2017a], successfully germinated after about 1300 years [Shen-Miller *et al.*, 1995; Shen-Miller *et al.*, 2013].

The proteomic screening of amyloid proteins was performed using PSIA-LC-MALDI method [Nizhnikov *et al.*, 2016b]. This method is characterized by a multi-stage purification of proteins forming detergent-resistant aggregates, which is one of the key amyloid properties [Bolton, McKinley, Prusiner, 1982], isolated from tissues or cell cultures through a series of ultracentrifugations [Nizhnikov *et al.*, 2014b; Antonets *et al.*, 2016]. Next, the obtained detergent-resistant aggregates are dissolved and the protein trypsinolysis is performed. After that peptide mixtures are separated using HPLC, and the proteins in the detergent-resistant fractions

are identified by mass spectrometry [Nizhnikov *et al.*, 2016b]. It should be noted that the proteins identified by such screening methods are supposed to be only candidates for novel amyloids. To prove their amyloid properties a set of additional methods to analyze the properties of the aggregates formed by them *in vitro* and *in vivo* is necessary [Nizhnikov, Antonets, Inge-Vechtomov, 2015].

As a result of the PSIA-LC-MALDI proteomic screening, an ensemble of proteins forming detergent-resistant polymers in mature pea seeds was described [Antonets *et al.*, 2020]. Proteins representing all three major classes of storage proteins in pea seeds were found: vicilin, convicilin, and legumin. We have also identified a heteropolymer iron-binding protein ferritin, a biotin-containing protein SBP65, and dehydrin involved in the response to drought [Garneczarska, Zalewski, Wojtyla, 2008] in the composition of detergent-resistant polymeric pea seed fractions. The highest mass spectrometric score (a parameter that reflects the reliability of identification) was demonstrated by seed storage 7s globulins vicilins, which indicated their predominance in the composition of detergent-resistant polymeric fractions of pea seeds. For the further analysis of amyloid properties *in vivo* and *in vitro*, vicilin with a mass of 47 kDa was chosen, since its N - and C-terminal regions were identified by the tandem mass spectrometric analysis (MS/MS). The analysis indicated that full-length vicilin protein forms detergent-resistant polymers [Antonets *et al.*, 2020].

Vicilin contains two evolutionarily conservative domains of the Cupin-1 family with a " β -barrel" structure enriched with regularly repeated β -sheets: Cupin-1.1 and Cupin-1.2 (Figure 4A). Employing bioinformatic screening, the domains of the Cupin superfamily were identified as potentially the most amyloidogenic protein domains in the land plant proteomes [Antonets, Nizhnikov, 2017a]. An additional analysis of the potentially amyloidogenic regions (PARs) in the sequence of the vicilin protein was performed using the AmylPred2 algorithm, which combines eight different PARs prediction algorithms [Tsolis *et al.*, 2013]. All PARs in the vicilin sequence were shown to localize within its two domains, Cupin-1.1 and Cupin-1.2, with Cupin-1.1 containing five such regions, and Cupin-1.2 containing four (Figure 4A). We decided to analyze the amyloidogenic properties of full-length vicilin as well as its Cupin-1.1 and Cupin-1.2 domains *in vitro*. These proteins were produced in *E. coli* cells, isolated, and purified, and then their ability to form fibrils *in vitro* was analyzed. Cupin-1.1 and Cupin-1.2 fibrils were successfully obtained using the previously published protocol [Kayed *et al.*, 2007; Kosolapova *et al.*, 2019] using a HFIP solvent (Figure 4B). At the same time, for more efficient formation of fibrils by vicilin (Figure 4B), we added "seeds" [Scherpelz *et al.*, 2016], obtained from pre-existing aggregates of this protein formed during the previous cycle of fibrillogenesis, to the solution. The CR staining followed by the polarization microscopy proved that all three proteins exhibit the typical for amyloid birefringence in polarized light (Figure 4C). Western blot hybridization with polyclonal antibody against vicilin demonstrated that the aggregates of all three proteins (vicilin, Cupin-1.1 and Cupin-1.2) were resistant to the detergent sodium dodecyl sulfate (SDS) (Figure 4D) [Antonets *et al.*, 2020].

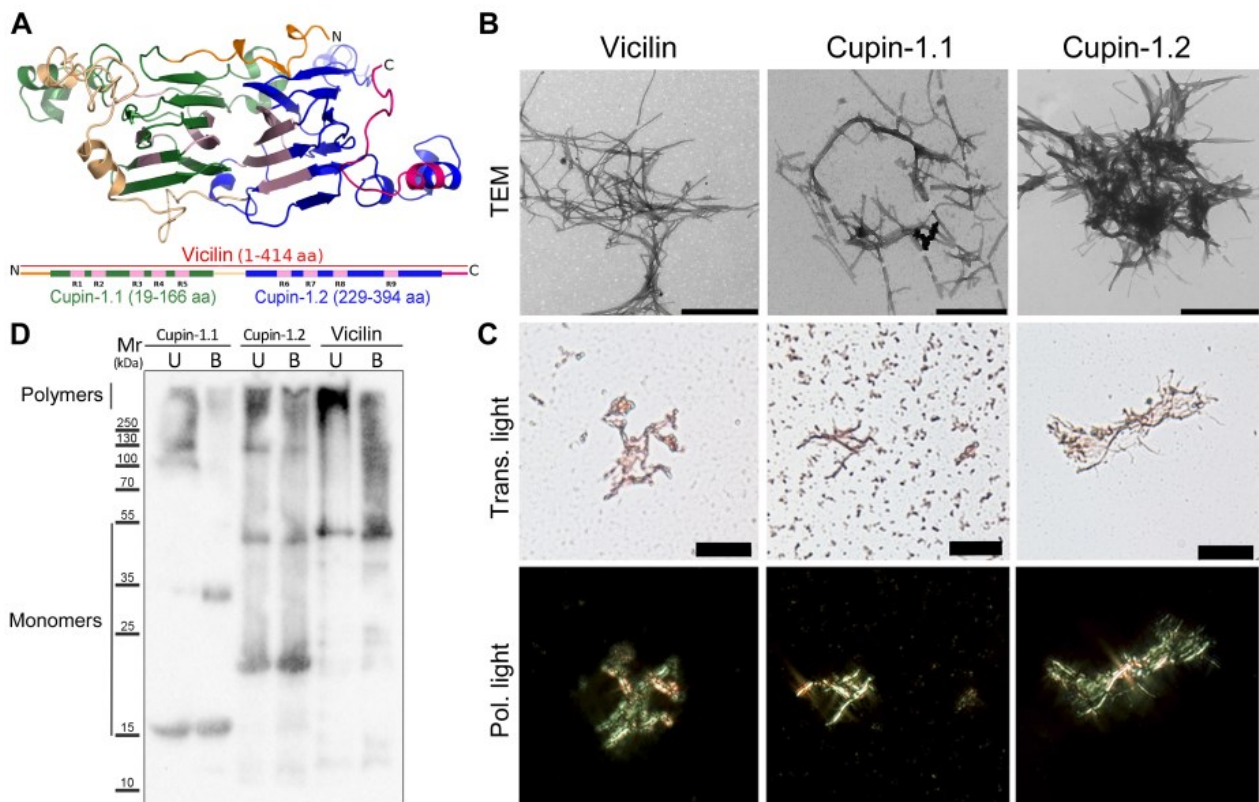


Figure 4. Amyloid properties of vicilin and its Cupin-1.1 and Cupin-1.2 domains *in vitro*. **A.** The structure of *P. sativum* L. vicilin predicted using the I-TASSER server [Yang, Zhang, 2015]. The domain structure is presented in the linear form below; the Cupin-1.1 domain is marked in green, Cupin-1.2 in blue; areas that are not included in the domains are ochre, light yellow, and purple. PARs predicted by the AmylPred2 algorithm [Tsolis *et al.*, 2013] are designated as R1-R9 and colored pink. **B.** TEM of vicilin fibrils and its domains obtained *in vitro* by dissolving the corresponding proteins in 50% HFIP followed by evaporation and fibrillogenesis in distilled water. Scale bar is equal to 500 nm. **C.** Fibrils of vicilin and its domains stained with CR dye. Stained fibrils are shown in transmitted (upper row) and polarized (lower row) light. Scale bar is equal to 20 μm. **D.** Resistance of aggregates of vicilin and its domains to treatment with cold (U) and hot (B) 2% ionic detergent SDS. A marker of molecular weight (Mr) in kilodaltons (kDa) is shown [Antonets *et al.*, 2020].

Upon heterologous expression in *S. cerevisiae* yeast cells, vicilin and both its domains form intracellular aggregates (Figure 5A), and being secreted to the surface of *E. coli* cells in the C-DAG system [Sivanathan, Hochschild, 2013] (Figure 5B) they form fibrils (Figure 5C) that bind CR (Figure 5D) and demonstrate birefringence in polarized light (Figure 5E).

Notably, the CR staining of *E. coli* cells producing Cupin-1.2 was very weak, as compared to the vicilin-producing cells and Cupin-1.1, which is an unusual example of a pseudonegative result in the C-DAG system (Figure 5B-E). In general, vicilin and both its domains Cupin-1.1 and Cupin-1.2 form amyloid fibrils *in vitro*, as well as when secreted to the surface of bacterial cells.

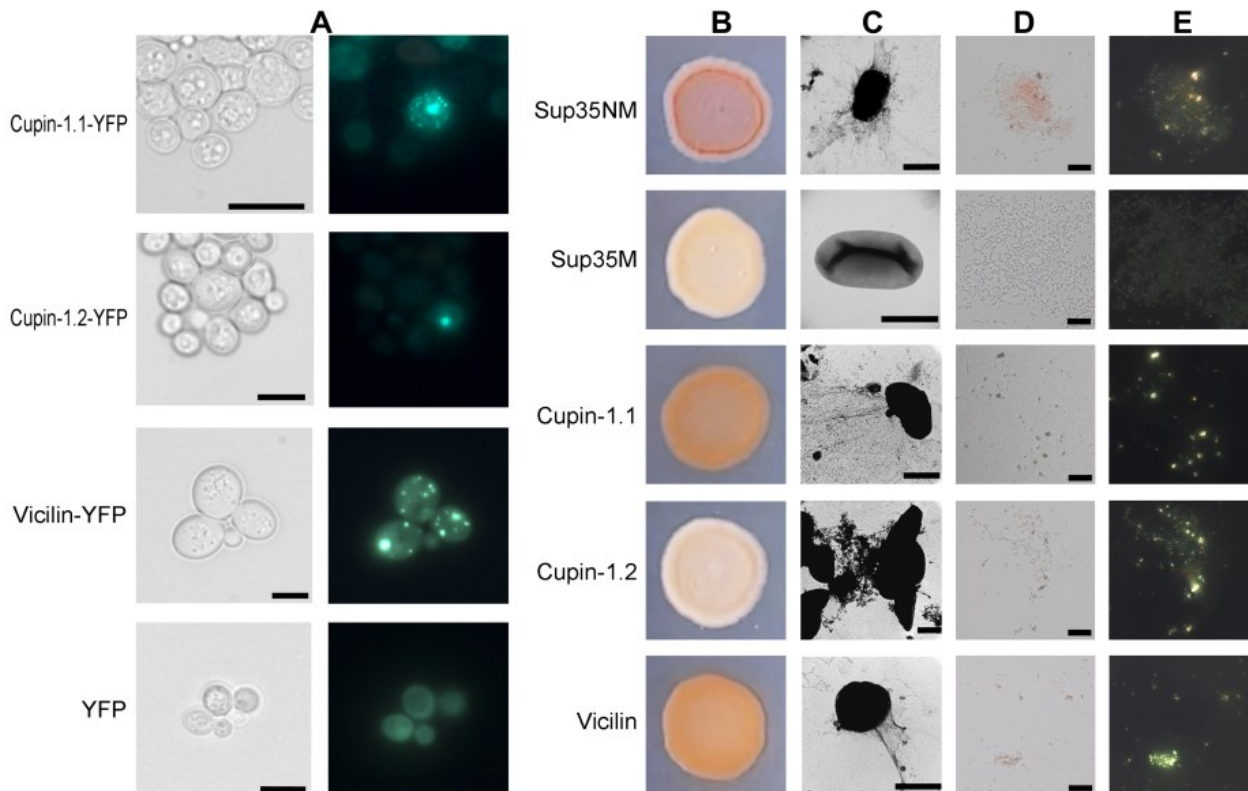


Figure 5. Amyloid properties of vicilin and its Cupin-1.1 and Cupin-1.2 domains in heterologous systems. **A.** Vicilin and its domains fused with YFP form aggregates during overproduction in *S. cerevisiae* yeast. Images of cells in transmitted (left column) and fluorescent (right column) light. Scale bars are 5 μ m. **B.** Images of bacterial colonies secreting the appropriate proteins to the surface, on a Petri dish with the addition of CR. Colonies secreting the Sup35NM (amyloid) and Sup35M (soluble) proteins were used as positive and negative controls, respectively. **C.** TEM of *E. coli* cells secreting the appropriate proteins. The scale bar is equal to 500 nm (all images except Cupin-1.2) or 1 μ m (Cupin-1.2). **D-E.** The secretion of vicilin and both of its domains fibrils to the surface of *E. coli* cells causes birefringence in polarized light, when stained with CR. Photos of *E. coli* colonies producing the corresponding proteins, taken from a plate with CR, in transmitted (D) and polarized (E) light. The scale bars are 20 μ m [Antonets *et al.*, 2020].

A study of the amyloid properties of vicilin *in vivo* was conducted next. At the first stage of this work, we analyzed the colocalization of an amyloid-specific Thioflavin T (ThT) dye with an anti-vicilin antibody signal on cryosections of pea cotyledons using laser scanning confocal microscopy. The data obtained showed almost complete colocalization of vicilin and ThT signals (Figure 6A), which suggested that vicilin can be found in seeds in the amyloid state [Malovichko *et al.*, 2020].

Since, according to the literature data, vicilin accumulates in the seed intracellular membrane compartments called protein bodies [Chrispeels, Higgins, Spencer, 1982], we isolated these protein bodies using the ultracentrifugation of seed lysates in a sucrose gradient. The content and detergent stability of vicilin in lysates of isolated protein bodies was studied. The data showed that vicilin is the major protein in the composition of protein bodies (Figure 6B). Moreover, in these bodies it exists in the form of detergent-resistant aggregates (Figure 6B).

We stained the isolated protein bodies with CR. Protein bodies bind CR and exhibit birefringence in polarized light (Figure 6C), indicating the presence of protein aggregates with an amyloid structure. A more detailed analysis was carried out using the immunoelectronic microscopy. The intact protein bodies (Figure 6D) bind colloidal gold-labeled antibody against vicilin weakly (Figure 6E), probably because of the membrane [Chrispeels, Higgins, Spencer, 1982]. After the membrane was removed by non-ionic detergents, the affinity of antibody to the content of protein bodies increased significantly (Figure 6F), while additional light ultrasound treatment led to the release of the fibrillar protein aggregates that bound antibody against vicilin (Figure 6G-H). Thus, vicilin forms amyloids both *in vitro* and *in vivo*.

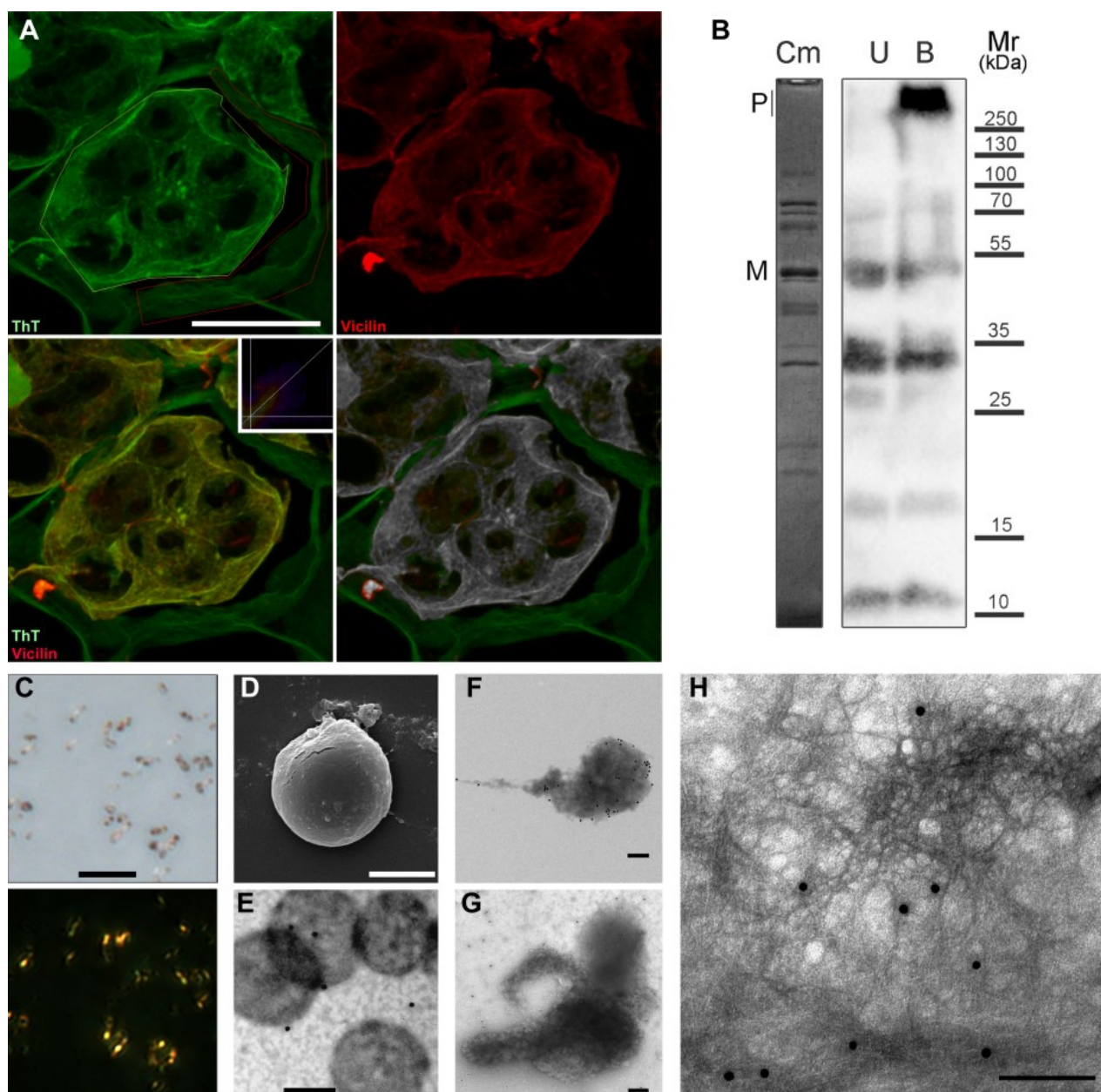


Figure 6. Amyloid properties of vicilin *in vivo*. **A.** Laser scanning confocal microscopy of *P. sativum* L. cotyledon cryosections stained with an amyloid-specific ThT dye (ThT, green) and hybridized with polyclonal rabbit antibody against pea vicilin and secondary goat antibodies against rabbit antibody conjugated with Alexa Fluor 568 dye (red). Bottom left shows the superposition of signals of antibody against vicilin and ThT, right bottom: colocalization of signals (colocalized pixels marked grey), the inset – a scatter graph of the channels. **B.** The content of vicilin and its detergent-resistance in protein bodies isolated from pea seeds. Cm - SDS-PAGE gel with the protein bodies lysate, boiled in a buffer with 2 % SDS. U and B – Western blot hybridization of the same lysates treated with 0.5 % Tween-20 and 2 % SDS, boiled (B) or unboiled (U). **C.** The protein bodies isolated from pea seeds stained with CR dye. The upper photo is

transmitted light, the lower one is polarized. Scale bar is equal to 20 μm . **D.** Scanning electron microscopy of a protein body. The scale bar is equal to 2 μm . **E - H.** Transmission immunoelectron microscopy of protein bodies hybridized with polyclonal antibodies against vicilin and secondary antibodies labeled with gold particles. **E.** Intact bodies. **F.** Bodies treated with Tween-20. **G-H.** The bodies treated with Tween-20 and sonicated. Scale bar is equal to 200 nm [Antonets *et al.*, 2020].

Next, we studied certain physiological features of vicilin amyloid aggregates formed in seeds *in vivo*. Using the Western blot hybridization with polyclonal antibodies against vicilin, aggregates of this protein were shown to accumulate during the seed maturation (we studied protein lysates of seeds on days 10, 20, and 30 after pollination). The content of vicilin aggregates reached its maximum in mature seeds (approximately 30 days after pollination) (Figure 7A), and then they quickly disappear during seed germination (on day 3). At the same time, as the seedlings mature, no monomeric protein is detected, indicating its incorporation in the amyloid aggregates, as well as, probably, that proteases are involved in the disassembly of aggregates of storage proteins during germination of the embryo (Figure 7A). Storage protein aggregates could also be disassembled by chaperones during germination but in this case we would expect to see a significant amount of monomeric protein in samples, which was not observed (Figure 7A). Seeds of canned peas have also been shown to contain a significant amount of detergent-resistant aggregates of vicilin (Figure 7A).

We used the IVPD method, sequentially treating protein samples with pepsin and pancreatin proteases in concentrations and with duration similar to the conditions in the gastrointestinal tract [Rubio *et al.*, 2014]. The vicilin amyloids withstand such treatment, while the monomeric protein degrades almost completely (Figure 7B). The toxicity of fibrils and non-fibrillar vicilin in yeast culture has also been compared (Figure 7C-D). The experiment showed that it is the fibrillar, amyloid state of vicilin and both its Cupin-1 domains that exerts high toxicity to yeast cells (Figure 7C), while disordered aggregates or fibrils destroyed by sonication (Figure 7D) induce a less toxic effect (Figure 7C). Similar results have been obtained in human intestinal adenocarcinoma cell culture [Antonets *et al.*, 2020].

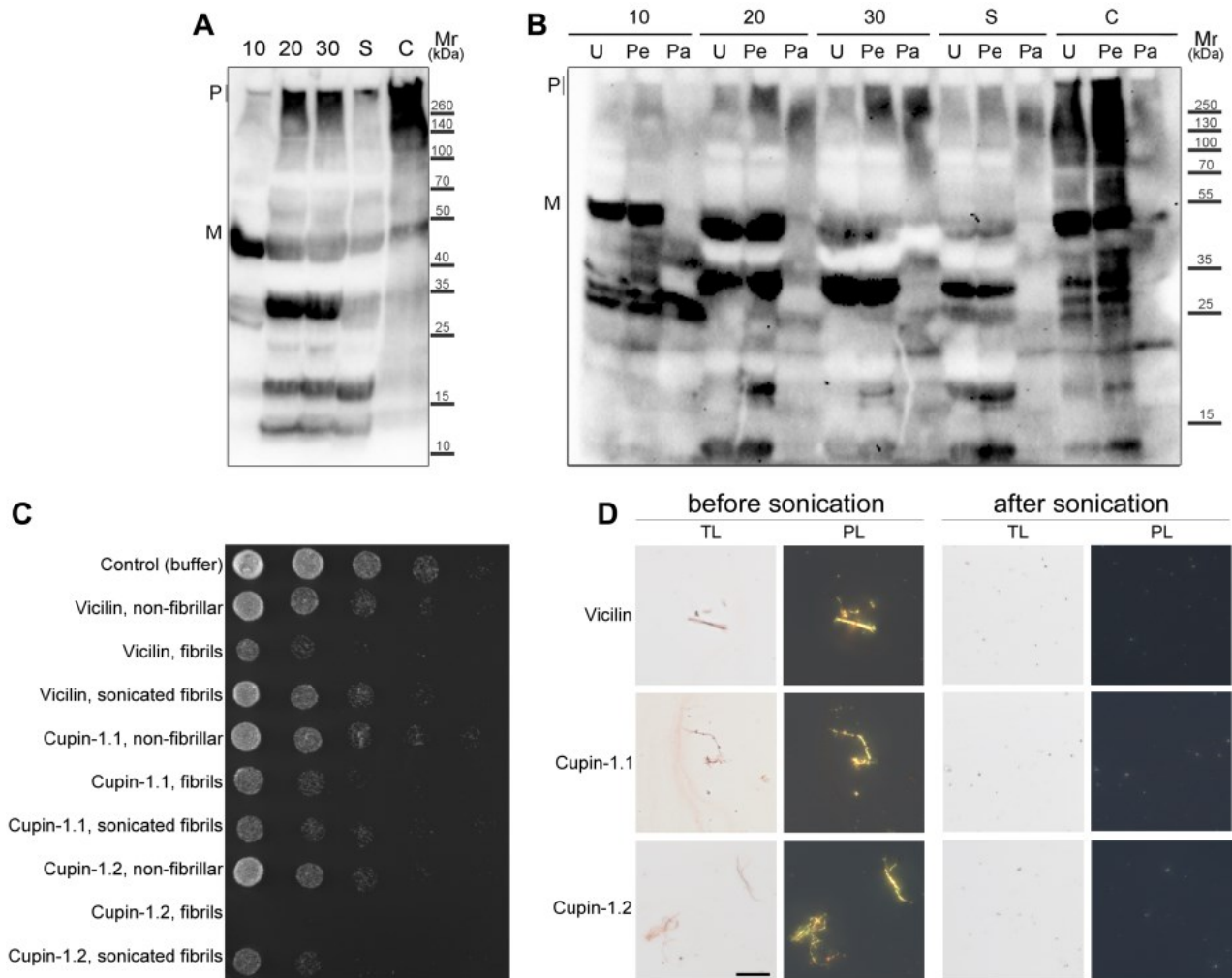


Figure 7. Vicilin amyloidogenesis dynamics during seed formation and toxicity of its amyloids. **A.** Detergent resistance of vicilin aggregates isolated from pea seeds on 10, 20 and 30 days after pollination, sprouts (S) and commercial canned seeds (C) using Western blot hybridization with polyclonal antibodies against vicilin. **B.** Protease resistance of vicilin amyloids in pea seeds using the IVPD method [Rubio *et al.*, 2014] with subsequent Western blot hybridization with polyclonal antibodies against vicilin. U – samples that are not treated with proteases; Pe – treated with pepsin; Pa – treated with pepsin and then pancreatin; P – polymers; M – monomers. All samples in Figures A and B were boiled in a buffer with 2% SDS for 5 minutes before applying to the gel. The molecular weight marker (Mr) is indicated in kilodaltons (kDa). **C.** Toxicity analysis of vicilin and its domains for *S. cerevisiae* yeast. A series of ten-fold dilutions of a liquid yeast culture treated with fibrils, non-fibrillar aggregates, or fibrils of the corresponding proteins destroyed by ultrasound (sonicated) at a concentration of 1 mg/ml put on a Petri dish and incubated for 48 h is shown. **D.** The effect of sonication (40 s, 60 % power, q125 sonicator (Qsonica, USA)) on the fibrils of vicilin and its domains stained with CR. TL – transmitted light; PL – polarized light. Scale bar is equal to 20 μ m [Antonets *et al.*, 2020].

Based on our results, we can conclude that vicilin storage protein accumulates in seeds in the form of amyloid aggregates. The formation of such amyloid structure is probably associated with the long-term stabilization of the protein reservoir of seeds and its protection from degradation before the germination. Vicilin amyloids are toxic to fungal and mammalian cells, they can withstand treatment with gastrointestinal proteases, and are present in canned pea seeds. It seems extremely unlikely that the amyloids contained in the seeds are toxic to humans when consumed, since their concentrations are significantly lower than in the *in vitro* conditions used for our toxicity experiments. However, they can potentially serve as a source of severe food allergies. It should be noted that vicilin (primarily from peanuts) is one of the most important allergens in plant-derived food [ACRerdaas *et al.*, 2018; Sanchez-Monge *et al.*, 2004]. In this regard, the effect of rapid, probably proteolytic, degradation of vicilin amyloids during seed germination allows us to suggest reasonable using the centuries-old tradition of soaking legume seeds before eating, which can significantly reduce the amount of storage proteins in the amyloid form. Sprouted seeds will also have a reduced amount of amyloid-form protein.

It should also be noted that the Cupin proteins and, in particular, vicilins [Sales *et al.*, 2000] protect the plant from pathogens due to their lectin activity [Gomes *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 2003]. Considering the toxicity of fibrils to fungi [Antonets *et al.*, 2020], amyloidogenesis of storage proteins can potentially protect seeds (and possibly other organs) of plants from pathogens.

In general, taking into account the results of bioinformatic screening [Antonets, Nizhnikov, 2017a], confirmed by experimental data [Antonets *et al.*, 2020], we can assume that the functional amyloidogenesis of seed storage proteins is a conservative feature not only of legumes, but also, in general, of land plants.

CHAPTER II: Amyloidogenesis and Supra-Organismal Interactions

The interaction of plants with microorganisms is one of the key biotic factors that have beneficial effects for plants, such as stimulating growth by optimizing nutrition, but also can cause diseases and even death of the host plant [Imam, Singh, Shukla, 2016]. The role of amyloidogenesis in symbiotic supra-organismal interactions had not been described when the study started. However, significant data were accumulated on bacterial amyloids in supra-organismal pathogen-host interactions [Kosolapova *et al.*, 2020], primarily on interactions of bacteria with animals (amyloid biofilms and bacterial toxins) [Schwartz, Boles, 2013a; Gerven Van *et al.*, 2018], as well as with plants (amyloid bacterial toxins, harpins that induce hypersensitivity response in plants) [Oh *et al.*, 2007].

At the initial stage of our work, we decided to identify functional groups of proteins and protein domains in bacterial proteomes enriched with potentially amyloidogenic regions. We performed the bioinformatic screening of proteomes of more than 80 species of alphaproteobacteria belonging to the order *Rhizobiales*, including both nitrogen-fixing symbiotic root nodule bacteria and plant and animal pathogens [Carvalho *et al.*, 2010]. The analysis of the biological functions of potentially amyloidogenic proteins predicted by SARP showed that they are most often related to virulence, including lipopolysaccharide biosynthesis and flagellum formation [Antonets, Nizhnikov, 2013; Antonets, Kliver,

Nizhnikov, 2018]. The Waltz algorithm [Maurer-Stroh *et al.*, 2010] predicted proteins responsible for transmembrane transport, being also a key component of virulence systems, as the most amyloidogenic [Antonets, Kliver, Nizhnikov, 2018].

A detailed analysis of protein domains containing potentially amyloidogenic regions (PARs) in the proteomes of bacteria of the order *Rhizobiales* showed [Antonets, Kliver, Nizhnikov, 2018] that the domains of the LptD family were among the most enriched with QN-rich regions predicted by the SARP algorithm (Figure 8). These domains are transmembrane β -barrels of the outer membrane that transport lipopolysaccharides and play a key role in controlling supra-organismal interactions of both the pathogen-host and symbiont-host types [Jones *et al.*, 2007; Zha *et al.*, 2016].

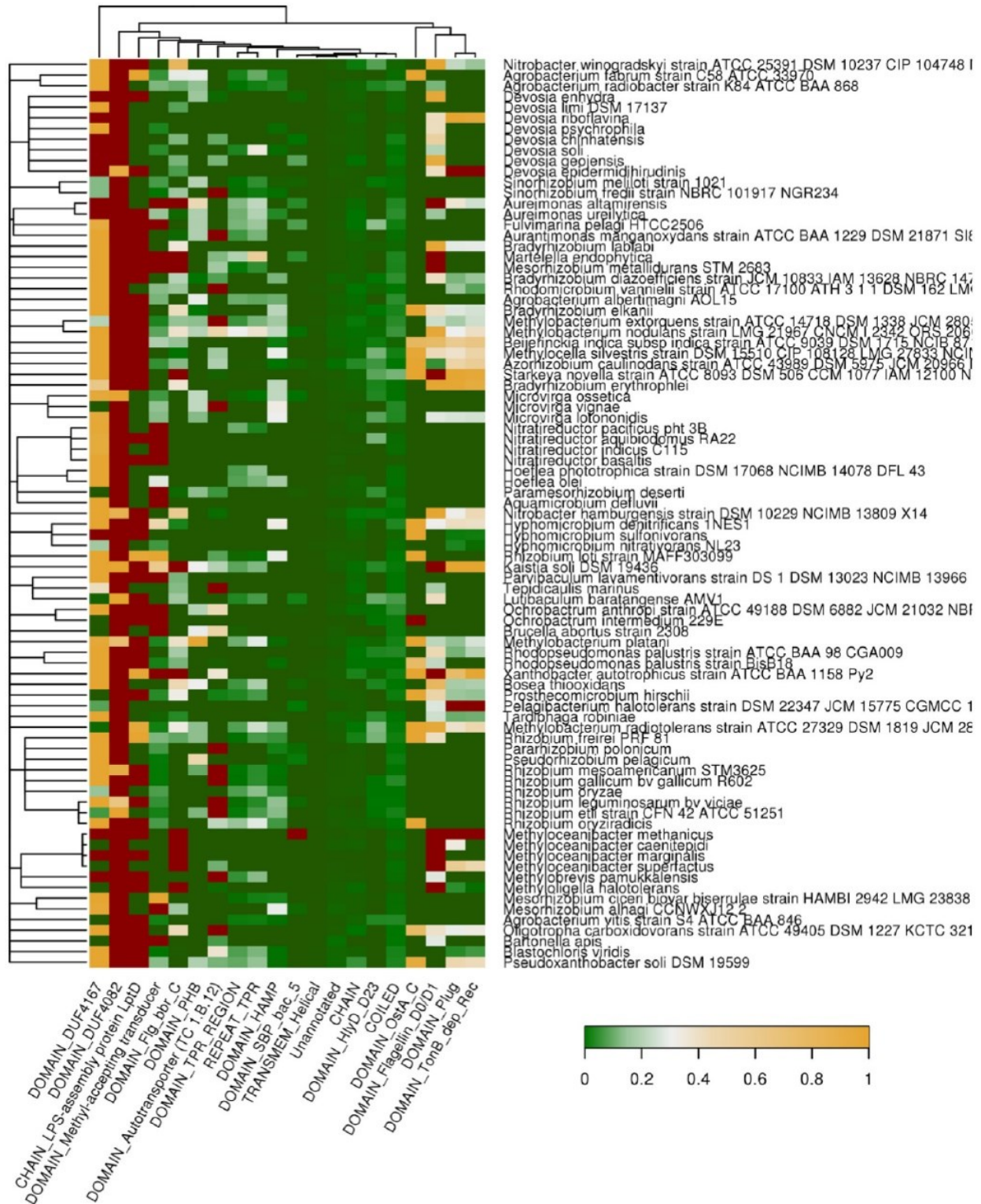


Figure 8. Protein domains associated with QN-rich potentially amyloidogenic regions in the proteomes of bacteria of the order *Rhizobiales*. Amyloidogenic regions were predicted by the SARP algorithm. The cell color corresponds to the proportion occupied by QN-rich regions in the total length of the corresponding domains in all analyzed proteomes. Dark red dye indicates that the corresponding species does not have this domain group. The tree of species corresponds to their phylogenetic position [Antonets, Kliver, Nizhnikov, 2018].

YadA-like, RTX-toxin-like, and hemolysin-like proteins were identified as the most enriched in potentially amyloidogenic regions proteins associated with pathogenesis [Antonets, Kliver, and Nizhnikov, 2018]. All of them are involved in the virulence control, form transmembrane β -barrel-like structures, or are enriched with regularly repeated β -sheets [Hafeez *et al.*, 2005; Hoiczky, 2000; Linhartová *et al.*, 2010; Tahir El, Skurnik, 2001]. Thus, the data obtained in a large-scale bioinformatic screening showed that transmembrane proteins with the " β -barrel" type structures involved in the virulence control may be the most likely candidates for the role of new amyloids of bacteria belonging to the order *Rhizobiales*

To test this hypothesis, we performed the experimental proteomic screening in the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, which is able to form symbiosis with the garden pea *P. sativum* L. and fix atmospheric nitrogen in its root nodules [Tsyganov *et al.*, 2003]. As a result, 54 proteins forming detergent-resistant aggregates were identified in the proteome of a free-living culture of *R. leguminosarum* bv. *viciae* [Kosolapova *et al.*, 2019]. Most of them were represented by enzymes, but about 1/5 of them were membrane proteins. Many of these proteins tend to form " β -barrel" structures and are associated with the bacterial virulence [Rollauer *et al.*, 2015]. To analyze the amyloid properties, we selected two outer membrane proteins: RopA, which was identified with the maximum mass spectrometric score, and RopB. Both of these proteins, according to the bioinformatic prediction, had a β -barrel structure (Figure 9) [Kosolapova *et al.*, 2019].

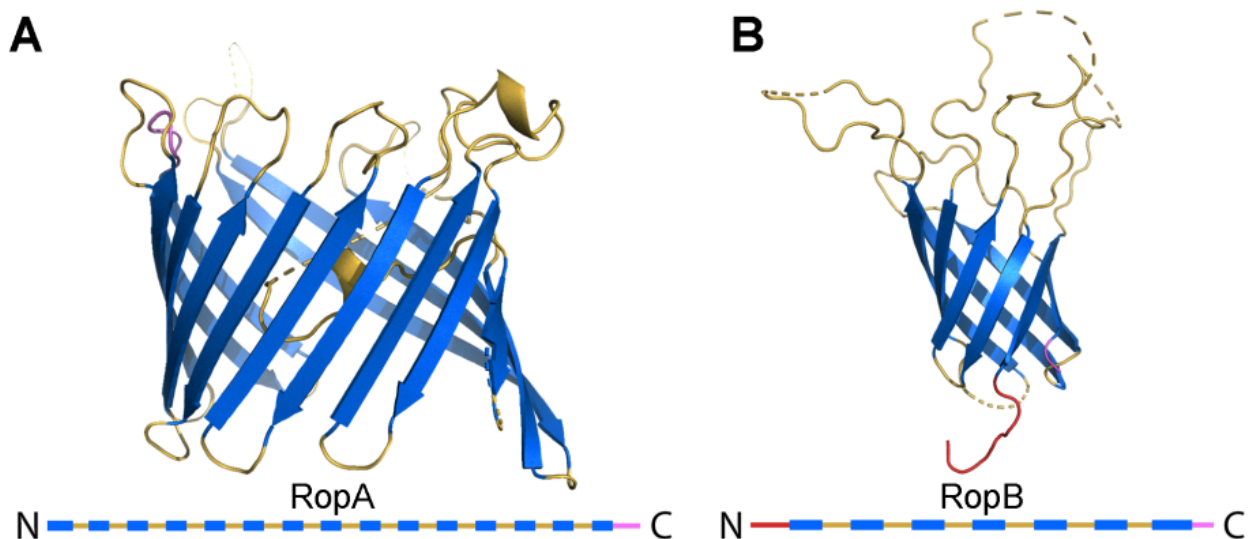


Figure 9. A. and B. Structures of the RopA and RopB proteins, respectively, predicted by the I-TASSER server [Yang, Zhang, 2015]. The elements of the secondary structure of proteins are presented in a linear sequence under spatial models. Blue rectangles represent β -sheets; yellow ones represent loops; red and purple ones represent the N-terminus and C-terminus of proteins, respectively [Kosolapova *et al.*, 2019].

Recombinant RopA and RopB proteins fused with a sequence of six histidines (6H) at the C-terminus were expressed in *E. coli* cells, purified, and subjected to fibrillogenesis in a buffer with pH=2.0. Full-length RopA and RopB formed weakly branched fibrils that are easily visualized using transmission electron microscopy (Figure 10A) [Kosolapova *et al.*, 2019]. These fibrils were found to bind CR exhibiting apple-green birefringence in polarized light (Figure 10B) and are resistant to treatment with ionic detergents and proteases (Figure 10C-D), thus demonstrating the key properties of amyloids *in vitro* [Kosolapova *et al.*, 2019].

Next, we analyzed the ability of full-length RopA and RopB proteins to form amyloids during secretion to the surface of *E. coli* C-DAG cells [Sivanathan, Hochschild, 2013]. The data obtained using this system also

confirmed the amyloidogenic properties of RopA and RopB: *E. coli* cells secreting RopA and RopB formed clearly distinguishable fibrils (Figure 11D), bound CR (Figure 11A-B), and showed green birefringence (Figure 11C) [Kosolapova *et al.*, 2019].

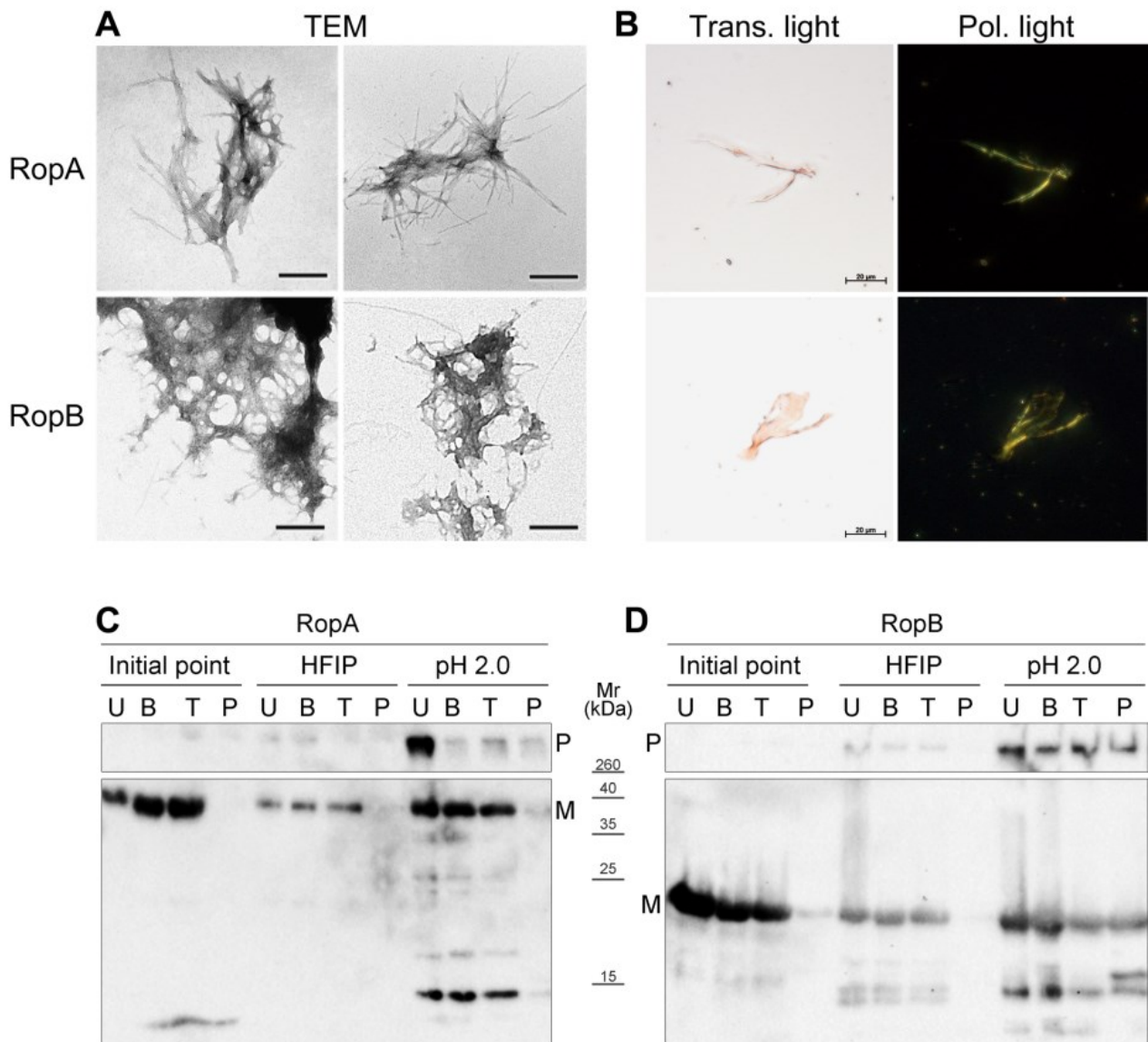


Figure 10. Amyloid properties of RopA and RopB fibrils obtained *in vitro*. **A.** TEM of RopA and RopB fibrils obtained in a buffer with pH=2.0. Scale bar is equal to 200 nm. **B.** Staining of RopA and RopB fibrils with CR dye. Left – transmitted light, right – polarized light. The top row is RopA, the bottom row is RopB. Scale bar is equal to 20 μ m. **C.** and **D.** analysis of the resistance of RopA and RopB aggregates, respectively, to ionic detergents and proteases using Western blot hybridization with antibodies against the 6H sequence. Initial point is

unstructured aggregates; HFIP and pH 2.0 are fibrils obtained using the corresponding buffers. P – polymers; M – monomers; U – unboiled samples treated with 2 % SDS; B – samples treated with 2 % SDS and subjected to boiling; T – treated with trypsin; P – treated with pancreatin. Mr – marker of molecular weight in kilodaltons (kDa) [Kosolapova *et al.*, 2019].

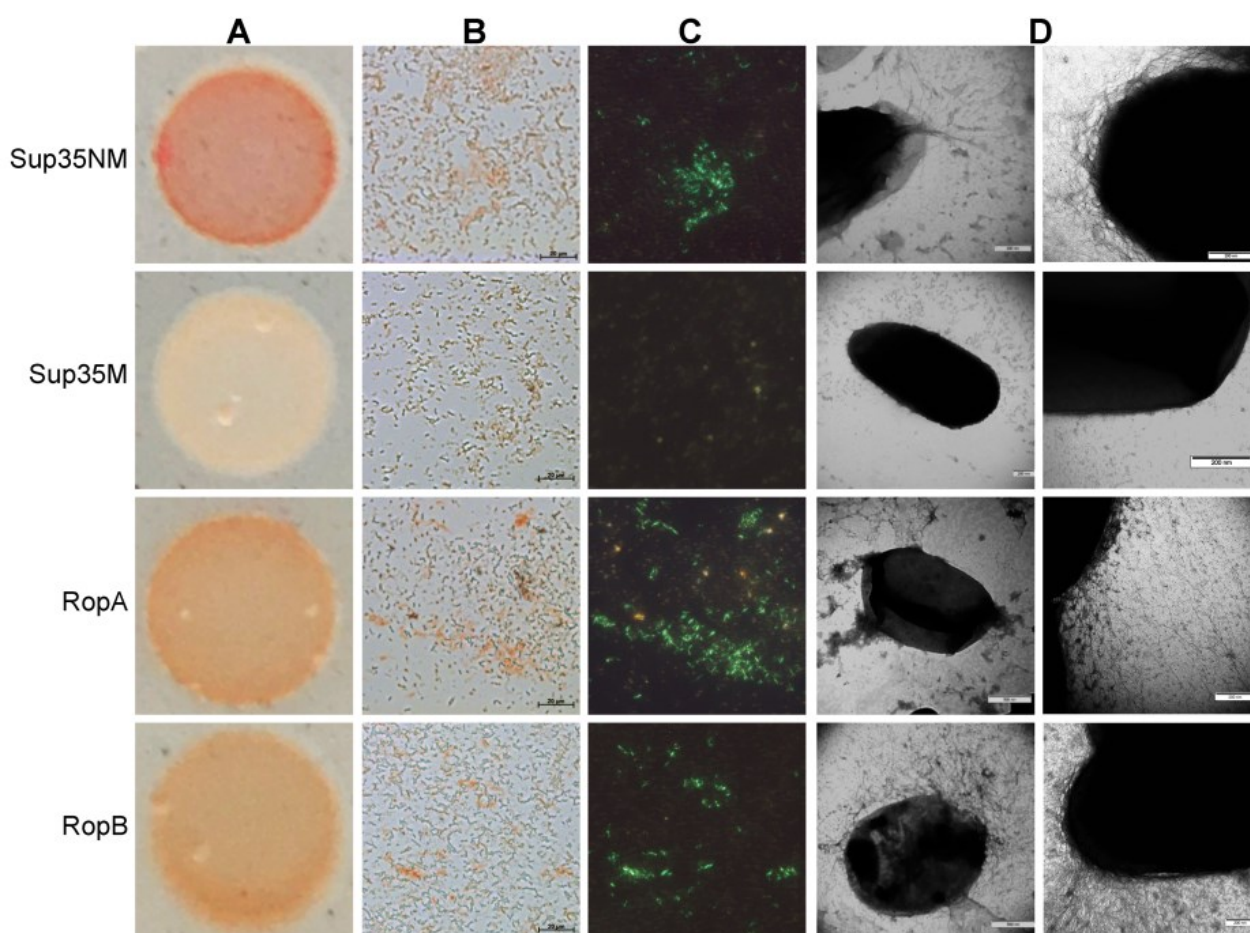


Figure 11. Study of the amyloid properties of RopA and RopB during secretion to the surface of *E. coli* cells in the C-DAG system [Sivanathan, Hochschild, 2013]. **A.** *E. coli* colonies secreting the corresponding proteins on Petri dishes with the addition of CR. *E. coli* cells that secrete the corresponding CR-stained proteins in transmitted (**B.**) and polarized (**C.**) light. Scale bars are equal to 20 μm . **D.** TEM of *E. coli* cells secreting indicated proteins. In all parts of the Figure cells secreting Sup35NM amyloid protein were used as a positive control, and secreting soluble Sup35M were used as a negative control [Kosolapova *et al.*, 2019].

To confirm the amyloid properties of RopA and RopB, they were analyzed *in vivo* in the bacterium *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Both proteins form detergent-resistant polymers *in vivo* (Figure 12A and B), and the amount of RopA polymers increases upon stimulation with the flavonoid luteolin (Figure 12B) [Kosolapova *et al.*, 2019], which is known to trigger the formation of plant-microbial symbiosis [Tolin *et al.*, 2013; Zaat *et al.*, 1987]. Through the immunoelectron microscopy it was shown that RopA and RopB form fibrils in the extracellular capsule of *R. leguminosarum* (Figure 12D-G), which binds CR and shows green birefringence (Figure 12C). Thus, we found that the RopA and RopB proteins of *R. leguminosarum* have amyloid properties *in vivo* [Kosolapova *et al.*, 2019].

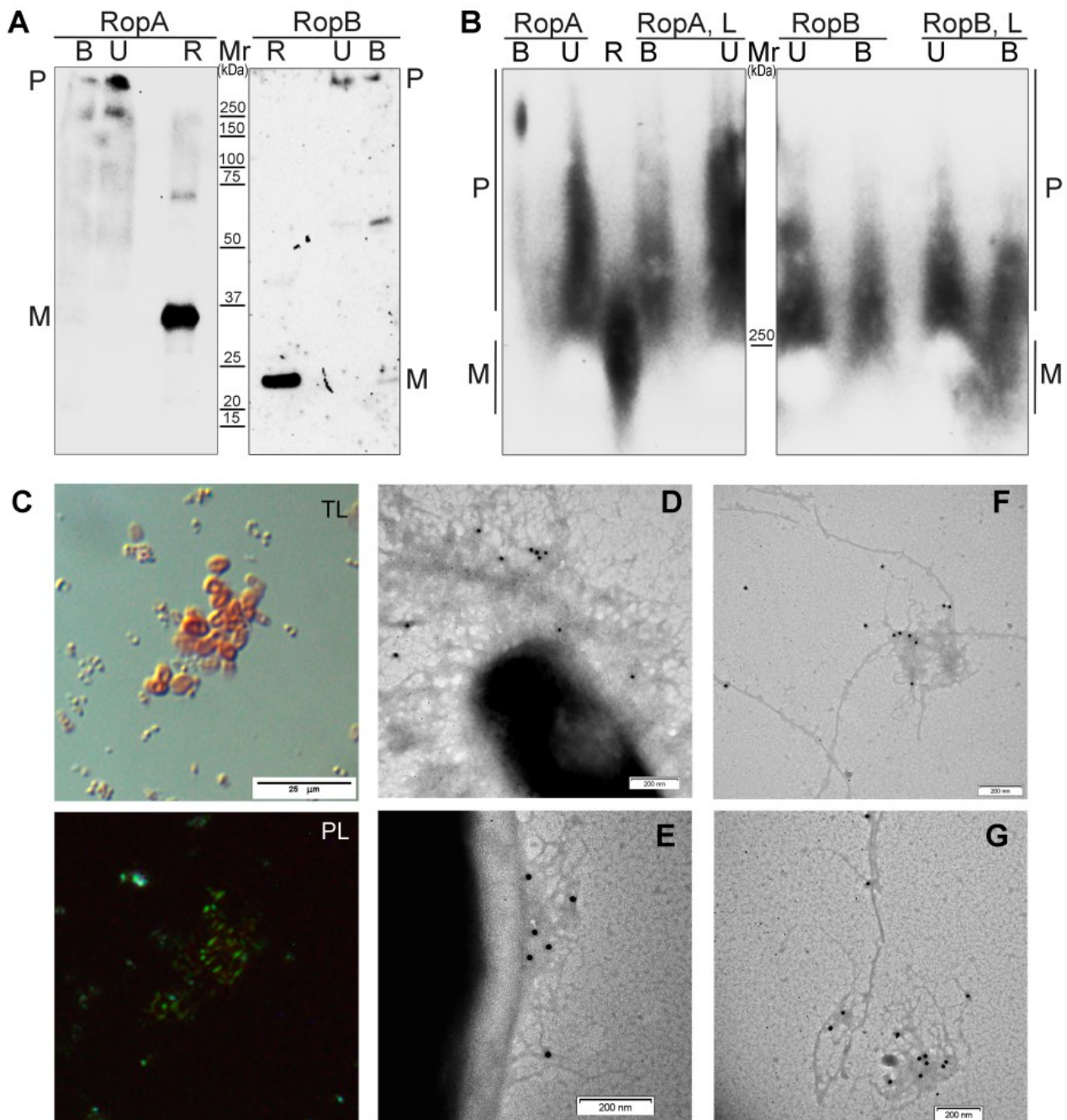


Figure 12. Amyloid properties of RopA and RopB *in vivo* in the *R. leguminosarum* cells. **A-B.** Analysis of the detergent resistance of RopA and RopB aggregates in protein lysates isolated from *R. leguminosarum* cells using SDS-PAGE (**A**) or SDD-AGE (**B**) followed by Western blot hybridization with polyclonal antibodies specific to these proteins. U – unboiled samples treated with 2 % SDS; B – samples treated with 2 % SDS and boiled; L - cells of *R. leguminosarum* were treated with the flavonoid luteolin; R – samples with control recombinant RopA or RopB proteins. The molecular weight marker (Mr) is indicated in kilodaltons (kDa). **C.** Colonies of *R. leguminosarum* grown on a solid medium for seven days and stained with CR, in transmitted (TL) and polarized (PL) light. Scale bar is equal to

20 μm . Immunoelectron microscopy of the *R. leguminosarum* cells and extracellular material hybridized with polyclonal antibodies against RopA (**D** and **E**) or RopB (**F** and **G**) and secondary antibody conjugated with colloidal gold. Scale bars are shown in the images [Kosolapova *et al.*, 2019].

The RopA and RopB *R. leguminosarum* proteins are the first amyloids identified in symbiotic bacteria. While the role of amyloidogenesis in pathogen-host interactions is well known [Kosolapova *et al.*, 2020], the involvement of amyloids in mutualistic symbiont-host interactions has not been described before. The *ropA* and *ropB* gene expression increases at the early stages of symbiosis [Tolin *et al.*, 2013] and then decreases during the nitrogen-fixing bacteroids formation in plant root nodules [Maagd *et al.*, 1994; Roest *et al.*, 1995], which supports the role of RopA and RopB as the virulence factors. Our data not only showed that these proteins form amyloids *in vivo* but demonstrated that amount of RopA amyloids was elevated under conditions similar to the initial stages of symbiosis [Kosolapova *et al.*, 2019]. Thus, the data support the hypothesis that amyloidogenesis is involved in the formation of supra-organismal interactions of the symbiont-host type.

Several possible functions of the root nodule bacteria amyloids are assumed upon such interactions. On the one hand, they can function as adhesins, providing the attachment of bacterial cells to the plant on the early symbiotic stages, similarly to the effect of some pathogenic amyloids on multicellular bacterial hosts. The mechanical function of the root nodule bacteria amyloids cannot be excluded as well. For instance, tubulin cytoskeleton is known to be involved in the formation of so-called

infection threads, that is, structures employed by bacteria to move to the nodule primordium, as well as in the release of bacterial cells into the cytoplasm of plant cells during the root nodule formation [Kitaeva *et al.*, 2016]. Taking into account some similarity in the properties of amyloid fibrils and cytoskeletal protein polymers, it can be assumed that amyloids secreted by bacteria could also mediate the formation of infection threads and the movement of bacterial cells along them.

Finally, the third possible hypothesis is the participation of amyloid proteins of root nodule bacteria in signal transmission. Some fungal amyloids, such as [Het-s] *Podospira anserina* [Coustou *et al.*, 1997], participate in specific signaling interactions mediated by the NLR receptor proteins (nucleotide-binding, leucine-rich repeat) associated with the control of multicellularity, protection from pathogens, and programmed cell death [Bondarev *et al.*, 2018; Saupe, 2020]. In such interactions, amyloids may act as the templates that drive the NLR oligomerization that activates signal transduction [Saupe, 2020]. NLR-like proteins are present in both animals and plants where they activate response to the pathogens [Maekawa, Kufer, Schulze-Lefert, 2011] and are also involved in the control of specificity of plant-microbial symbioses [Cao *et al.*, 2017]. We cannot exclude that bacterial amyloids also mediate conformational transitions of NLR or any other receptors, thus affecting the signaling pathways that mediate interactions between root nodule bacteria and a host organism.

It should be noted that the virulence systems controlling symbiotic and pathogenic supra-organismal host interactions in bacteria have a

significant degree of similarity, both in the repertoire of virulence factors and in the mechanisms of their action [Soto, Sanjuán, Olivares, 2006]. Comparing complexes of amyloidogenic proteins in the proteomes of symbiotic and pathogenic bacteria was of great interest in this regard.

We performed the proteomic screening of amyloid proteins [Nizhnikov *et al.*, 2014b; Antonets *et al.*, 2016; Nizhnikov *et al.*, 2016b] in the laboratory strains of a common pathogen and a component of the normal intestinal microflora, gammaproteobacterium *E. coli* [Kaper, Nataro, Mobley, 2004]. As a result of this experiment, 61 proteins that form detergent-resistant polymers in the *E. coli* proteome [Antonets *et al.*, 2016] were identified. Most of them, as in the case of *R. leguminosarum*, were represented by enzymes, and almost a quarter – by membrane proteins, a number of which tend to form structures of the "β-barrel" type and are associated with virulence and pathogenesis of *E. coli* [Thoma *et al.*, 2018]. For example, outer membrane porins OmpA, OmpC, and OmpF, were among the identified *E. coli* proteins. They play an important role in the virulence and pathogenesis of this microorganism [Hejair *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2012]. For OmpA and OmpC, the fibril-forming ability has been shown by other research groups [Danoff, Fleming, 2015; Joseph Sahaya Rajan *et al.*, 2016].

We decided to analyze whether the detergent-resistant *E. coli* proteins identified by us [Antonets *et al.*, 2016] contain novel functional protein groups for which amyloidogenic properties have not yet been demonstrated. The mucin metallopeptidase YghJ of *E. coli* was chosen as a representative of such previously unstudied in the context of amyloidogenic properties group of proteins. This metallopeptidase is an important virulence factor of enterotoxigenic strains of this bacterium [Kotloff *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2015]. To test the amyloidogenic properties *in vitro*, an evolutionarily conservative YghJ domain belonging to the family of M60-like mucin metallopeptidases [Nakjang *et al.*, 2012] and located closer to the C-terminus of the protein (Figure 13A) was used (working with full-length YghJ *in vitro* was impossible due to its large size, more than 1500 aa).

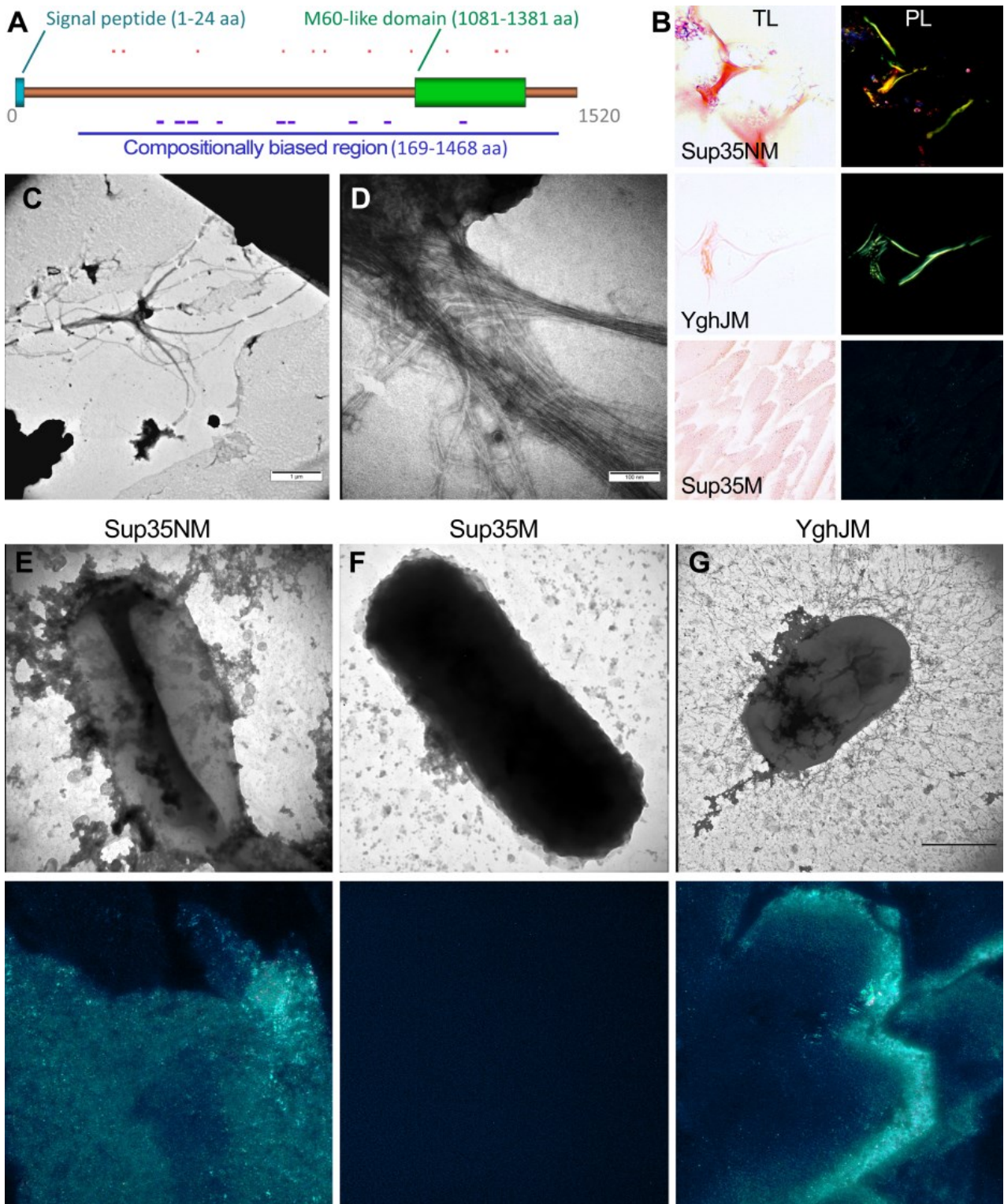


Figure 13. Amyloidogenic properties of the M60-like domain of the YghJ metallopeptidase of the enterobacterium *E. coli*. **A.** Schematic representation of the YghJ protein. The signal peptide (1-24 aa.) and the M60-like domain (1081-1381 aa.) (YghJM) are shown. PARs predicted by WALTZ [Maurer-Stroh *et al.*, 2010] are shown in red; ArchCandy [Ahmed *et al.*, 2014] are shown in purple; the compositionally biased region predicted by SARP [Antonets, Nizhnikov, 2013] is shown in blue. **B.** Staining of YghJM fibrils obtained *in vitro* with a CR dye. The left

column depicts transmitted light; the right column depicts polarized light. Amyloid fibrils of Sup35NM and soluble Sup35M protein were used as positive and negative controls, respectively. **C-D.** TEM images of YghJ fibrils obtained *in vitro*. **C.** Magnification 20 000 times. **D.** Magnification 200 000 times. The scale bar is shown in the image. **E-G.** TEM (upper row) and polarization microscopy of *E. coli* cells grown on a medium with CR (lower row) secreting the YghJM protein (**G**), as well as control amyloid Sup35NM (**E**) or soluble Sup35M (**F**) proteins [Belousov *et al.*, 2018].

We demonstrated that M60-like YghJ domain forms fibrils *in vitro* that bind CR and exhibit apple-green birefringence in polarized light (Figure 13B). These fibrils also have a characteristic morphology when visualized using transmission electron microscopy (Figure 13C and D). Thus, they have key properties of amyloidogenic proteins [Belousov *et al.*, 2018]. Moreover, this domain formed fibrils that bind CR and cause birefringence in polarized light when secreted to the surface of *E. coli* cells in the C-DAG system [Sivanathan, Hochschild, 2013], in conditions close to *in vivo* (Figure 13E-G) [Belousov *et al.*, 2018]. Our data show that *E. coli* YghJ mucin metallopeptidase forms detergent-resistant aggregates *in vivo*, and its evolutionarily conservative M60-like domain forms amyloid fibrils *in vitro* and also when secreted to the surface of *E. coli* cells. Thus, mucin metallopeptidases with an M60-like domain are a new family of bacterial amyloidogenic proteins [Belousov *et al.*, 2018].

Taken together, we may conclude that detergent-resistant amyloidogenic protein fractions of symbiotic and pathogenic proteobacteria are similar in terms of the protein functional composition and are enriched with virulence factors and proteins forming structures of the "β-barrel" type [Antonets *et al.*, 2016; Kosolapova *et al.*, 2019]. Such

proteins, examples of which are RopA and RopB of *R. leguminosarum* [Kosolapova *et al.*, 2019], are *bona fide* amyloids, apparently involved in the formation of supra-organismal systems of the symbiont-host or pathogen-host types, depending on the specialization of the corresponding bacterium [Kosolapova *et al.*, 2020]. The repertoire of prokaryotic amyloid proteins associated with virulence and pathogenesis may be much wider than is currently believed, as shown, among other data, by our proteomic studies [Antonets *et al.*, 2016; Kosolapova *et al.*, 2019] and demonstration of the amyloidogenic properties of YghJ mucin metallopeptidase of *E. coli* [Belousov *et al.*, 2018].

CHAPTER III: Prion Formation: Loss- or Gain-of-Function?

Amyloids involved in different biological functions are identified in various groups of eukaryotes and prokaryotes. However, the way amyloid aggregate formation affects functional activity of respective proteins, remains understudied. Infectious amyloids, prions, of yeast *S. cerevisiae* are the most convenient models for studying structural and functional properties of amyloidogenesis [Chernova, Wilkinson, Chernoff, 2014; Wickner *et al.*, 2015]. Currently, about ten amyloid prions have been identified in yeast. Most of them exhibit phenotypes similar to deletions of corresponding structural genes [Du *et al.*, 2008; Alberti *et al.*, 2009; Rogoza *et al.*, 2010; Patel, Gavin-Smyth, Liebman, 2009; Wickner, 1994; Wickner, Masison, Edskes, 1995]. This effect represents one of the conventional criteria of yeast prions suggested by Reed Wickner in 1994 [Wickner, 1994]. It is explained by the fact that prionization is usually accompanied by changes in the protein three-dimensional structure leading to its aggregation and formation of amyloids consisting of presumably inactivated protein [Baxa *et al.*, 2002; Wickner *et al.*, 2014]. In this regard, it is of special interest to find out if the protein molecules forming prion aggregates are completely inactivated or if they acquire any new functional activity.

To figure this out, we compared the effects of the Swi1 protein prionization with the deletion of its structural gene in yeast *S. cerevisiae*. Swi1 is a component of the global multisubunit transcription regulator SWI/SNF that controls transcriptional activity of chromatin by altering nucleosome structure in an ATP-dependent manner [Dechassa *et al.*,

2008; Sudarsanam *et al.*, 2000]. This protein binds activatory elements in promoters of hundreds of genes related to DNA repair, replication, metabolic cascades, and mating type switching [Dutta *et al.*, 2014; Shivaswamy, Iyer, 2008]. *SWI1* deletion is not lethal, however, exerts pleiotropic effects manifesting as inhibition of vegetative growth, disruption of sporulation, and mating type switching deficiency [Peterson, Herskowitz, 1992]. Swi1 prionization leads to the formation of the [*SWI*⁺] extrachromosomal determinant that suppresses yeast growth on the medium with galactose or other carbon sources but not glucose [Du *et al.*, 2008; Nizhnikov *et al.*, 2016b] as well as inhibits the expression of the *SUP45* gene [Kondrashkina *et al.*, 2014; Nizhnikov *et al.*, 2016b] that encodes the translation release factor eRF1 [Frolova *et al.*, 1994; Zhouravleva *et al.*, 1995]. This results in decreased translation termination efficiency and growth of the [*SWI*⁺] strains bearing nonsense mutations in genes related to the metabolism of adenine (*ade1-14_{UGA}*) and tryptophan (*trp1-289_{UAG}*) on the media lacking these compounds (nonsense suppression) [Nizhnikov *et al.*, 2014a; Nizhnikov *et al.*, 2012; Saifitdinova *et al.*, 2010] (Figure 14). In the presence of [*SWI*⁺], nonsense suppression requires mutant forms of translation termination factor eRF3 (Sup35) with decreased functional activity that act as co-suppressors [Nizhnikov *et al.*, 2012; Nizhnikov, Kondrashkina, Galkin, 2013]. In these strains, *SWI1* deletion exhibits the phenotype similar to [*SWI*⁺] prion inducing nonsense suppression and inhibiting yeast growth on the media with galactose as carbon source [Nizhnikov *et al.*, 2016b] (Figure 14). This implies that the molecular mechanisms underlying phenotypic manifestations of [*SWI*⁺] prionization and *SWI1* gene deletion could be similar.

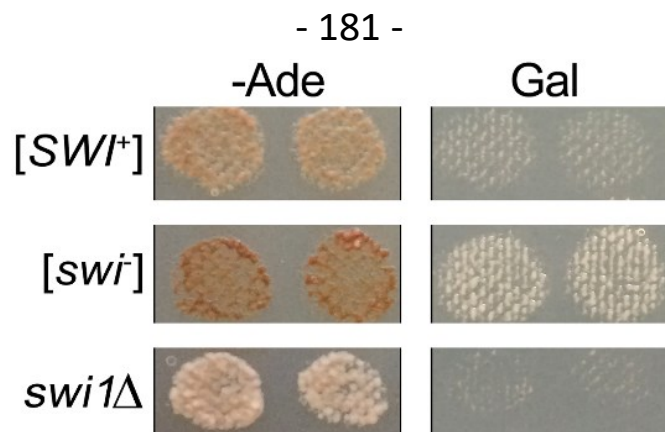


Figure 14. Phenotypic manifestations of Swi1 prionization and *SWI1* deletion in haploid yeast strains bearing mutant Sup35 variants with decreased functional activity (in this case, Aβ-Sup35MC is used) and nonsense allele *ade1-14_{UGA}*. The images showing yeast grown on the selective media containing galactose (Gal) as the sole carbon source were obtained after the 24 h incubation at 30°C (prior to this, yeast grown on the galactose-containing media underwent three extra 24 h passages by replica-planting). Images showing the yeast grown on the adenine depleted media (-Ade) were taken after five days of incubation at 30°C.

To compare the effects of Swi1 prionization and *SWI1* deletion in detail and to determine if the mechanisms of their phenotypic manifestations are similar, we performed sequencing of complete transcriptomes of the isogenic haploid (*MATa sup35Δ:HIS3 ade1-14 his3 leu2 lys2 ura3 trp1-289 [pL-Aβ-Sup35MC] [swi⁻]* (Swi1 protein is in the soluble form in such strain), [*SWI*⁺] (Swi1 protein is in a prion form), and *swi1*Δ (Swi1 is absent) yeast strains [Malovichko *et al.*, 2019]. The yeast strains were grown on the medium containing galactose as the sole carbon source where [*swi*⁻] exhibited clearly distinct phenotype from [*SWI*⁺] and *swi1*Δ. RNA sequencing was performed using HiSeq 2500 (Illumina, USA) in a paired-end mode with read length of 2*100 base pairs [Malovichko *et al.*, 2019].

SWI1 deletion was shown to affect yeast cell transcriptome more significantly than Swi1 prionization (Figure 15). Swi1 prionization resulted in increased expression of 40 genes and decreased expression of 119 genes while *SWI1* deletion led to increased expression of 822 genes and decreased expression of 1156 genes (Table 1) [Malovichko *et al.*, 2019].

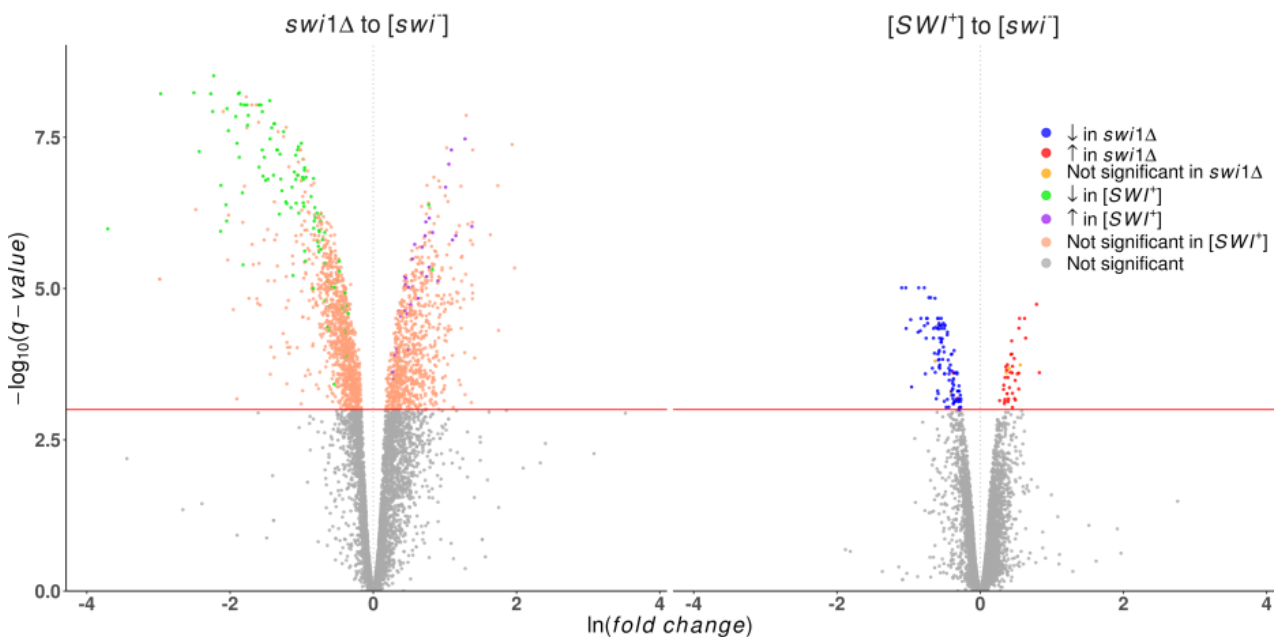


Figure 15. Volcano plots showing differentially expressed genes in the $[SWI^+]$ and *swi1Δ* strains compared with the $[swi^-]$ strain grown on selective medium containing galactose as the sole carbon source. X-axis shows $\ln(\text{fold change})$ in expression between $[swi^-]$ and a corresponding strain ($\ln(\text{fold change})$). Y-axis shows $-\log_{10}(q\text{-value})$ calculated using R Sleuth package [Pimentel *et al.*, 2017]. Genes with statistically insignificant changes in expression are shown below a red line in grey while differentially expressed genes ($FDR < 0.001$) are indicated as follows: (↓ - downregulated genes in a corresponding strain; ↑ - upregulated genes) [Malovichko *et al.*, 2019].

Table 1. The influence of $[SWI^+]$ prion formation and *SWI1* deletion on expression of yeast genome on a medium containing galactose as the sole carbon source [Malovichko *et al.*, 2019]

Changes in gene expression	Comparison		
	$[SWI^+]$ to $[swi^-]$	<i>swi1Δ</i> to $[swi^-]$	<i>swi1Δ</i> to $[SWI^+]$
Increased (FDR<0.001)	40	822	409
Decreased (FDR<0.001)	119	1156	730
Total	159	1978	1139

Analysis of differentially expressed genes distribution in yeast chromosomes showed that these genes are distributed mostly uniformly (Figure 16). Nevertheless, significant aberrations in differential expression profiles were detected in chromosome I of the *swi1Δ* strain where about 50% of genes were upregulated (for the other chromosomes, this value was equal to 6.9-14.4%), as well as in chromosome XII (469317-489341 bases) containing *RDN1* locus encoding rDNA tandem repeats whose expression was almost fully repressed (Figure 16). These effects were not observed in the $[SWI^+]$ strain [Malovichko *et al.*, 2019].

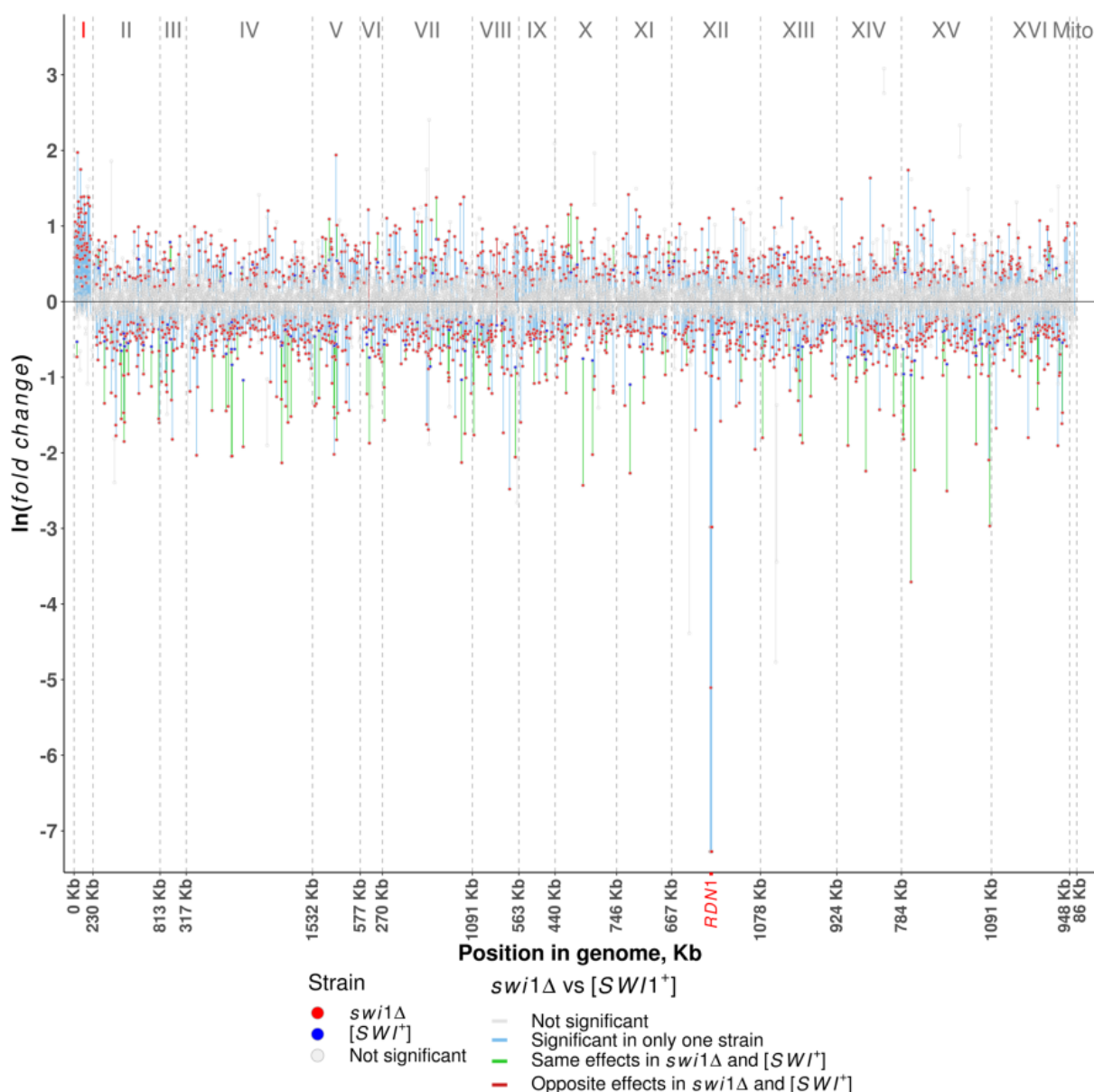


Figure 16. Chromosome distribution of genes with altered expression in the presence of $[SWI^+]$ prion or *SWI1* deletion on selective medium containing galactose as the sole carbon source. X-axis indicates genome coordinates, Y-axis indicates $\ln(\text{fold change})$ in expression of corresponding genes in $[SWI^+]$ or *swi1Δ* compared with $[swi^-]$. Vertical dotted lines and Roman numerals indicate the chromosome boundaries and numbers, respectively. Red dots indicate significant changes of expression ($FDR < 0.001$) in the *swi1Δ* strain; blue dots indicate significant changes of expression in the $[SWI^+]$ strain; grey dots indicate insignificant changes. Grey lines indicate insignificant changes in the expression of a corresponding gene in the *swi1Δ* and $[SWI^+]$ strains; blue lines indicate significant changes in one of the strains (*swi1Δ* or $[SWI^+]$); green lines indicate upregulation or downregulation of a gene in both strains (*swi1Δ* и $[SWI^+]$); red lines indicate gene upregulation in one of the strains and downregulation in the other one [Malovichko *et al.*, 2019].

We suggested that in contrast to Swi1 prionization, *SWI1* gene deletion causes the chromosome I disomy. To test this hypothesis, we analyzed the expression of three markers (*ade1-14*, *BUD14*, and *CDC24*) located in different regions of chromosome I using real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The data obtained showed that all three genes were upregulated in *swi1Δ* strain compared to [*SWI*⁺] and [*swi*⁻] strains [Malovichko *et al.*, 2019] (Figure 17A). Moreover, chromosome I aneuploidy was stably maintained in the *swi1Δ* strain for 6 days of passaging on complete medium (Figure 17B). However, chromosome I disomy was gradually eliminated after the plasmid containing the region of chromosome XVI with an intact copy of *SWI1* gene introduced in the strain (Figure 17C). Therefore, in contrast to Swi1 prionization, *SWI1* deletion leads to chromosome I disomy [Malovichko *et al.*, 2019].

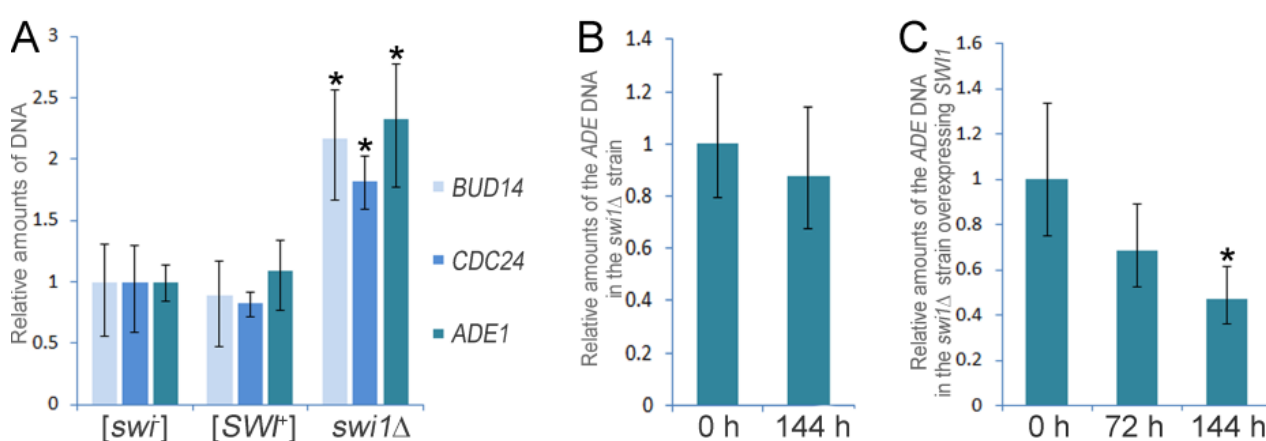


Figure 17. Verification of chromosome I disomy in the *swi1Δ* strain and analysis of the stability of its maintenance and elimination by quantitative PCR (qPCR). **A.** Comparative analysis of copy numbers of *ADE1*, *BUD14*, and *CDC24* genes in [*SWI*⁺], [*swi*⁻], and *swi1Δ* strains. **B.** Analysis of chromosome I disomy stability in the *swi1Δ* strain (*ADE1* was used as a marker of chromosome I copy number). **C.** The influence of *SWI1* expression in the *swi1Δ* strain on the chromosome I copy number (*ADE1* was used as a copy number marker). In all

experiments, qPCR was performed using genomic DNA of the corresponding strain as a template and previously published primers and probes [Malovichko *et al.*, 2019]. Yeast were grown at 30°C for the indicated time periods. *ACT1* gene was used as a control. Data are presented as $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm SD$ [Livak, Schmittgen, 2001]. Values in the control samples or at the initial time points were set as 1. Each experiment was performed in five biological replicates. Significance of the changes was determined using Kruskal-Wallis criterion. Asterisk indicates the significance level $p \leq 0.01$ [Malovichko *et al.*, 2019].

Next, we compared the influence of Swi1 prionization and deletion of its structural gene on biological processes and molecular functions annotated in the “Gene Ontology” database (<http://geneontology.org/>). *SWI1* deletion was shown to suppress most processes related to translation including ribosome biogenesis, translation initiation and elongation as well as activation of responses to the high osmolarity of a medium, nutrient deprivation, and treatment with chemicals. These effects are absent in the presence of [SWI⁺] prion, however, we observed a specific decrease in aminoacid transport and general transmembrane transport (Figure 18) [Malovichko *et al.*, 2019].

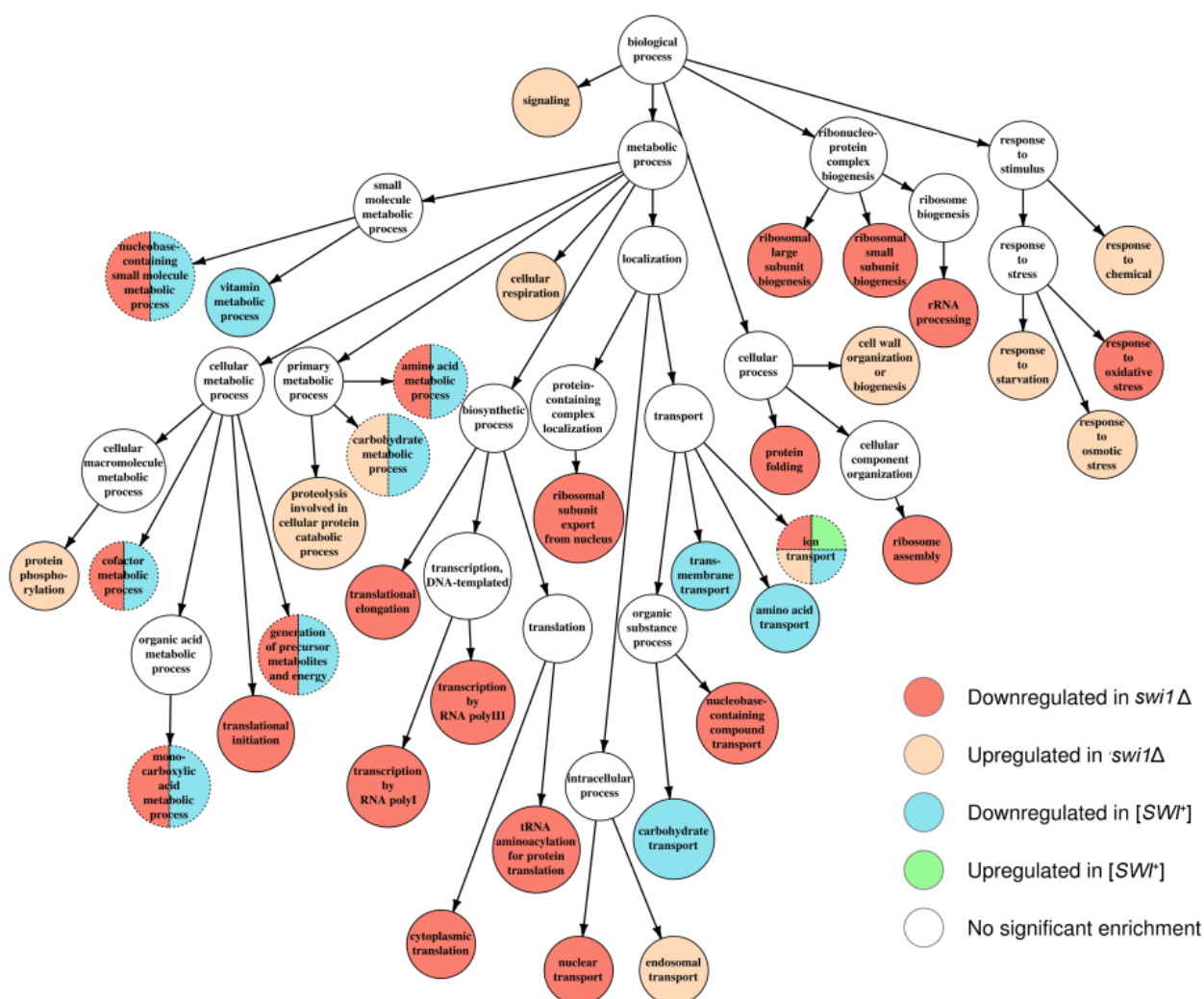


Figure 18. The diagram illustrating the inhibition and activation of biological processes in $[SWI^+]$ и $swi1\Delta$ strains grown on the media containing galactose as the sole carbon source, according to the analysis performed using topGO package [Alexa, Rahnenfuhrer, 2016] in the “Gene Ontology” database (<http://geneontology.org/>). Several internal nodes were removed from the diagram for better visual perception. The colours used are explained in the Figure. A full version of the Figure is available in the supplementary materials to our paper published earlier [Malovichko *et al.*, 2019].

The analysis of metabolic pathways with altered activity in the presence of $SWI1$ deletion or $Swi1$ prionization showed that numerous metabolic pathways are specifically modulated by $[SWI^+]$ prion while not affected by $SWI1$ deletion (Figure 19). At the same time, 2-oxocarboxylic acid and arginine metabolism is specifically stimulated only by $[SWI^+]$ but

not by *SWI1* deletion (Figure 19). Therefore, the data indicate that Swi1 prionization is not the same as the deletion of its structural gene but rather specifically alters certain cellular functions and metabolic pathways [Malovichko *et al.*, 2019].

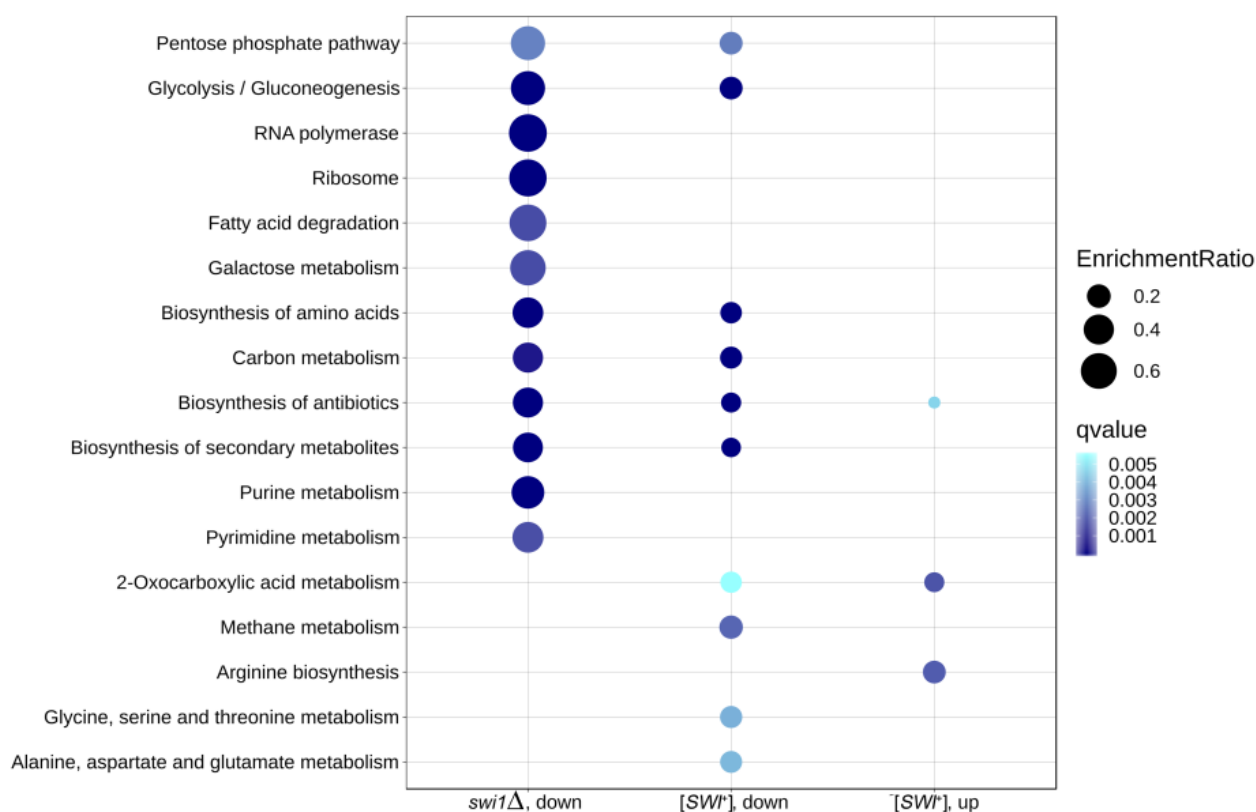


Figure 19. Metabolic pathways activated or suppressed in [*SWI*⁺] and *swi1Δ* strains on a medium containing galactose as the sole carbon source according to KEGG Pathway test performed using the clusterProfiler package [Yu *et al.*, 2012] and visualized by ggplot2 [Ginestet, 2011]. Dot size represents the enrichment ratio, while the colour gradient reflects the experimental means of q value in the respective assay. Pathways are sorted in descending order based by the total enrichment ratio in all three categories (a metabolic pathway is downregulated in *swi1Δ*, downregulated in [*SWI*⁺] or upregulated in [*SWI*⁺] [Malovichko *et al.*, 2019]).

As there are essential differences between the effects of Swi1 prionization and the deletion of its structural gene, we analyzed the mechanisms underlying the phenotypic manifestations of these Swi1 states. As nonsense suppression in the $[SWI^+]$ strains bearing mutant forms of eRF3 (Sup35) with decreased functional activity results from *SUP45* gene downregulation [Kondrashkina *et al.*, 2014; Nizhnikov *et al.*, 2016b], we compared the *SUP45* mRNA amounts in the $[swi^-]$, $[SWI^+]$, and *swi1* Δ strains (Figure 20). Real-time quantitative PCR data showed that the *SUP45* mRNA levels in $[swi^-]$ and *swi1* Δ do not differ (Figure 20B). Moreover, an increase in *SUP45* gene expression in the *swi1* Δ strain did not attenuate nonsense suppression (Figure 20A). Thus, in contrast to the $[SWI^+]$ strain, nonsense suppression in the *swi1* Δ strain does not result from the *SUP45* gene downregulation [Malovichko *et al.*, 2019].

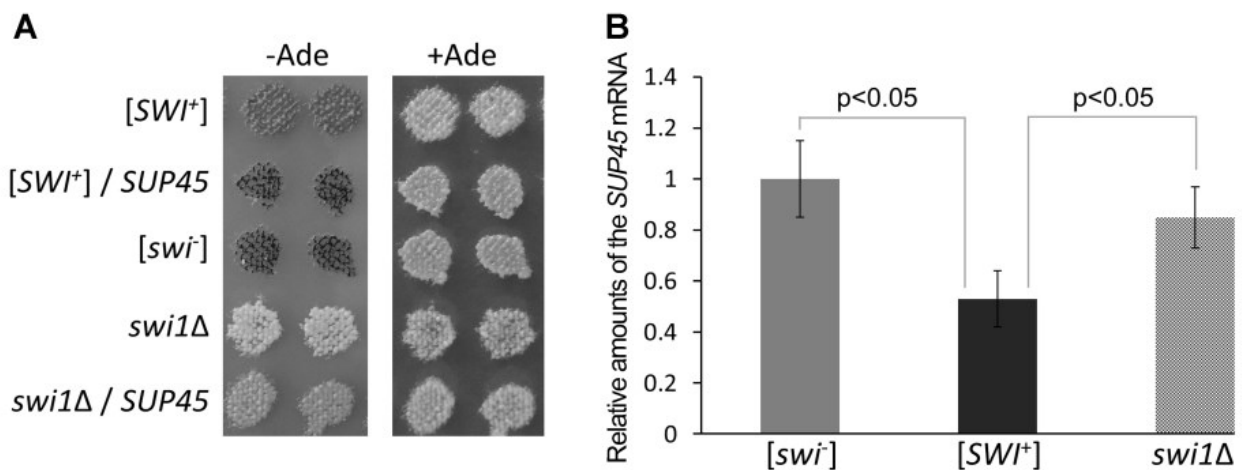


Figure 20. The influence of *SUP45* on phenotypic manifestations of isogenic strains with different Swi1 states. **A.** *SUP45* upregulation does not eliminate nonsense suppression caused by *SWI1* deletion. The image shows $[SWI^+]$ and *swi1* Δ strains with the elevated expression of *SUP45* or without overexpression. The overexpression was achieved by introducing an extra copy of *SUP45* on a centromeric plasmid (indicated as / *SUP45*). The $[swi^-]$ strain was used as control. Cells were grown on the selective media with (+Ade) or without (-Ade) adenine at

30°C for 5 days. **B.** Comparative analysis of *SUP45* expression in the [*SWI*⁺], [*swi*⁻], and *swi1Δ* strains using qPCR. The data are presented as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [Livak, Schmittgen, 2001] with indicated significance levels. The *SUP45* mRNA amount in the [*swi*⁻] cells was set as 1 [Antonets *et al.*, 2017].

The duplication of chromosome I containing *ADE1* gene (presented by *ade1-14_{UGA}* allele) occurring upon *SWI1* deletion [Malovichko *et al.*, 2019] is in agreement with the data on the expression profile of genes located on chromosome I in the [*swi*⁻] and *swi1Δ* strains grown on complete medium [Antonets *et al.*, 2017]. We suggested that nonsense suppression in *swi1Δ* upon adenine deprivation can result from the overexpression of the mutant *ade1-14_{UGA}* allele. In the presence of general dysfunction of translation apparatus, more frequently observed in the *swi1Δ* strain (Figure 18) [Malovichko *et al.*, 2019] than in the strain with intact *SWI1*, a premature stop codon in the transcript of this allele is recognized as a coding codon. This may allow the yeast to grow on the adenine-depleted medium [Nizhnikov *et al.*, 2014a]. Comparative analysis of *ade1-14_{UGA}* mRNA content demonstrated that its level in the *swi1Δ* strain is higher than in the [*swi*⁻] and [*SWI*⁺] strains (Figure 21A) [Antonets *et al.*, 2017]. Moreover, *ade1-14_{UGA}* overexpression in the [*swi*⁻] strain induced the phenotype similar to the *swi1Δ*, however, it was less pronounced (Figure 21B). Therefore, in contrast to the [*SWI*⁺] strain, nonsense suppression occurring in the *swi1Δ* strain on the adenine-depleted medium is mediated by *ADE1* (*ade1-14_{UGA}*) upregulation [Antonets *et al.*, 2017] induced by chromosome I duplication [Malovichko *et al.*, 2019] rather than *SUP45* downregulation.

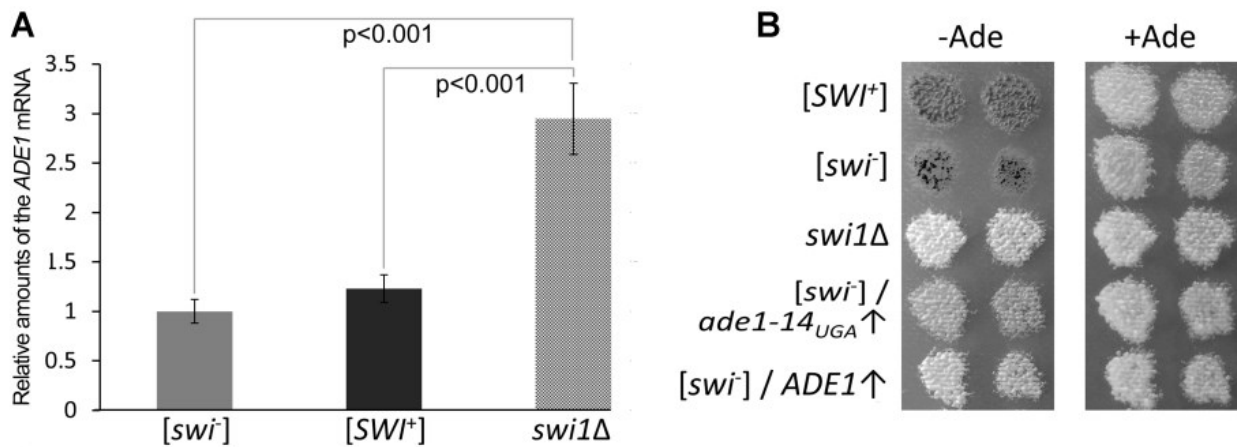


Figure 21. The influence of *ADE1* expression changes on phenotypic manifestations of strains with different states of Swi1. **A.** Comparative analysis of *ade1-14*_{UGA} mRNA amounts in the [*SWI*⁺], [*swi*⁻], and *swi1*Δ strains using qPCR. The data are presented as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [Livak, Schmittgen, 2001] with indicated significance levels. The *ADE1* mRNA amount in [*swi*⁻] cells was set as 1. **B.** The effects of *ade1-14*_{UGA} overexpression on nonsense suppression in the [*swi*⁻] strains. Images showing the [*SWI*⁺], [*swi*⁻], *swi1*Δ, and [*swi*⁻] strains with *ade1-14*_{UGA} or *ADE1* (↑) overexpression grown on the selective medium with (+Ade) or without (-Ade) at 30°C for 5 days [Antonets *et al.*, 2017].

Although *ade1-14*_{UGA} overexpression in the *swi1*Δ strain partially explains its nonsense suppressor phenotype, this effect is less pronounced than the effect of *SWI1* deletion (Figure 22) [Malovichko *et al.*, 2019]. Moreover, *SWI1* deletion leads to nonsense suppression on the tryptophan-depleted medium (Figure 14) [Malovichko *et al.*, 2019]. Considering these data we suggested that nonsense suppression in the *swi1*Δ strain involves two components. Transcriptome sequencing results implied that the second component is presented by the general translation dysfunction in the *swi1*Δ strain caused by the downregulation of the *RDN1* locus which encodes rDNA repeats [Venema, Tollervey, 1999] (Figure 16). To test this hypothesis, we substituted the mutant form of the termination translation factor eRF3 (Sup35) possessing a decreased functional activity (Aβ-Sup35MC) [Nizhnikov *et al.*, 2012] with the wild

type Sup35 in the *swi1Δ*, [*swi*⁻], and [*SWI*⁺] strains. As expected, the [*swi*⁻] and [*SWI*⁺] strains bearing the intact sequence of *SUP35* did not grow in selective media lacked of adenine or tryptophan (Figure 22A) [Malovichko *et al.*, 2019]. At the same time, the *swi1Δ* strain can grow on both media, thus, possessing omnipotent nonsense suppression which reflects a general translation termination dysfunction not related to eRF3 function (Figure 22) [Malovichko *et al.*, 2019]. Adding the aminoglycoside antibiotic paromomycin which induces termination translation dysfunction as well resulted in the growth of the [*SWI*⁺] strain and additionally stimulated the growth of the *swi1Δ* strain (Figure 22A) [Malovichko *et al.*, 2019]. This effect finally confirmed our hypothesis.

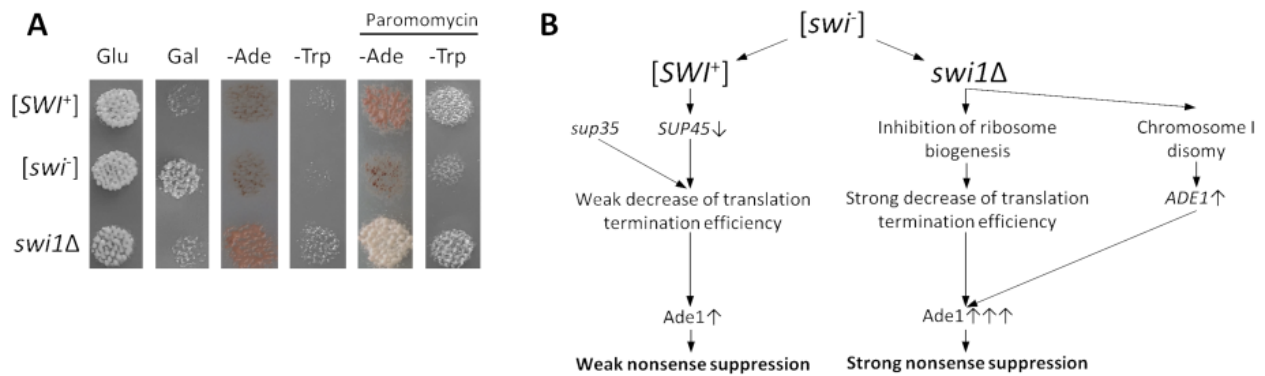


Figure 22. The mechanisms of nonsense suppression in the [SWI⁺] and swi1Δ strains. **A.** The aminoglycoside antibiotics paromomycin induces nonsense suppression in the [SWI⁺] and swi1Δ strains. The growth of the [SWI⁺], [swi⁻], and swi1Δ strains bearing the full-length SUP35, ade1-14_{UGA} and trp1-289_{UAG} nonsense alleles. Images showing the yeast grown on the selective media containing glucose (Glu) or galactose (Gal) as the sole carbon source were obtained after 24 h of incubation at 30°C. Prior to this, the yeast grown on the media with galactose underwent three extra 24 h passages by replica-plating. Images showing the yeast grown in the media lacking adenine (-Ade) and tryptophan (-Trp) were taken after 5 days of incubation at 30°C. **B.** The diagram describes the mechanisms of nonsense suppression caused by Swi1 prionization or SWI1 deletion [Malovichko *et al.*, 2019].

Thus, in our study a detailed comparative analysis of the effects caused by Swi1 prionization and its deletional inactivation has been performed. There was convincing evidence that despite the groups of genes with changed expression in the presence of the [SWI⁺] prion and SWI1 gene deletion share a partial similarity, SWI1 deletion has a number of specific traits absent in the [SWI⁺] strains: (1) chromosome I disomy; (2) the general inhibition of the expression of genes encoding translation apparatus components; (3) specific changes in the expression of genes controlling various molecular processes including the activation of responses to a high osmolarity of environment, nutrient deprivation, and treatment with chemicals [Malovichko *et al.*, 2019]. The [SWI⁺] prion

induces specific effects comprising: 1) the downregulation of genes regulating transmembrane transport of various compounds; 2) the activation of 2-oxocarboxylic acid and arginine metabolism [Malovichko *et al.*, 2019]; (3) the *SUP45* gene downregulation [Kondrashkina *et al.*, 2014; Nizhnikov *et al.*, 2016b]. Although the phenotypic manifestations induced by [*SWI*⁺] prion are similar to *SWI1* deletion, they are mediated by different mechanisms. Therefore, nonsense suppression in the [*SWI*⁺] strains arises from the downregulation of the *SUP45* [Kondrashkina *et al.*, 2014; Nizhnikov *et al.*, 2016b] gene in the presence of mutant forms of Sup35 possessing decreased functional activity [Nizhnikov *et al.*, 2012; Nizhnikov, Kondrashkina, Galkin, 2013], while upon *SWI1* deletion, it stems from a general decrease of translation efficiency caused by the repression of the *RDN1* chromosomal locus as well as from the *ADE1* gene overexpression caused by the chromosome I disomy (Figure 22) [Antonets *et al.*, 2017; Malovichko *et al.*, 2019].

In general, our data indicate that the transition of proteins into prions acting as conformational templates converting the molecules of a soluble protein into aggregates, changes its function rather than completely inactivates it. In terms of classical genetics, prions can be considered as gain-of-function mutations rather than loss-of-function mutations.

CHAPTER IV: Conditional Prions

In the previous chapters of this work, we established that protein conformational templates are more widely spread in nature than it was thought before. Particularly, they are formed in plants and root nodule bacteria in physiological conditions *in vivo*. Formation of conformational templates was shown to alter protein functions as well as its inactivation [Antonets *et al.*, 2017; Antonets *et al.*, 2020; Antonets, Kliver, Nizhnikov, 2018; Antonets, Nizhnikov, 2017a; Kosolapova *et al.*, 2019; Malovichko *et al.*, 2019]. A proteome is a dynamic system, many of its components being capable of changing structure and functions [Picotti *et al.*, 2009]. So we decided to determine if proteins can acquire and maintain prion properties exclusively in specific conditions of protein production. Many proteins are known to significantly change their levels of production *in vivo* upon various stimuli [Chong *et al.*, 2015; Soufi *et al.*, 2009].

The yeast Gln3 protein is a transcriptional regulator of nitrogen catabolism [Cox *et al.*, 2000; Kulkarni *et al.*, 2001] affecting the termination translation efficiency [Nizhnikov *et al.*, 2014a; Nizhnikov *et al.*, 2014c] and containing QN-rich amyloidogenic region (Gln3QN) 166-242 aa. Upon protein overproduction, this region forms the aggregates possessing prion-like [Alberti *et al.*, 2009] and amyloid-like properties [Alberti *et al.*, 2009; Antonets, Sargsyan, Nizhnikov, 2016] as well as interacts with the aggregates of the [*PSI*⁺] and [*PIN*⁺] yeast prions. The efficiency of Gln3QN aggregation is increased in the presence of [*PIN*⁺] [Antonets, Sargsyan, Nizhnikov, 2016]. The aggregates of Gln3QN fragments fused with the yellow fluorescent protein YFP have cytoplasmic localization (Figure 23A)

[Antonets, Sargsyan, Nizhnikov, 2016].

We overproduced full-length Gln3 fused with YFP in yeast cells. The overproduction of this fusion protein causes its aggregation neither in the strains without prions nor in strains bearing the [*PIN*⁺] prion which induces the aggregation and prionization of many yeast proteins [Derkatch, Liebman, 2007a; Derkatch *et al.*, 2001]. Gln3-YFP overproduced in the 1-OT56 [*PIN*⁺] strain demonstrates nuclear localization (Figure 23B) [Antonets *et al.*, 2019; Antonets, Sargsyan, Nizhnikov, 2016].

We suggested that Gln3QN aggregates might serve as a conformational template for the aggregation of full-length Gln3. To test this hypothesis, we co-overproduced Gln3QN fragment fused with the cyan fluorescent protein CFP and full-length Gln3 fused with YFP in 1-OT56 [*PIN*⁺] strain. We successfully isolated several clones containing the aggregates of full-length Gln3-YFP which demonstrated complete colocalization with Gln3QN-CFP aggregates (Figure 23C) [Antonets *et al.*, 2019].

Next, to find out whether Gln3-YFP aggregation is inherited, we eliminated the plasmid for Gln3QN-CFP overproduction. The aggregation of full-length Gln3-YFP was retained in several clones that lost the plasmid for Gln3QN-CFP overproduction. Furthermore, these aggregates were localized in the cytoplasm (Figure 23D, white arrow), however, a certain protein fraction demonstrated a diffuse signal in the nucleus (Figure 23D, black arrow). Therefore, the induced aggregation of full-length Gln3-YFP is inherited in a number of mitotic progeny. Next, we denoted the clones with Gln3-YFP aggregated in the cytoplasm as [*GLN3*↑⁺] («↑» means that

the aggregation is retained upon the overproduction), while the clones with diffuse nuclear localization of Gln3-YFP were denoted as [*gln3*↑⁻] [Antonets *et al.*, 2019].

We tested the stability of [*GLN3*↑⁺] inheritance and showed that the percentage of the aggregate containing cells after passaging for seven days does not significantly differ from the starting point ($p > 0.05$) (Figure 23E). A decrease in Gln3-YFP production, via eliminating additional copper (II) sulfate from the medium and, thus, inhibiting *CUP1* promoter that controls its Gln3-YFP overproduction, induced a complete loss of [*GLN3*↑⁺] after three 24 h passages (overall, for 30 generations) (Figure 23F). Therefore, [*GLN3*↑⁺] is maintained only in case of the overproduction of its structural protein [Antonets *et al.*, 2019].

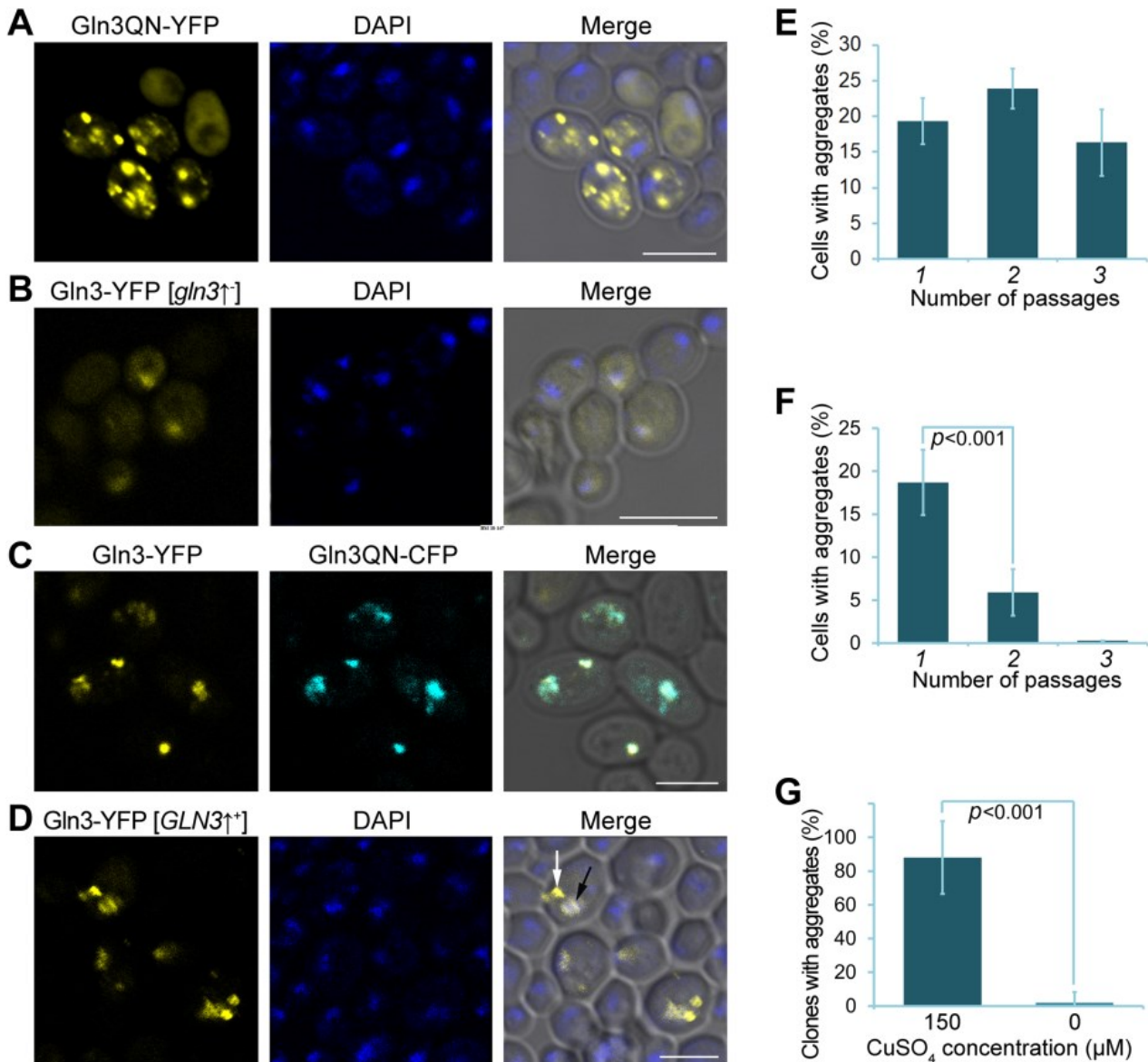


Figure 23. Gln3-YFP aggregation is induced upon co-overproduction with Gln3QN-CFP. **A.** Overproduction of Gln3QN-YFP in the presence of [*PIN*⁺] prion induces the formation of aggregates localized outside the nucleus. **B.** Overproduction of the full-length Gln3-YFP does not cause its aggregation; the protein is mainly located in the nucleus. **C.** Co-overproduction of Gln3-YFP and Gln3QN-CFP in the presence of [*PIN*⁺] prion leads to Gln3-YFP aggregation. **D.** Gln3-YFP aggregation is retained in the absence of Gln3QN-CFP overproduction. A black arrow indicates the Gln3-YFP co-localized with the nucleus, a white arrow indicates the Gln3-YFP aggregate in the cytoplasm. Fluorescence channels that correspond to the used fluorescent proteins and DNA binding dye DAPI are shown. 'Merge' indicates merged fluorescent and phase-contrast images. Scale bar is equal to 5 μ m. **E.** The aggregation of overproduced Gln3-YFP is inherited during mitosis. The numbers of passages are indicated (every 24 h at 30°C). **F.** The termination of Gln3-YFP overproduction abolishes its aggregation which is not restored after repeated overproduction. Percentage of cells containing aggregates after

the indicated number of 24 h passages at 30°C. **G.** Native Gln3 maintains the [*GLN3*↑⁺] state upon overproduction. Percentage of clones that retained [*GLN3*↑⁺] after Gln3-YFP was substituted with Gln3 and cells were passaged on selective media supplemented with 150 μM CuSO₄ (the overproduction under control of *CUP1* promoter inducible by copper (II) ions) or lacking CuSO₄ (no overproduction). Error bars correspond to SD, significance levels are shown. In all experiments, the aggregation was analyzed after cells had been grown on the selective media for 48 h [Antonets *et al.*, 2019].

Next, we substituted the plasmid for Gln3-YFP overproduction with the plasmid for native Gln3 overproduction in the [*GLN3*↑⁺] strain. We passaged the isolated clones overproducing Gln3 on a selective medium for five days, reintroduced the plasmid for Gln3-YFP overexpression, and analyzed the aggregation of this fusion protein. Gln3-YFP aggregation was observed in 88% of progeny of initial clones (Figure 23G). This implied that [*GLN3*↑⁺] determinant was maintained both upon overexpression of the Gln3-YFP fusion protein and the unmodified full-length Gln3 protein [Antonets *et al.*, 2019].

The data implied that [*GLN3*↑⁺] possessed prion properties. To test this suggestion, we analyzed the dependence of [*GLN3*↑⁺] on anti-prion agent guanidine hydrochloride (GuHCl) [Ferreira *et al.*, 2001]. 5 mM GuHCl was shown to cause an approximately 10-fold decrease in the percentage of the [*GLN3*↑⁺] cells after three 24-hour passages (Figure 24A). During passaging the [*GLN3*↑⁺] strain in the medium without GuHCl used as a control, we did not observe a decrease in the percentage of the [*GLN3*↑⁺] cells (Figure 24A). As GuHCl activity towards prions is mediated by inhibition of the ATPase domain [Masison, Reidy, 2015; Romanova, Chernoff, 2009] of Hsp104 chaperone [Chernoff *et al.*, 1995] which is responsible for the fragmentation of prion aggregates necessary for their

efficient transfer to daughter cells [Kushnirov, Ter-Avanesyan, 1998], we analyzed the effect of Hsp104 overproduction and inactivation on [GLN3[↑]]. We found that *HSP104* deletion almost completely abolishes [GLN3[↑]] while Hsp104 overproduction does not affect this non-chromosomal determinant (Figure 24B), similarly to most yeast prions. One of the major properties of prions is their infectivity. To analyze it, we utilized a protein transformation method [Tanaka *et al.*, 2004; Tanaka, 2010]. We used lysate of the haploid [GLN3[↑]] strain as donor of aggregates and spheroplasts of the haploid [*gln3*[↑]] strain as recipients (to prevent possible artefacts, these strains contained different auxotrophy markers and resulting transformants were tested for their haploidy). [GLN3[↑]] was shown to be transferred via protein transformation with an efficiency of approximately 2% (Table 2). In a control experiment, the lysate of [*gln3*[↑]] being used as a donor, no transformants of [GLN3[↑]] were observed (Table 2) [Antonets *et al.*, 2019].

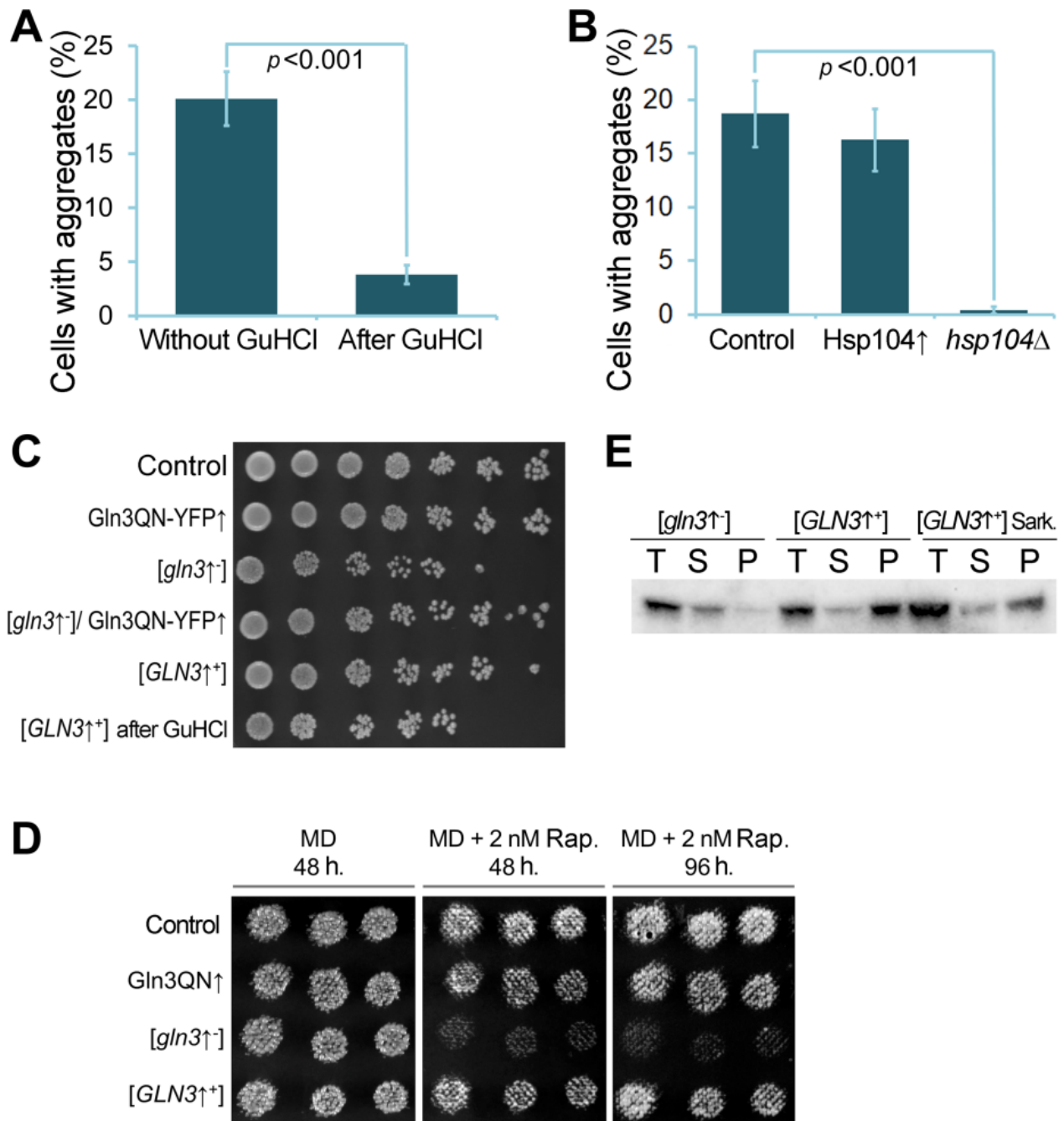


Figure 24. Prion properties of the [GLN3↑⁺] determinant. **A.** Dependence of [GLN3↑⁺] on GuHCl. A percentage of cells containing Gln3-YFP aggregates after passing on the media with or without 5 mM GuHCl is shown. **B.** [GLN3↑⁺] is dependent on Hsp104 chaperone. The effects of Hsp104 overproduction (Hsp104↑) and *HSP104* deletion (*hsp104Δ*) are shown. Error bars correspond to SD, significance levels are shown. **C.** The difference in the growth of the strains that differ in Gln3-YFP aggregation. “[GLN3↑⁺] after GuHCl” is a strain obtained after three passages on the medium containing 5 mM GuHCl. **D.** The influence of 5 ng/ml rapamycin on the growth of the [GLN3↑⁺] and [*gln3*↑⁻] strains on selective media at 30°C. **E.** Gln3-YFP forms aggregates that are resistant to sodium laurylsarcosinate in [GLN3↑⁺] strains but not in

[*gln3*^{↑⁻}] strains. The results of the sedimentation analysis with subsequent western blot hybridization with anti-GFP antibody. T - total protein, S - supernatant, P - pellet, Sark. - the samples treated with 3% sodium laurylsarcosinate (sarkosyl) [Antonets *et al.*, 2019].

Table 2. The infectivity of the conditional prion [*GLN3*^{↑⁺}] upon protein transformation [Antonets *et al.*, 2019]

The strain that is a donor of protein lysate	Experiment No.	The number of isolated transformants	The number of the [<i>GLN3</i> ^{↑⁺}] transformants	[<i>GLN3</i> ^{↑⁺}] transmission efficiency (%)
[<i>GLN3</i> ^{↑⁺}]	1	112	2	1.8
	2	143	4	2.8
	3	98	1	1.0
[<i>gln3</i> ^{↑⁻}]	1	128	0	0.0
	2	75	0	0.0
	3	140	0	0.0

Next, we studied the phenotypic effects of [*GLN3*^{↑⁺}]. Employing a dilution test, we showed that [*GLN3*^{↑⁺}] abates the toxicity observed upon the *GLN3* overproduction: the [*GLN3*^{↑⁺}] strains grow more efficiently than the [*gln3*^{↑⁻}] strains (Figure 24C). As Gln3 inactivation leads to the increased resistance of cells to rapamycin [Cardenas *et al.*, 1999], the inhibitor of TOR-kinase cascade [Zaragoza *et al.*, 1998], we compared the growth of the [*GLN3*^{↑⁺}] and [*gln3*^{↑⁻}] strains in the presence of rapamycin. We demonstrated that the Gln3 overproduction ([*gln3*^{↑⁻}]) significantly suppresses yeast growth on the medium supplemented with 5 ng/ml rapamycin, while Gln3 prion formation restores their resistance to rapamycin (Figure 24D) [Antonets *et al.*, 2019].

As [*GLN3*^{↑⁺}] determinant demonstrated compliance with all key criteria of a yeast prion and exhibited its own phenotypic manifestation, we tested its aggregation using the sedimentation analysis to finally confirm the prion properties of [*GLN3*^{↑⁺}]. We found that in the [*GLN3*^{↑⁺}] most of the Gln3-YFP protein is located in the pellet fraction while in the [*gln3*^{↑⁻}] strain this protein is mainly located in the soluble fraction (Figure 24E). Moreover, treatment of [*GLN3*^{↑⁺}] samples with the ionic detergent sodium N-laurylsarcosinate (3%, 10 min at 4°C) revealed that the [*GLN3*^{↑⁺}] aggregates are resistant to this detergent (Figure 24E). Therefore, the Gln3-YFP protein has two biochemically distinct states: the detergent-resistant aggregated state in [*GLN3*^{↑⁺}] strains and the soluble state in [*gln3*^{↑⁻}] strains [Antonets *et al.*, 2019].

Hence, we can conclude that [*GLN3*^{↑⁺}] possesses the key properties of yeast prions: it is infectious, dominant over [*gln3*^{↑⁻}], dependent on anti-prion agents, and is inducible by the overproduction of its structural protein under the certain genetic conditions (co-overproduction with the Gln3 QN-rich fragment in the presence of the [*PIN*⁺] prion that induces Gln3QN aggregation (Figure 25)) [Antonets *et al.*, 2019].

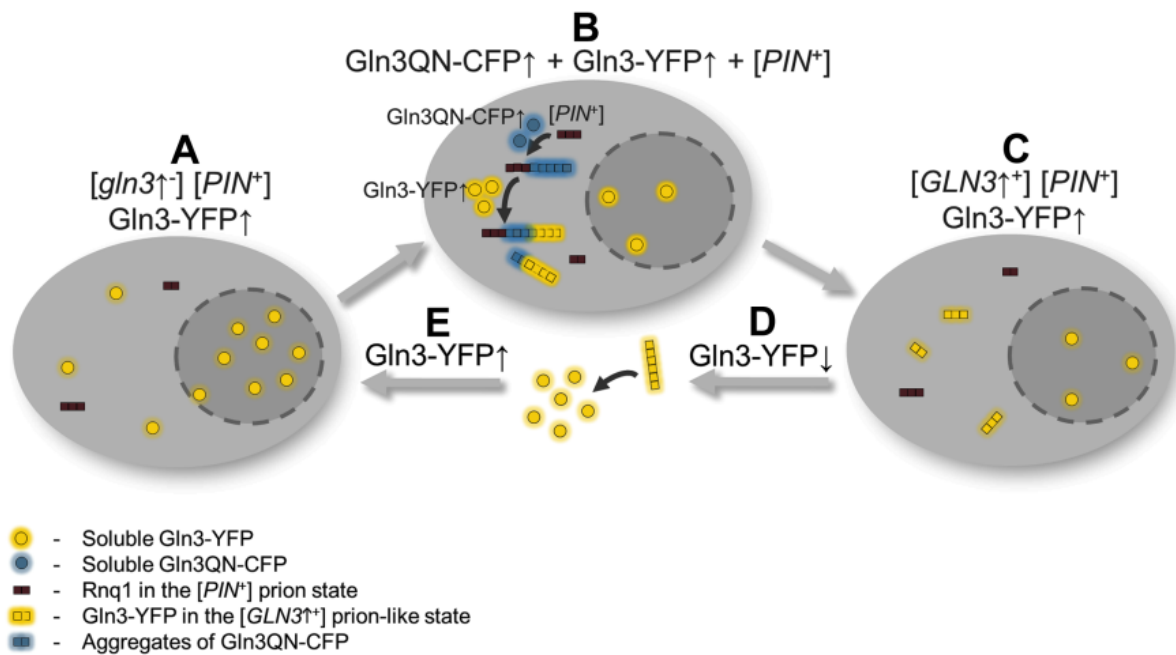


Figure 25. The “life cycle” of the non-chromosomal $[GLN3^+]$ determinant: induction, maintaining, elimination. **A.** The Gln3-YFP overexpression does not cause its aggregation. The protein has a nuclear localization. **B.** $[PIN^+]$ prion causes Gln3QN-CFP aggregation upon overproduction leading to the Gln3-YFP aggregation in the cytoplasm. **C.** The aggregated form of Gln3-YFP is stably maintained and inherited during mitosis after Gln3QN-CFP overproduction is terminated. **D.** Termination of Gln3-YFP overproduction causes a loss of $[GLN3^+]$. **E.** Gln3-YFP overproduction after $[GLN3^+]$ elimination does not cause $[GLN3^+]$ formation *de novo* [Antonets *et al.*, 2019].

One of the most pronounced differences of the $[GLN3^+]$ prion determinant from the previously described yeast prions is its maintaining exclusively upon the constant overproduction of its structural protein Gln3 (Figure 25). We suggest the term of “conditional prions” [Antonets *et al.*, 2019] for such proteins as Gln3, to distinguish them from true (*bona fide*) prions, which are efficiently maintained at their physiological production levels, and artificial prions formed by the proteins with primary structure distinct from the native primary structure (such as isolated prionogenic fragments and synthetic peptides with prion properties [Alberti *et al.*, 2009; Crist *et al.*, 2003; Osherovich *et al.*, 2004]). True prions comprise the

corresponding conformational isoforms of Sup35, Ure2, Rnq1, Mot3, Swi1, Cyc8, Mod5, Sfp1, and Prb proteins [Wickner *et al.*, 2015], whereas artificial prions include the QN-rich fragments of 18 proteins possessing prion properties such as Gln3QN [Alberti *et al.*, 2009; Antonets *et al.*, 2019; Antonets, Sargsyan, Nizhnikov, 2016]. Apart from Gln3, we might consider as conditional prion the Lsb2 protein forming a metastable form [*LSB⁺*] upon its overproduction in response to a heat shock [Chernova *et al.*, 2017]. [*LSB⁺*] determinants meet the basic requirements to be considered as prions, however, its infectivity was not directly shown [Chernova *et al.*, 2017], so unambiguous conclusion concerning its prion nature seems to be immature.

Apart from the described prion determinants in yeast proteome, there are many potential prions that are still to be discovered, some of them may be interacting with each other. For instance, ten yeast multi-subunit regulator complexes contain several QN-rich proteins potentially prone to prionization and three of them (Cyc8/Tup1, Swi/Snf, Pub1/Sup35) containing prion proteins [Nizhnikov *et al.*, 2016a]. We cannot rule out that under certain biotic and abiotic stresses or any other conditions, the level of production of the proteins belonging to these complexes might change and their components might acquire the properties of conditional prions. Similarly to the [*LSB⁺*] [Chernova *et al.*, 2017] prion-like form, this might provide certain adaptive advantages to the strains that produce them.

SUMMARY

In the present study, we for the first time described functional amyloids in plants. Bioinformatic analysis of the proteomes from 75 terrestrial plant species showed that in most analyzed plant species, evolutionally conserved seed storage proteins 7S globulins are enriched with the amyloidogenic regions [Antonets, Nizhnikov, 2017a]. Experimental validation showed that 7S globulin vicilin of pea *Pisum sativum* possesses amyloid properties both *in vivo* and *in vitro* [Antonets *et al.*, 2020]. Vicilin is a bicupin protein containing two conserved Cupin-1 domains with β -barrel structure. Both domains form amyloids *in vitro* being amyloidogenic determinants in the full-length protein molecules. Vicilin amyloids are accumulated during seed maturation and disassembled during seed germination, apparently, due to limited proteolysis. These amyloids are extremely stable, being present in canned pea seeds, resistant to the treatment with physiological concentrations of the gastrointestinal tract proteases, and are toxic to fungi and mammalian cells [Antonets *et al.*, 2020]. Thus, we showed for the first time that amyloidogenesis is a physiological mechanism regulating protein storage in plant seeds which are an essential component of the human diet and a source of allergens. Our data can be valuable for agriculture and food biotechnology and may prove useful for developing new plant varieties with reduced amyloidogenic properties of seed storage proteins, elevated nutritional value, and reducing allergenicity using targeted genome

editing. According to a mention from recent review by Santos and Ventura, the identification of functional amyloids in plants completes the picture that illustrates the global prevalence of amyloids and their key role in the adaptation strategies of various systematic groups of living organisms [Santos, Ventura, 2021].

We for the first time identified amyloids in symbiotic bacteria. Thus, we described amyloids of the outer membrane proteins RopA and RopB that possess β -barrel structure and are formed *in vivo* by the root nodule bacterium *R. leguminosarum*. The content of RopA amyloids is increased upon the stimulation of bacterial cells with flavonoid luteolin which induces a response in microorganisms similar to a response observed at the early stages of the formation of plant-microbial symbiosis [Kosolapova *et al.*, 2019]. These data indicate that amyloidogenesis is involved in symbiotic supra-organismal interactions [Kosolapova *et al.*, 2020].

We experimentally compared the fractions of potentially amyloidogenic detergent-resistant proteins in the proteomes of pathogenic (*Escherichia coli*) [Antonets *et al.*, 2016] and symbiotic (*Rhizobium leguminosarum*) [Kosolapova *et al.*, 2019] proteobacteria demonstrating their similarity and the presence of a substantial amount of virulence factors in these fractions. They were partially represented by proteins with the structure of β -barrel. Similar results were obtained using bioinformatic approaches by analysis of proteomes of pathogenic and symbiotic species of the order *Rhizobiales* [Antonets, Kliver, Nizhnikov, 2018]. Thus, amyloidogenesis is associated with the virulence of both

pathogenic and symbiotic bacteria, whereas proteins containing the β -barrel structure represent important amyloidogenic determinants both in prokaryotes and eukaryotes such as plants.

The data obtained from computational and experimental proteomic approaches imply that the real number of amyloids in prokaryotes is significantly higher than is currently considered. For instance, we identified the mucin metallopeptidase YghJ, which regulates the pathogenesis of enterotoxigenic strains of *E. coli*, in the fraction of proteins of this bacteria that form stable detergent-resistant polymers [Antonets *et al.*, 2016]. The analysis of its conserved M60-like peptidase domain showed that it forms amyloid fibrils both *in vitro* and upon its secretion to the surface of *E. coli* cells [Belousov *et al.*, 2018]. This suggests the role of amyloid states of such proteins as protective structures preventing the premature degradation of bacterial virulence factors in the aggressive internal environment of a multicellular host organism.

Currently, the role of amyloidogenesis in the regulation of the protein functional activity is actively discussed. Most researchers tend to think that amyloidogenesis inactivates the proteins due to their incorporation into the aggregates. In this work, we performed a detailed comparative analysis of the effects of deletional inactivation and prionization (the formation of infectious amyloids) of the Swi1 protein in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. We showed that despite the similarity of phenotypes from the Swi1 deletion and prionization, they are mediated by different molecular mechanisms. For instance, *SWI1* deletion in haploid

yeast causes complex of abnormalities including chromosome I disomy, a decrease in the expression of the *RDN* loci that regulate the production of ribosomal RNA and structural proteins as well as general repression almost of all components of translational apparatus [Antonets *et al.*, 2017; Malovichko *et al.*, 2019]. Swi1 prionization exerts no such effects but rather specifically affects genome expression activating and inhibiting a number of metabolic cascades [Malovichko *et al.*, 2019]. Thus, the results obtained in this work contribute to the understanding of conformational protein templates demonstrating that protein prionization is not the same as the deletion of the encoding gene (loss-of-function) but can also act like a mutation that changes gene function (gain-of-function).

Another aspect of conformational protein template systems investigated in this work was studying the features of their maintaining. We for the first time described prion of yeast Gln3 protein named [*GLN3*↑⁺] which is maintained and inherited in a number of cell generations exclusively upon overproduction [Antonets *et al.*, 2019; Antonets, Sargsyan, Nizhnikov, 2016]. Thus, in this work, we characterized a new class of proteins incapable of prionization under physiological conditions but acquiring prion properties upon altered production conditions with no alterations in their primary structure. We called such prions “conditional prions” [Antonets *et al.*, 2019]. Based on the data obtained, we proposed to classify prions into true (*bona fide*) prions (possessing prion properties in native conditions without alterations in the primary structure), conditional prions (possessing prion properties upon

overproduction or any other alterations in conditions but not in the primary structure), and artificial prions (with altered primary structure) [Antonets *et al.*, 2019].

Taken together, data obtained in the present study make a significant contribution to the knowledge about a biological diversity of amyloids, protein conformational templates, which were for the first time identified in plants and symbiotic bacteria in our works. Our findings would also contribute to understanding the principles of protein conformational templates formation and maintaining (the case of conditional prions), as well as their activity (being the factors altering the protein function).

CONCLUSIONS

1. Amyloidogenesis is a mechanism that mediates protein accumulation and storage in the seeds of land plants.

1.1. Seed storage proteins are among the most enriched with amyloidogenic regions in the proteomes of land plants, while the conserved domains of seed storage proteins belonging to the Cupin-1 family contain such regions in the majority of land plant species and form amyloids *in vitro*.

1.2. Seed storage protein vicilin of garden pea *P. sativum* L. forms amyloids both *in vivo* and *in vitro*, and vicilin amyloids are resistant to the treatment with proteases of the gastrointestinal tract, survive seed canning, and are toxic to eukaryotic cells.

2. Amyloidogenesis mediates the virulence of bacteria, and virulence factors involved in both pathogenesis and symbiosis possess amyloid properties.

2.1. Outer membrane proteins RopA and RopB of the alphaproteobacterium *R. leguminosarum* involved in microbial-plant symbiosis form amyloids both *in vivo* and *in vitro*.

2.2. Mucin metallopeptidase YghJ that mediates the pathogenesis of enterotoxigenic strains of gammaproteobacterium *E. coli* possesses amyloidogenic properties.

3. Proteins with the β -barrel structure are amyloidogenic determinants in prokaryotic and eukaryotic proteomes.

4. Prion formation can not only inactivate, but also alter protein function.

4.1. Swi1 prionization and deletion of its structural gene lead to global changes in yeast genome expression. Moreover, both deletion and prionization result in a number of specific effects including both activation and inhibition of various cellular processes.

4.2. *SWI1* gene deletional inactivation and Swi1 prion formation have similar phenotypic manifestations caused by different molecular mechanisms.

5. The existence of prion determinants sustaining only when their structural proteins are overproduced has been demonstrated.

5.1. The classification of prions into true prions (possessing prion properties in native conditions with no alterations in the primary structure), conditional prions (possessing prion properties upon overproduction or any other alterations in conditions but without changes in the primary structure), and artificial (with altered primary structure) has been proposed.

5.2. The Gln3 transcriptional regulator of yeast *S. cerevisiae* possesses properties of a conditional prion.

MAIN PUBLICATIONS RELEVANT FOR THE DISSERTATION

1. Antonets K.S., Belousov M.V., Sulatskaya A.I., Belousova M.E., Kosolapova A.O., Sulatsky M.I., Andreeva E.A., Zykin P.A., Malovichko Y.V., Shtark O.Y., Lykholay A.N., Volkov K.V., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Kochetkova E.Y., Bobylev A.G., Usachev K.S., Demidov O.N., Tikhonovich I.A., Nizhnikov A.A. Accumulation of storage proteins in plant seeds is mediated by amyloid formation // PLOS Biology, 2020, V.18(7), e3000564. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000564>

2. Kosolapova A.O., Antonets K.S., Belousov M.V., Nizhnikov A.A. Biological functions of prokaryotic amyloids in the interspecies interactions: facts and assumptions // International Journal of Molecular Sciences, 2020, V.21(19), e7240. <https://doi.org/10.3390/ijms21197240>

3. Malovichko Y.V., Shtark O.Y., Vasileva E.N., Nizhnikov A.A., Antonets K.S. Transcriptomic insights into mechanisms of early seed maturation in garden pea (*Pisum sativum* L.) // Cells, 2020, V.9(3), e779. <https://doi.org/10.3390/cells9030779>

4. Kosolapova A.O., Belousov M.V., Sulatskaya A.I., Belousova M.E., Sulatsky M.I., Antonets K.S., Volkov K.V., Lykholay A.N., Shtark O.Y., Vasileva E.N., Zhukov V.A., Ivanova A.N., Zykin P.A., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Tikhonovich I.A., Nizhnikov A.A. Two Novel Amyloid Proteins, RopA and RopB, from the Root Nodule Bacterium *Rhizobium leguminosarum* // Biomolecules, 2019, V.9(11), e694. <https://doi.org/10.3390/biom9110694>

5. 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, V.10(3), e212. <https://doi.org/10.3390/genes10030212>

6. Antonets K.S., Belousov M.V., Belousova M.E., Nizhnikov A.A. The Gln3 transcriptional regulator of *Saccharomyces cerevisiae* manifests prion-like properties upon overproduction // *Biochemistry (Moscow)*, 2019, V.84(4), P.441-451. <https://doi.org/10.1134/S0006297919040126>

7. Antonets K.S., Kliver S.F., Nizhnikov A.A. Exploring proteins containing amyloidogenic regions in the proteomes of bacteria of the order *Rhizobiales* // *Evolutionary Bioinformatics*, 2018, V.14, 1176934318768781. <https://doi.org/10.1177/1176934318768781>

8. Belousov M.V., Bondarev S.A., Kosolapova A.O., Antonets K.S., Sulatskaya A.I., Sulatsky M.I., Zhouravleva G.A., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Nizhnikov A.A. M60-like metalloprotease domain of the *Escherichia coli* YghJ protein forms amyloid fibrils // *PLOS One*, 2018, V.13(1), e0191317. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191317>

9. Bondarev S.A., Antonets K.S., Kajava A.V., Nizhnikov A.A., Zhouravleva G.A. Protein co-aggregation related to amyloids: methods of investigation, diversity and classification // *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, V.19(8), e2292. <https://doi.org/10.3390/ijms19082292>

10. Antonets K.S., Nizhnikov A.A. Predicting amyloidogenic proteins in the proteomes of plants // International Journal of Molecular Sciences, 2017, V.18(10), e2155. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18102155>

11. Antonets K.S., Nizhnikov A.A. Amyloids and prions in plants: facts and perspectives // Prion, 2017, V.11(5), P.300-312. <https://doi.org/10.1080/19336896.2017.1377875>

12. Antonets K.S., Kliver S.F., Polev D.E., Shuvalova A.R., Andreeva E.A., Inge-Vechtomov S.G., Nizhnikov A.A. Distinct Mechanisms of Phenotypic Effects of Inactivation and Prionization of Swi1 Protein in *Saccharomyces cerevisiae* // Biochemistry (Moscow), 2017, V.82(10), P.1147-1157. <https://doi.org/10.1134/S0006297917100078>

13. 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, V.12(12), e1006504. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006504>

14. Nizhnikov A.A., Antonets K.S., Bondarev S.A., Inge-Vechtomov S.G., Derkatch I.L. Prions, Amyloids, and RNA: Pieces of a Puzzle // Prion, 2016, V.10(3), P.182-206. <https://doi.org/10.1080/19336896.2016.1181253>

15. Antonets K.S., Sargsyan H.M., Nizhnikov A.A. A glutamine/asparagine-rich fragment of Gln3, but not the full-length protein, aggregates in *Saccharomyces cerevisiae* // Biochemistry (Moscow), 2016, V.81(4), P.407-413. <https://doi.org/10.1134/S0006297916040118>

16. Antonets K.S., Volkov K.V., Maltseva A.L., Arshakian L.M., Galkin A.P., Nizhnikov A.A. Proteomic analysis of *Escherichia coli* protein fractions resistant to solubilization by ionic detergents // Biochemistry (Moscow), 2016, V.81(1), P.34-46. <https://doi.org/10.1134/S0006297916010041>

17. Nizhnikov A.A., Antonets K.S., Inge-Vechtomov S.G. Amyloids: from pathogenesis to function // Biochemistry (Moscow), 2015, V.80(9), P.1127-1144. <https://doi.org/10.1134/S0006297915090047>

18. 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, V.9(12), e116003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116003>

19. Nizhnikov A.A., Antonets K.S., Inge-Vechtomov S.G., Derkatch I.L. Modulation of efficiency of translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*: turning nonsense into sense // Prion, 2014, V.8(3), P.247-260. <https://doi.org/10.4161/pri.29851>

20. Antonets K.S., Nizhnikov A.A. SARP: a novel algorithm to assess compositional biases in protein sequences // Evolutionary Bioinformatics, 2013, V.9, P.263-273. <https://doi.org/10.4137/EBO.S12299>

DESIGNATIONS AND ABBREVIATIONS

<i>aa</i>	Aminoacid(s)
<i>Amyloid</i>	Protein fibrillar aggregate that possesses cross-beta structure and is formed <i>in vivo</i>
<i>Amyloidogenesis</i>	Processes determining formation of amyloid fibrils of certain proteins
<i>Amyloidogenic protein</i>	Protein capable of forming amyloid fibrils <i>in vitro</i>
<i>Amyloidome</i>	Entirety of amyloids (including infectious prion amyloids) in cell, organ, organism, or supra-organismal system
<i>Aβ</i>	Human β -Amyloid Peptide (1-40 aa)
<i>CFP</i>	Cyan Fluorescent Protein
<i>CR</i>	Congo Red dye
<i>FDR</i>	False Discovery Rate
<i>GuHCl</i>	Guanidine Hydrochloride
<i>h</i>	Hours
<i>HFIP</i>	Hexafluoroisopropanol
<i>HPLC</i>	High-Performance Liquid Chromatography
<i>IVPD</i>	<i>In vitro</i> Protein Digestibility Assay
<i>min</i>	Minutes

<i>Potentially amyloidogenic protein</i>	A protein comprising amyloidogenic regions predicted by any bioinformatic algorithm(s)
<i>Potentially amyloidogenic region, PAR</i>	Protein region potentially prone to the formation of amyloid fibrils based on bioinformatic prediction
<i>Prion</i>	Protein that has one or several conformations possesses infectious properties <i>in vivo</i> (most known prions are infectious amyloids)
<i>SD</i>	Standard deviation
<i>SDD-AGE</i>	Polydenaturing Detergent Agarose Gel Electrophoresis of Proteins
<i>SDS</i>	Ionic detergent Sodium Dodecyl Sulfate
<i>SDS-PAGE</i>	Laemmli Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
<i>ThT</i>	Thioflavin T dye
<i>qPCR</i>	Quantitative Polymerase Chain Reaction
<i>YFP</i>	Yellow Fluorescent Protein

One letter abbreviations of aminoacids were used.

REFERENCES

1. Ahmed A.B. et al. A structure-based approach to predict predisposition to amyloidosis // *Alzheimers Dement.* 2014. V. 11. № 6. P. 681–690.
2. Akkerdaas J. et al. Protease resistance of food proteins: A mixed picture for predicting allergenicity but a useful tool for assessing exposure // *Clin. Transl. Allergy.* 2018. V. 8. P. 30.
3. Alberti S. *et al.* A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins // *Cell.* 2009. V. 137. № 1. P. 146–158.
4. Alexa A., Rahnenfuhrer J. topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology. R package version 2.28.0 // 2016.
5. Angelovici R. *et al.* Seed desiccation: a bridge between maturation and germination // *Trends Plant Sci.* 2010. V. 15. № 4. P. 211–218.
6. Ano Bom A.P. *et al.* Mutant p53 aggregates into prion-like amyloid oligomers and fibrils: implications for cancer // *J Biol Chem.* 2012. V. 287. № 33. P. 28152–28162.
7. Antonets K.S., Nizhnikov A.A. SARP: A Novel Algorithm to Assess Compositional Biases in Protein Sequences // *Evol. Bioinform.* 2013. V. 9. P. 263–273.
8. Antonets K.S., Sargsyan H.M., Nizhnikov A.A. A glutamine/asparagine-rich fragment of Gln3, but not the full-length protein, aggregates in *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochemistry (Mosc.)*. 2016. V. 81. № 4. P. 407–413.

9. Antonets K.S. *et al.* Proteomic analysis of *Escherichia coli* protein fractions resistant to solubilization by ionic detergents // *Biochemistry (Mosc.)*. 2016. V. 81. № 1. P. 34–46.
10. Antonets K.S. *et al.* Distinct mechanisms of phenotypic effects of inactivation and prionization of Swi1 protein in *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochemistry (Mosc.)*. 2017. V. 82. № 10. P. 1147–1157.
11. Antonets K.S., Nizhnikov A.A. Predicting amyloidogenic proteins in the proteomes of plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2017a. V. 18. № 10. P. e2155.
12. Antonets K.S., Nizhnikov A.A. Amyloids and prions in plants: facts and perspectives // *Prion*. 2017b. V. 11. № 5. P. 300–312.
13. Antonets K.S., Kliver S.F., Nizhnikov A.A. Exploring Proteins Containing Amyloidogenic Regions in the Proteomes of Bacteria of the Order *Rhizobiales* // *Evol. Bioinform.* 2018. V. 14. P. 1176934318768781.
14. Antonets K.S. *et al.* The Gln3 transcriptional regulator of *Saccharomyces cerevisiae* manifests prion-like properties upon overproduction // *Biochemistry (Mosc.)*. 2019. V. 84. № 4. P. 441–451.
15. Antonets K.S. *et al.* Accumulation of storage proteins in plant seeds is mediated by amyloid formation // *PLOS Biol.* 2020. V. 18. № 7. P. e3000564.
16. Aoyagi A. *et al.* A β and tau prion-like activities decline with longevity in the Alzheimer's disease human brain // *Sci. Transl. Med.* 2019. V. 11. № 490. P. eaat8462.

17. Araki K. *et al.* Parkinson's disease is a type of amyloidosis featuring accumulation of amyloid fibrils of α -synuclein // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2019. V. 116. № 36. P. 17963–17969.

18. Audas T.E. *et al.* Adaptation to stressors by systemic protein amyloidogenesis // Dev. Cell. 2016. V. 39. № 2. P. 155–168.

19. Baker K.R., Rice L. The amyloidoses: clinical features, diagnosis and treatment // Methodist Debaquey Cardiovasc. J. 2012. V. 8. № 3. P. 3–7.

20. Bateman D.A., Wickner R.B. The [PSI⁺] Prion Exists as a Dynamic Cloud of Variants // PLOS Genet. 2013. V. 9. № 1. P. e1003257.

21. Baxa U. *et al.* Mechanism of inactivation on prion conversion of the *Saccharomyces cerevisiae* Ure2 protein // Proc Natl Acad Sci U S A. 2002. V. 99. № 8. P. 5253–5260.

22. Belousov M.V. *et al.* M60-like metalloprotease domain of the *Escherichia coli* YghJ protein forms amyloid fibrils // PLOS One. 2018. V. 13. № 1. P. e0191317.

23. Bennhold H. Specific staining of amyloid by Congo red // Muenchen. Med. Wochenschr. 1922. V. 69. P. 1537–1538.

24. Benson M.D. *et al.* Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee // Amyloid. 2018. V. 25. № 4. P. 215–219.

25. Berthelot K. *et al.* *Hevea brasiliensis* prohevein possesses a conserved C-terminal domain with amyloid-like properties *in vitro* // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics. 2016. V. 1864. № 4. P. 388–399.

26. Blancas-Mejía L.M., Ramirez-Alvarado M. Systemic amyloidoses // *Annu. Rev. Biochem.* 2013. V. 82. P. 745–774.
27. Blanco L.P. *et al.* Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids // *Trends Microbiol.* 2012. V. 20. № 2. P. 66–73.
28. Bolton D.C., McKinley M.P., Prusiner S.B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion // *Science.* 1982. V. 218. № 4579. P. 1309–1311.
29. Bondarev S.A. *et al.* Protein co-aggregation related to amyloids: Methods of investigation, diversity, and classification // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 8. P. e2292.
30. Borisov A.Y. *et al.* Sequential functioning of *Sym-13* and *Sym-31*, two genes affecting symbiosome development in root nodules of pea (*Pisum sativum* L.) // *Mol. Gen. Genet.* 1997. V. 254. № 5. P. 592–598.
31. Cao Y. *et al.* The role of plant innate immunity in the legume-*Rhizobium* symbiosis // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2017. V. 68. P. 535–561.
32. Cao Y., Mezzenga R. Food protein amyloid fibrils: Origin, structure, formation, characterization, applications and health implications // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2019. V. 269. P. 334–356.
33. Cardenas M.E. *et al.* The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients // *Genes Dev.* 1999. V. 13. № 24. P. 3271–3279.
34. Carneiro K.M.M. *et al.* Amyloid-like ribbons of amelogenins in enamel mineralization // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. e23105.

35. Carvalho F.M. *et al.* Genomic and evolutionary comparisons of diazotrophic and pathogenic bacteria of the order *Rhizobiales* // BMC Microbiol. 2010. V. 10. P. e37.

36. Chakrabortee S. *et al.* Luminidependens (LD) is an *Arabidopsis* protein with prion behavior. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2016. V. 113. № 21. P. 6065–6070.

37. Chakravarty A.K. *et al.* A Non-amyloid Prion Particle that Activates a Heritable Gene Expression Program // Mol. Cell. 2020. V. 77. № 2. P. 251–265.e9.

38. Chaturvedi D., Mahalakshmi R. Transmembrane β -barrels: Evolution, folding and energetics // Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 2017. V. 1859. № 12. P. 2467–2482.

39. Chernoff Y.O. *et al.* Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [*psi*⁺] // Science. 1995. V. 268. № 5212. P. 880–884.

40. Chernova T.A., Wilkinson K.D., Chernoff Y.O. Physiological and environmental control of yeast prions // FEMS Microbiol. Rev. 2014. V. 38. № 2. P. 326–344.

41. Chernova T.A. *et al.* Yeast short-lived actin-associated protein forms a metastable prion in response to thermal stress // Cell Rep. 2017. V. 18. № 3. P. 751–761.

42. Chimileski S., Franklin M.J., Papke R.T. Biofilms formed by the archaeon *Haloferax volcanii* exhibit cellular differentiation and social motility, and facilitate horizontal gene transfer // BMC Biol. 2014. V. 12. № 1. P. 65.

43. Chiti F., Dobson C.M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease // *Annu. Rev. Biochem.* 2006. V. 75. P. 333–366.

44. Chong Y.T. *et al.* Yeast proteome dynamics from single cell imaging and automated analysis // *Cell.* 2015. V. 161. № 6. P. 1413–1424.

45. Chrispeels M.J., Higgins T.J.V., Spencer D. Assembly of storage protein oligomers in the endoplasmic reticulum and processing of the polypeptides in the protein bodies of developing pea cotyledons // *J. Cell Biol.* 1982. V. 93. № 2. P. 306–313.

46. Cobb N.J., Surewicz W.K. Prion diseases and their biochemical mechanisms // *Biochemistry.* 2009. V. 48. № 12. P. 2574–2585.

47. Cohen A.S., Calkins E. Electron Microscopic Observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins // *Nature.* 1959. V. 183. № 4669. P. 1202–1203.

48. Colaco M., Park J., Blanch H. The kinetics of aggregation of poly-glutamic acid based polypeptides // *Biophys. Chem.* 2008. V. 136. № 2–3. P. 74–86.

49. Costerton J.W. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection // *Trends Microbiol.* 2001. V. 9. № 2. P. 50–52.

50. Coustou V. *et al.* The protein product of the *het-s* heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997. V. 94. № 18. P. 9773–9778.

51. Cox K. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* GATA sequences function as TATA elements during nitrogen catabolite repression and when Gln3p is excluded from the nucleus by overproduction of Ure2p // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 23. P. 17611–17618.

52. Crick F. Central dogma of molecular biology // *Nature.* 1970. V. 227. № 5258. P. 561-563.

53. Crist C.G. *et al.* [*PHI*⁺], a novel Sup35-prion variant propagated with non-Gln/Asn oligopeptide repeats in the absence of the chaperone protein Hsp104 // *Genes to Cells.* 2003. V. 8. № 7. P. 603–618.

54. Danoff E.J., Fleming K.G. Aqueous, Unfolded OmpA forms amyloid-like fibrils upon self-association // *PLOS One.* 2015. V. 10. № 7. P. e0132301.

55. Dechassa M.L. *et al.* Architecture of the SWI/SNF-nucleosome complex. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. № 19. P. 6010–6021.

56. Derkatch I.L. *et al.* Prions affect the appearance of other prions: The story of [*PIN*⁺] // *Cell.* 2001. V. 106. № 2. P. 171–182.

57. Derkatch I.L., Liebman S.W. Prion-prion interactions // *Prion.* 2007a. V. 1. № 3. P. 161–169.

58. Derkatch I.L., Liebman S.W. Prion-prion interactions // *Prion.* 2007b. V. 1. № 3. P. 161–169.

59. DiFiglia M. *et al.* Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain // *Science.* 1997. V. 277. № 5334. P. 1990–1993.

60. Divry P., Florkin M. Sur les proprietes optiques de l'amyloid // *Soc. Biol.* 1927. № 97. P. 1808–1810.

61. Dobson C.M. Protein folding and misfolding // Nature. 2003. V. 426. № 6968. P. 884–890.

62. Dobson C.M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation // Semin. Cell Dev. Biol. 2004. V. 15. № 1. P. 3–16.

63. Du Z. *et al.* Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae* // Nat Genet. 2008. V. 40. № 4. P. 460–465.

64. Dueholm M.S. *et al.* The tubular sheaths encasing *Methanosaeta thermophila* filaments are functional amyloids // J Biol Chem. 2015. V. 290. № 33. P. 20590–20600.

65. Dunwell J.M., Purvis A., Khuri S. Cupins: The most functionally diverse protein superfamily? // Phytochemistry. 2004. V. 65. № 1. P. 7–17.

66. Dutta A. *et al.* Swi/Snf dynamics on stress-responsive genes is governed by competitive bromodomain interactions // Genes Dev. 2014. V. 28. № 20. P. 2314–2330.

67. Eanes E.D., Glenner G.G. X-ray diffraction studies on amyloid filaments // J Histochem Cytochem. 1968. V. 16. № 11. P. 673–677.

68. Ferreira P.C. *et al.* The elimination of the yeast $[PSI^+]$ prion by guanidine hydrochloride is the result of Hsp104 inactivation // Mol Microbiol. 2001. V. 40. № 6. P. 1357–1369.

69. Fioriti L. *et al.* The Persistence of Hippocampal-Based Memory Requires Protein Synthesis Mediated by the Prion-like Protein CPEB3 // Neuron. 2015. V. 86. № 6. P. 1433–1448.

70. Fitzpatrick A.W.P. *et al.* Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2013. V. 110. № 14. P. 5468–5473.

71. Fowler D.M. *et al.* Functional amyloid formation within mammalian tissue // PLOS Biol. 2006. V. 4. № 1. P. e6.

72. Friedreich N., Kekule F.A. Zur Amyloidfrage // Virchows Arch. Path. Anat. Physiol. 1859. V. 16. P. 50–65.

73. Frolova L. *et al.* A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor // Nature. 1994. V. 372. № 6507. P. 701–703.

74. Garnczarska M., Zalewski T., Wojtyła Ł. A comparative study of water distribution and dehydrin protein localization in maturing pea seeds // J. Plant Physiol. 2008.

75. Garvey M. *et al.* A radish seed antifungal peptide with a high amyloid fibril-forming propensity // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics. 2013. V. 1834. № 8. P. 1615–1623.

76. Gerven N. Van *et al.* The Role of Functional Amyloids in Bacterial Virulence // J. Mol. Biol. 2018. V. 430. № 20. P. 3657–3684.

77. Ginestet C. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis // J. R. Stat. Soc. Ser. A (Statistics Soc.) 2011. V. 174. № 1. P. 245–246.

78. Gomes V.M. *et al.* Vicilin Storage Proteins from *Vigna unguiculata* (Legume) Seeds Inhibit Fungal Growth // J. Agric. Food Chem. 1997. V. 45. № 10. P. 4110–4115.

79. Gour S. *et al.* Antimicrobial peptide (Cn-AMP2) from liquid endosperm of *Cocos nucifera* forms amyloid-like fibrillar structure // J. Pept. Sci. 2016. V. 22. № 4. P. 201–207.

80. Hafeez F.Y. *et al.* Symbiotic effectiveness and bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from agriculture soils in Faisalabad // Environ. Exp. Bot. 2005. V. 54. № 2. P. 142–147.

81. Harrison P.M., Gerstein M. A method to assess compositional bias in biological sequences and its application to prion-like glutamine/asparagine-rich domains in eukaryotic proteomes // Genome Biol. 2003. V. 4. № 6. P. R40.

82. Harvey Z.H. *et al.* A Prion epigenetic switch establishes an active chromatin state // Cell. 2020. V. 180. № 5. P. 928–940.e14.

83. Hejair H.M.A. *et al.* Functional role of ompF and ompC porins in pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli* // Microb. Pathog. 2017. V. 107. P. 29–37.

84. Hobbs J.R., Morgan A.D. Fluorescence microscopy with thioflavine-t in the diagnosis of amyloid // J. Pathol. Bacteriol. 1963. V. 86. P. 437–442.

85. Hoiczyk E. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins // EMBO J. 2000. V. 19. № 22. P. 5989–5999.

86. Holmes D.L. *et al.* Heritable remodeling of yeast multicellularity by an environmentally responsive prion // Cell. 2013. V. 153. № 1. P. 153–165.

87. Howie A.J. *et al.* Physical basis of colors seen in Congo red-stained amyloid in polarized light // *Lab. Investig.* 2008. V. 88. № 3. P. 232–242.

88. Iconomidou V.A., Vriend G., Hamodrakas S.J. Amyloids protect the silkworm oocyte and embryo // *FEBS Lett.* 2000. V. 479. № 3. P. 141–145.

89. Imam J., Singh P.K., Shukla P. Plant microbe interactions in post genomic era: Perspectives and applications // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 1488.

90. Inge-Vechtomov S.G. [The template principle: paradigm of modern genetics]. // *Genetika.* 2013. V. 49. № 1. P. 9–15.

91. Inge-Vechtomov S.G. From chromosome theory to the template principle // *Russ. J. Genet.* 2015. V. 51. № 4. P. 397–408.

92. Itakura A.K. *et al.* Widespread Prion-based control of growth and differentiation strategies in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell.* 2020. V. 77. № 2. P. 266–278.e6.

93. Jansens K.J.A. *et al.* Rational design of amyloid-like fibrillary structures for tailoring food protein techno-functionality and their potential health implications // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2019. V. 18. № 1. P. 84–105.

94. Jones K.M. *et al.* How rhizobial symbionts invade plants: The *Sinorhizobium - Medicago* model // *Nat. Rev. Microbiol.* 2007. V. 5. № 8. P. 619–633.

95. Joseph Sahaya Rajan J. *et al.* Outer membrane protein C (OmpC) of *Escherichia coli* induces neurodegeneration in mice by acting as an amyloid // *Biotechnol. Lett.* 2016. V. 38. № 4. P. 689–700.

96. Kalebina T.S. *et al.* Amyloid-like properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucantransferase Bgl2p: prediction and experimental evidences. // *Prion.* 2008. V. 2. № 2. P. 91–96.

97. Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2004. V. 2. P. 123-140.

98. Katsnelson A. Did disordered proteins help launch life on earth? // *ACS Cent. Sci.* 2020. V. 6. № 11. P. 1854–1857.

99. Kayed R. *et al.* Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers // *Mol. Neurodegener.* 2007. V. 2. P. 18.

100. Kitaeva A.B. *et al.* Comparative analysis of the tubulin cytoskeleton organization in nodules of *Medicago truncatula* and *Pisum sativum*: Bacterial release and bacteroid positioning correlate with characteristic microtubule rearrangements // *New Phytol.* 2016. V. 210. № 1. P. 168–183.

101. Kondrashkina A.M. *et al.* Prion-like determinant [NSI⁺] decreases the expression of the *SUP45* gene in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol Biol.* 2014. V. 48. № 5. P. 790–796.

102. Kosolapova A.O. *et al.* Two novel amyloid proteins, RopA and RopB, from the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* // *Biomolecules.* 2019. V. 9. № 11. P. e694

103. Kosolapova A.O. *et al.* Biological functions of prokaryotic amyloids in interspecies interactions: Facts and assumptions // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 19. P. e7240.

104. Kotloff K.L. *et al.* Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A prospective, case-control study // *Lancet.* 2013. V. 382. № 9888. P. 209–222.

105. Kraus A., Groveman B.R., Caughey B. Prions and the potential transmissibility of protein misfolding diseases // *Annu. Rev. Microbiol.* 2013. V. 67. P. 543–564.

106. Kulkarni A.A. *et al.* Gln3p Nuclear Localization and Interaction with Ure2p in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 34. P. 32136–32144.

107. Kundu D. *et al.* Advances in protein misfolding, amyloidosis and its correlation with human diseases // *3 Biotech.* 2020. V. 10. № 5. P. 193.

108. Kushnirov V. V., Ter-Avanesyan M.D. Structure and replication of yeast prions // *Cell.* 1998. V. 94. № 1. P. 13–16.

109. Kyle R.A. Amyloidosis: a convoluted story // *Br J Haematol.* 2001. V. 114. № 3. P. 529–538.

110. Lasagna-Reeves C.A. *et al.* Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau // *Sci. Rep.* 2012. V. 2. P. 700.

111. Lasagna-Reeves C.A. *et al.* Dual role of p53 amyloid formation in cancer; loss of function and gain of toxicity // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. V. 430. № 3. P. 963–968.

112. Lashuel H.A. *et al.* Protofilaments, filaments, ribbons, and fibrils from peptidomimetic self-assembly: Implications for amyloid fibril formation and materials science // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. V. 122. № 22. P. 5262–5277.

113. Linhartová I. *et al.* RTX proteins: A highly diverse family secreted by a common mechanism // *FEMS Microbiol. Rev.* 2010. V. 34. № 6. P. 1076–1112.

114. Liu Y.F. *et al.* Loss of outer membrane protein C in *Escherichia coli* contributes to both antibiotic resistance and escaping antibody-dependent bactericidal activity // *Infect. Immun.* 2012. V. 80. № 5. P. 1815–1822.

115. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. // *Methods.* 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.

116. Luk K.C. *et al.* Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice // *Science.* 2012. V. 338. № 6109. P. 949–953.

117. Luo Q. *et al.* Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes a highly conserved mucin-degrading metalloprotease to effectively engage intestinal epithelial cells // *Infect. Immun.* 2014. V. 82. № 2. P. 509–521.

118. Luo Q. *et al.* Conservation and Immunogenicity of Novel Antigens in Diverse Isolates of Enterotoxigenic *Escherichia coli* // *PLOS Negl. Trop. Dis.* 2015. V. 9. № 1. P. e0003446.

119. Maagd R.A. de *et al.* Down-regulation of expression of the *Rhizobium leguminosarum* outer membrane protein gene *ropA* occurs abruptly in interzone II-III of pea nodules and can be uncoupled from *nif* gene activation // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1994. V. 7. № 2. P. 276–281.

120. Maekawa T., Kufer T.A., Schulze-Lefert P. NLR functions in plant and animal immune systems: So far and yet so close // *Nat. Immunol.* 2011. V. 12. № 9. P. 817–826.

121. Maji S.K. *et al.* Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules // *Science.* 2009. V. 325. № 5938. P. 328–332.

122. Majumdar A. *et al.* Critical role of amyloid-like oligomers of *Drosophila* Orb2 in the persistence of memory // *Cell.* 2012. V. 148. № 3. P. 515–529.

123. Makin O.S. *et al.* Molecular basis for amyloid fibril formation and stability // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. V. 102. № 2. P. 315–320.

124. Malovichko Y.V. *et al.* RNA sequencing reveals specific transcriptomic signatures distinguishing effects of the [SWI⁺] prion and *SWI1* deletion in yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes.* 2019. V. 10. № 3. P. 212.

125. Malovichko Y.V. *et al.* Transcriptomic Insights into Mechanisms of Early Seed Maturation in the Garden Pea (*Pisum sativum* L.) // *Cells.* 2020. V. 9. № 3. P. 779.

126. Masison D.C., Reidy M. Yeast prions are useful for studying protein chaperones and protein quality control // *Prion*. 2015. V. 9. № 3. P. 174–183.

127. Maurer-Stroh S. *et al.* Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices // *Nat Methods*. 2010. V. 7. № 3. P. 237–242.

128. Maury C.P.J. Self-Propagating β -sheet polypeptide structures as prebiotic informational molecular entities: The amyloid world // *Orig. Life Evol. Biosph.* 2009. V. 39. № 2. P. 141–150.

129. Maury C.P.J. Amyloid and the origin of life: self-replicating catalytic amyloids as prebiotic informational and protometabolic entities // *Cell. Mol. Life Sci.* 2018. V. 75. № 9. P. 1499–1507.

130. McGlinchey R.P., Kryndushkin D., Wickner R.B. Suicidal [*PSI*⁺] is a lethal yeast prion // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. V. 108. № 13. P. 5337–5341.

131. McKinley M.P., Bolton D.C., Prusiner S.B. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion // *Cell*. 1983. V. 35. № 1. P. 57–62.

132. Meeto D., McGovern P., Safadi R. An epidemiological overview of diabetes across the world // *Br. J. Nurs.* 2007. V. 16. № 16. P. 1002–1007.

133. Melckebeke H.Van *et al.* Atomic-resolution three-dimensional structure of HET-s(218-289) amyloid fibrils by solid-state NMR spectroscopy // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. № 39. P. 13765–13775.

134. Michelitsch M.D., Weissman J.S. A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000. V. 97. № 22. P. 11910–11915.

135. Mostaert A.S. *et al.* Nanoscale mechanical characterisation of amyloid fibrils discovered in a natural adhesive // *J. Biol. Phys.* 2006. V. 32. № 5. P. 393–401.

136. Mostaert A.S. *et al.* Characterisation of amyloid nanostructures in the natural adhesive of unicellular subaerial algae // *J. Adhes.* 2009. V. 85. № 8. P. 465–483.

137. Naiki H. *et al.* Fluorometric determination of amyloid fibrils *in vitro* using the fluorescent dye, thioflavine T // *Anal. Biochem.* 1989. V. 177. № 2. P. 244–249.

138. Nakayashiki T. *et al.* Yeast prions [*URE3*] and [*PSI*⁺] are diseases // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. V. 102. № 30. P. 10575–10580.

139. Nakjang S. *et al.* A novel extracellular metallopeptidase domain shared by animal Host-Associated mutualistic and pathogenic microbes // *PLOS One*. 2012. V. 7. № 1. P. e30287.

140. Nan H. *et al.* A viral expression factor behaves as a prion // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 359.

141. Nelson R. *et al.* Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils // *Nature*. 2005. V. 435. № 7043. P. 773–778.

142. Niewold T.A. *et al.* Characterization of proteoglycans and glycosaminoglycans in bovine renal AA-type amyloidosis // *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 1991. V. 60. № 5. P. 321–328.

143. Nizhnikov A.A. *et al.* [*NSI*⁺] determinant has a pleiotropic phenotypic manifestation that is modulated by *SUP35*, *SUP45*, and *VTS1* genes. // *Curr. Genet.* 2012. V. 58. № 1. P. 35–47.

144. Nizhnikov A.A., Kondrashkina A.M., Galkin A.P. Interactions of [*NSI*⁺] Prion-Like Determinant with *SUP35* and *VTS1* Genes in *Saccharomyces cerevisiae* // *Russ. J. Genet.* 2013. V. 49. P. 1004–1012.

145. Nizhnikov A.A. *et al.* Modulation of efficiency of translation termination in *Saccharomyces cerevisiae* // *Prion.* 2014a. V. 8. № 3. P. 247–260.

146. Nizhnikov A.A. *et al.* Proteomic screening for amyloid proteins // *PLOS One.* 2014b. V. 9. № 12. P. e116003.

147. Nizhnikov A.A. *et al.* Overexpression of genes encoding asparagine-glutamine-rich transcriptional factors causes nonsense suppression in *Saccharomyces cerevisiae* // *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2014c. V. 4. № 2. P. 122-130.

148. Nizhnikov A.A., Antonets K.S., Inge-Vechtomov S.G. Amyloids: from pathogenesis to function // *Biochemistry (Mosc.)*. 2015. V. 80. № 9. P. 1127–1144.

149. Nizhnikov A.A. *et al.* Prions, Amyloids, and RNA: Pieces of a Puzzle // *Prion.* 2016a. V. 10. № 3. P. 182–206.

150. Nizhnikov A.A. *et al.* Interaction of prions causes heritable traits in *Saccharomyces cerevisiae* // *PLOS Genet.* 2016b. V. 12. № 12. P. e1006504.

151. Oh J. *et al.* Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. № 18. P. 13601–13609.

152. Osherovich L.Z. *et al.* Dissection and design of yeast prions. // PLOS Biol. 2004. V. 2. № 4. P. e86.

153. Otzen D., Riek R. Functional amyloids // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2019. V. 11. № 12. P. a033860.

154. Patel B.K., Gavin-Smyth J., Liebman S.W. The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion // Nat Cell Biol. 2009. V. 11. № 3. P. 344–349.

155. Perutz M.F. *et al.* Glutamine repeats as polar zippers: Their possible role in inherited neurodegenerative diseases // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1994. V. 91. № 12. P. 5355–5358.

156. Perutz M.F. *et al.* Aggregation of proteins with expanded glutamine and alanine repeats of the glutamine-rich and asparagine-rich domains of Sup35 and of the amyloid β -peptide of amyloid plaques // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002. V. 99. № 8. P. 5596–5600.

157. Peterson C.L., Herskowitz I. Characterization of the yeast *SWI1*, *SWI2*, and *SWI3* genes, which encode a global activator of transcription // Cell. 1992. V. 68. № 3. P. 573–583.

158. Picken M.M. The pathology of amyloidosis in classification: a review // Acta Haematol. 2020. V. 143. № 4. P. 322–334.

159. Picotti P. *et al.* Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics // Cell. 2009. V. 138. № 4. P. 795-806.

160. Pimentel H. *et al.* Differential analysis of RNA-seq incorporating quantification uncertainty // *Nat. Methods*. 2017. V. 14. № 7. P. 687–690.

161. Pras M. *et al.* The characterization of soluble amyloid prepared in water // *J. Clin. Invest.* 1968. V. 47. № 4. P. 924–933.

162. Qiang W. *et al.* Antiparallel β -sheet architecture in Iowa-mutant β -amyloid fibrils // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. V. 109. № 12. P. 4443–4448.

163. Ramsok C.B. *et al.* Yeast cell adhesion molecules have functional amyloid-forming sequences // *Eukaryot. Cell*. 2010. V. 9. № 3. P. 393–404.

164. Roest H.P. *et al.* Isolation of *ropB*, a gene encoding a 22-kDa *Rhizobium leguminosarum* outer membrane protein // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1995. V. 8. № 4. P. 576–583.

165. Rogoza T. *et al.* Non-Mendelian determinant [*ISP*⁺] in yeast is a nuclear-residing prion form of the global transcriptional regulator Sfp1 // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. V. 107. № 23. P. 10573–10577.

166. Rollauer S.E. *et al.* Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2015. V. 370. № 1679. P. 20150023.

167. Romanova N.V, Chernoff Y.O. Hsp104 and prion propagation. // *Protein Pept. Lett.* 2009. V. 16. № 6. P. 598–605.

168. Romero D., Kolter R. Functional amyloids in bacteria // *Int Microbiol.* 2014. V. 17. № 2. P. 65–73.

169. Rose T.L. *et al.* Effect of sugars on the association between cowpea vicilin (7S storage proteins) and fungal cells // *Biocell*. 2003. V. 27. № 2. P. 173–179.

170. Rout S.K. *et al.* A prebiotic template-directed peptide synthesis based on amyloids // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 234.

171. Rubio L.A. *et al.* Characterization of pea (*Pisum sativum*) seed protein fractions // *J. Sci. Food Agric.* 2014. V. 94. № 2. P. 280–287.

172. Ryzhova T.A. *et al.* Screening for amyloid proteins in the yeast proteome // *Curr. Genet.* 2017. V. 64. № 2. P. 469–478.

173. Saifitdinova A.F. *et al.* [*NSI*⁺]: a novel non-Mendelian nonsense suppressor determinant in *Saccharomyces cerevisiae* // *Curr. Genet.* 2010. V. 56. № 5. P. 467–478.

174. Sales M.P. *et al.* Do legume storage proteins play a role in defending seeds against Bruchids? // *Plant Physiol.* 2000. V. 124. № 2. P. 515–522.

175. Sanchez-Monge R. *et al.* Vicilin and convicilin are potential major allergens from pea // *Clin. Exp. Allergy.* 2004. V. 34. № 11. P. 1747–1753.

176. Santos J. *et al.* Computational prediction of protein aggregation: Advances in proteomics, conformation-specific algorithms and biotechnological applications // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 1403–1413.

177. Santos J., Ventura S. Functional Amyloids Germinate in Plants // *Trends Plant Sci.* 2021. V. 26. № 1. P. 7–10.

178. Saupe S.J. Amyloid Signaling in Filamentous Fungi and Bacteria // *Annu. Rev. Microbiol.* 2020. V. 74. № 1. P. 673–691.

179. Scherpelz K.P. *et al.* Preparation of amyloid fibrils seeded from brain and meninges // *Methods Mol. Biol.* 2016. V. 1345. P. 299–312.

180. Schwartz K., Boles B.R. Microbial amyloids--functions and interactions within the host // *Curr Opin Microbiol.* 2013a. V. 16. № 1. P. 93–99.

181. Schwartz K., Boles B.R. Microbial amyloids - functions and interactions within the host // *Curr. Opin. Microbiol.* 2013b. V. 16. № 1. P. 93–99.

182. Selkoe D.J., Ihara Y., Salazar F.J. Alzheimer's disease: Insolubility of partially purified paired helical filaments in sodium dodecyl sulfate and urea // *Science.* 1982. V. 215. № 4537. P. 1243–1245.

183. Selkoe D.J. *et al.* Isolation of low-molecular-weight proteins from amyloid plaque fibers in Alzheimer's disease // *J. Neurochem.* 1986. V. 46. № 6. P. 1820–1834.

184. Shanmugam N. *et al.* Microbial functional amyloids serve diverse purposes for structure, adhesion and defence // *Biophys. Rev.* 2019. V. 11. № 3. P. 287–302.

185. Shaw L.P. *et al.* The phylogenetic range of bacterial and viral pathogens of vertebrates // *Mol. Ecol.* 2020. V. 29. № 17. P. 3361–3379.

186. Shen-Miller J. *et al.* Exceptional seed longevity and robust growth: Ancient Sacred Lotus from China // *Am. J. Bot.* 1995. V. 82. № 11. P. 1367–1380.

187. Shen-Miller J. *et al.* Centuries-old viable fruit of sacred lotus *Nelumbo nucifera* Gaertn var. China Antique // Trop. Plant Biol. 2013. V. 6. № 2-3. P. 10.1007/s12042-013-9124-2.

188. Shivaswamy S., Iyer V.R. Stress-dependent dynamics of global chromatin remodeling in yeast: dual role for SWI/SNF in the heat shock stress response. // Mol. Cell. Biol. 2008. V. 28. № 7. P. 2221–2234.

189. Si K. *et al.* A neuronal isoform of CPEB regulates local protein synthesis and stabilizes synapse-specific long-term facilitation in *Aplysia* // Cell. 2003. V. 115. № 7. P. 893–904.

190. Sipe J.D., Cohen A.S. Review: history of the amyloid fibril // J Struct Biol. 2000a. V. 130. № 2–3. P. 88–98.

191. Sipe J.D., Cohen A.S. Review: history of the amyloid fibril // J. Struct. Biol. 2000b. V. 130. № 2–3. P. 88–98.

192. Sipe J.D. *et al.* Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis // Amyloid. 2014. V. 21. № 4. P. 221–224.

193. Sivanathan V., Hochschild A. A bacterial export system for generating extracellular amyloid aggregates // Nat. Protoc. 2013. V. 8. № 7. P. 1381–1390.

194. Smaoui M.R. *et al.* Computational assembly of polymorphic amyloid fibrils reveals stable aggregates // Biophys. J. 2013. V. 104. № 3. P. 683–693.

195. Soto M.J., Sanjuán J., Olivares J. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: Common infection weapons // Microbiology. 2006. V. 152. № 11. P. 3167–3174.

196. Soufi B. *et al.* Global analysis of the yeast osmotic stress response by quantitative proteomics // *Mol. Biosyst.* 2009. V. 5. № 11. P. 1337–1346.

197. Sudarsanam P. *et al.* Whole-genome expression analysis of *snf/swi* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000. V. 97. № 7. P. 3364–3369.

198. Sunde M. *et al.* Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 273. № 3. P. 729–739.

199. Suzuki G., Shimazu N., Tanaka M. A yeast prion, Mod5, promotes acquired drug resistance and cell survival under environmental stress // *Science.* 2012. V. 336. № 6079. P. 355–359.

200. Taglialegna A., Lasa I., Valle J. Amyloid structures as biofilm matrix scaffolds // *J. Bacteriol.* 2016. V. 198. № 19. P. 2579–2588.

201. Tahir Y. El, Skurnik M. YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin // *Int. J. Med. Microbiol.* 2001. V. 291. № 3. P. 209–218.

202. Tanaka M. *et al.* Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences // *Nature.* 2004. V. 428. № March. P. 323–328.

203. Tanaka M. A protein transformation protocol for introducing yeast prion particles into yeast // *Methods Enzymol.* 2010. V. 470. P. 681–693.

204. Thoma J. *et al.* Protein-enriched outer membrane vesicles as a native platform for outer membrane protein studies // *Commun. Biol.* 2018. V. 1. P. 23.

205. Tolin S. *et al.* Quantitative analysis of the naringenin-inducible proteome in *Rhizobium leguminosarum* by isobaric tagging and mass spectrometry // *Proteomics*. 2013. V. 13. № 12–13. P. 1961–1972.

206. Tsolis A.C. *et al.* A consensus method for the prediction of "aggregation-prone" peptides in globular proteins // *PLOS One*. 2013. V. 8. № 1. P. e54175.

207. Tsyganov V.E. *et al.* Developmental downregulation of rhizobial genes as a function of symbiosome differentiation in symbiotic root nodules of *Pisum sativum* // *New Phytol.* 2003. V. 159. № 2. P. 521–530.

208. Tycko R. *et al.* Evidence for novel β -sheet structures in Iowa mutant β -amyloid fibrils // *Biochemistry*. 2009. V. 48. № 26. P. 6072–6084.

209. Tycko R., Wickner R.B. Molecular structures of amyloid and prion fibrils: Consensus versus controversy // *Acc. Chem. Res.* 2013. V. 46. № 7. P. 1487–1496.

210. Vanik D.L., Surewicz K.A., Surewicz W.K. Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions // *Mol. Cell*. 2004. V. 14. № 1. P. 139–145.

211. Vassar P.S., Culling C.F. Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues // *Arch Pathol.* 1959. V. 68. P. 487–498.

212. Venema J., Tollervey D. Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* // *Annu. Rev. Genet.* 1999. V. 33. P. 261–311.

213. Virchow R. Ueber eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefunde Substanz mit der chemischen Reaction der Cellulose // Virchows Arch. Path. Anat. Physiol. 1854. V. 6. P. 135–138.

214. Vocht M.L. de *et al.* Structural and functional role of the disulfide bridges in the hydrophobin SC3 // J Biol Chem. 2000. V. 275. № 37. P. 28428–28432.

215. Westermark P. *et al.* A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986. V. 140. № 3. P. 827–831.

216. Wickner R.B. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae* // Science. 1994. V. 264. № 5158. P. 566–569.

217. Wickner R.B., Masison D.C., Edskes H.K. [PSI] and [URE3] as yeast prions // Yeast. 1995. V. 11. № 16. P. 1671–1685.

218. Wickner R.B. *et al.* Prions of fungi: Inherited structures and biological roles // Nat. Rev. Microbiol. 2007. V. 5. № 8. P. 611–618.

219. Wickner R.B. *et al.* Amyloid diseases of yeast: prions are proteins acting as genes // Essays Biochem. 2014. V. 56. P. 193–205.

220. Wickner R.B. *et al.* Yeast prions: structure, biology, and prion-handling systems // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2015. V. 79. № 1. P. 1–17.

221. Wickner R.B., Son M., Edskes H.K. Prion variants of yeast are numerous, mutable, and segregate on growth, affecting prion pathogenesis, transmission barriers, and sensitivity to anti-prion systems // Viruses. 2019. V. 11. № 3. P. 238.

222. Wiggins R.C. Prion Stability and infectivity in the environment // *Neurochem. Res.* 2009. V. 34. № 1. P. 158–168.

223. Xu J. *et al.* Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors // *Nat. Chem. Biol.* 2011. V. 7. № 5. P. 285–295.

224. Yang J., Zhang Y. I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. № W1. P. 174–181.

225. Yu G. *et al.* ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters // *Omi. A J. Integr. Biol.* 2012. V. 16. № 5. P. 284–287.

226. Zaat S.A.J. *et al.* Induction of the *nodA* promoter of *Rhizobium leguminosarum* sym plasmid pRL1J1 by plant flavanones and flavones // *J. Bacteriol.* 1987. V. 169. № 1. P. 198–204.

227. Zanten M.van *et al.* Control and consequences of chromatin compaction during seed maturation in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Signal. Behav.* 2012. V. 7. № 3. P. 338–341.

228. Zaragoza D. *et al.* Rapamycin Induces the G0 Program of Transcriptional Repression in Yeast by Interfering with the TOR Signaling Pathway // *Mol. Cell. Biol.* 1998. V. 18. № 8. P. 4463–4470.

229. Zha Z. *et al.* LptD is a promising vaccine antigen and potential immunotherapeutic target for protection against *Vibrio* species infection // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 38577.

230. Zhouravleva G. *et al.* Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3 // *EMBO J.* 1995. V. 14. № 16. P. 4065–4072.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to thank his colleagues from the Laboratory of Proteomics of Supra-Organismal Systems at ARRIAM without whom this dissertation would not have been written. I would like to especially thank Dr. K. S. Antonets, Dr. M. V. Belousov, Dr. M. E. Belousova, A.O. Kosolapova and Yu. V. Malovichko. The author is deeply grateful to the Academician of RAS S.G. Inge-Vechtomov for his long-term participation in the preparation of this dissertation as a scientific consultant and his overall support; Academician of RAS I.A. Tikhonovich for a detailed reading of the dissertation, valuable advice and constructive criticism. The author is also grateful to S.G. Inge-Vechtomov and I.A. Tikhonovich for the invaluable experience obtained while working with them. I am glad to express my gratitude to my colleagues whose long-term collaboration made a significant contribution in conducting research and publication of many papers in leading periodicals this dissertation is based on: Dr. A. I. Sulatskaya, M. I. Sulatskiy, Dr. E. A. Andreeva, Dr. P. A. Zykin, Dr. K. V. Volkov, Dr. A. N. Lykholay, Dr. O. Y. Shtark, Dr. O. N. Demidov, Dr. A. P. Galkin, Dr. G. A. Zhouravleva, Dr. S. A. Bondarev. Finally, the author expresses his deepest gratitude to his relatives and friends who created a pleasant and productive atmosphere for him to write this work.