

Санкт-Петербургский государственный университет

*На правах рукописи*

Барбитов Юрий Александрович

**Механизмы дифференциальных эффектов шаперона Sis1 на прионы  
дрожжей *Saccharomyces cerevisiae***

Научная специальность 1.5.7. Генетика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, профессор  
Журавлева Галина Анатольевна

Санкт-Петербург

2022

## Оглавление

Список сокращений.....	4
Введение .....	5
Глава 1. Дифференциальное взаимодействие молекулярных шаперонов и прионов дрожжей (обзор литературы) .....	9
1.1 Молекулярные шапероны и контроль качества белка .....	9
1.1.1 История открытия шаперонов .....	9
1.1.2 Семейства молекулярных шаперонов .....	11
1.2 Прионы дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	21
1.2.1 Прионы и амилоиды .....	21
1.2.2 Разнообразие и свойства прионов дрожжей .....	23
1.3 Система контроля качества белков и прионы дрожжей .....	27
1.3.1 Hsp104 — ключевой регулятор поддержания прионов .....	28
1.3.2 Роль различных Hsp70 в жизненном цикле прионов дрожжей .....	30
1.3.3 Дифференциальные эффекты Hsp40 на прионы .....	32
1.4 Заключение .....	37
Глава 2. Материалы и методы .....	39
2.1 Штаммы бактерий и дрожжей .....	39
2.2 Плазмиды .....	42
2.3 Среды и условия культивирования .....	44
2.4 Генетические методы .....	45
2.4.1 Трансформация клеток дрожжей и бактерий .....	45
2.4.2 Оценка частоты потери приона [ <i>URE3</i> ] .....	45
2.5 Флуоресцентная микроскопия .....	46
2.6 Молекулярно-биологические методы .....	46
2.6.1 Полимеразная цепная реакция .....	46
2.6.2 Рестрикция .....	46
2.6.3 Лигирование ДНК-фрагментов .....	47
2.6.4 Выделение плазмидной ДНК из бактерий .....	47
2.6.5 Электрофорез ДНК .....	47
2.6.6 Выделение и электрофорез белков из клеток дрожжей и бактерий .....	47
2.6.7 Полуденатурирующий электрофорез в агарозном геле (SDD-AGE) .....	49
2.7 Получение препаратов дрожжевых шаперонов и амилоидных фибрилл <i>in vitro</i> .....	49
2.7.1 Оптимизация условий для наработки белков в клетках бактерий .....	49
2.7.2 Препаративная очистка белков .....	50
2.7.3 Получение амилоидных фибрилл .....	52
2.7.4 Оценка активности молекулярных шаперонов <i>in vitro</i> .....	52
2.8 Электронная микроскопия .....	53
2.9 Анализ связывания шаперонов с фибриллами .....	53
2.10 Статистическая обработка данных .....	55

Глава 3. Результаты .....	56
3.1 Характеристика дифференциальных эффектов Sis1 на прионы дрожжей .....	56
3.1.1 Изменение внутриклеточной локализации Sis1 разнонаправленно влияет на прионы дрожжей .....	56
3.1.2 Изменение локализации Sis1 не влияет на размер и морфологию агрегатов .....	59
3.1.3 Делеция димеризационного домена Sis1 ослабляет проявление [ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ] .....	60
3.2 Анализ связывания Hsp40 с амилоидными фибриллами .....	63
3.2.1 Подготовка препаратов очищенных шаперонов и амилоидных фибрилл .....	63
3.2.2 Sis1 эффективно взаимодействует с фибриллами Sup35NM, но не Rnq1 .....	66
3.2.3 Мутации в олигопептидных повторах N-домена Sup35 не влияют на связывание Sis1 .....	68
3.3 Взаимосвязь между связыванием Hsp40 и привлечением других шаперонов к фибрилле .....	70
3.3.1 Эффективность связывания Hsp40 с фибриллами не оказывает прямого влияния на привлечение Hsp70 ..	70
3.3.2 Sis1 не стимулирует прямое взаимодействие Hsp104 с агрегатами .....	74
Глава 4. Обсуждение .....	76
4.1 Роль Hsp40 в жизненном цикле прионов дрожжей .....	76
4.2 Молекулярные механизмы дезагрегации амилоидов .....	79
4.3 Функциональное значение связывания Sis1 с агрегатами ..	82
Глава 5. Выводы .....	86
Список литературы .....	87
Благодарности .....	111

## Список сокращений

- а.к.о. — аминокислотный остаток;
- АМФ-ФНФ — аденилил-имидодифосфат;
- АТФ — аденозинтрифосфат;
- ГТФ — гуанозинтрифосфат;
- СККБ — система контроля качества белка;
- ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия;
- CTD — C-terminal domain, С-концевой домен;
- CytoQ — cytoplasmic quality (control deposit), цитоплазматический компартмент контроля качества белка;
- DD — dimerization domain, димеризационный домен;
- НТб — последовательность, кодирующая His<sub>6</sub>-тэг, сайт TEV-протеазы и содержащая сайт рестриктазы BamHI;
- INQ — intranuclear quality control (deposit), внутриядерный компартмент контроля качества белка;
- IPOD — insoluble protein deposit, компартмент нерастворимых белков;
- IPTG — isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, изопропил-бета-1-тиогалактопиранозид;
- NBD — nucleotide-binding domain, нуклеотид-связывающий домен;
- NLS — nuclear localization signal, сигнал ядерной локализации;
- NES — nuclear export signal, сигнал экспорта из ядра;
- SBD — substrate-binding domain, субстрат-связывающий домен;
- SDD-AGE — semi-denaturing detergent agarose gel electrophoresis (полуденатурирующий электрофорез в агарозном геле);
- SDS-PAGE — polyacrylamid gel electrophoresis with SDS (денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле с SDS);
- w/v — weight/volume, вес к объёму

## Введение

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

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

**Степень разработанности темы.** В литературе описан целый ряд примеров дифференциальных эффектов шаперонов на прионы дрожжей (например, Reidy *et al.*, 2012; Stein, True, 2014; Reidy *et al.*, 2014; Barbitoff *et al.*, 2017). В работах нашей лаборатории также описаны дифференциальные эффекты фактора Cur1 на прионы (Barbitoff *et al.*, 2017), потенциально связанные с изменением внутриклеточного баланса Sis1. В то же время, от-

сутствуют данные о разнонаправленных эффектах Sis1 на прионы. Также в литературе отсутствуют исследования, посвященные количественному анализу прион-шаперонных взаимодействий, не предложена универсальная модель, объясняющая дифференциальные эффекты шаперонов на поддержание прионов.

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

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

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

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

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, расширяют существующие теоретические представления о механизмах взаимодействия молекулярных шаперонов различных групп с амилоидными агрегатами в клетках

эукариот. Предложенная методика анализа взаимодействия шаперонов с белковыми агрегатами может быть в дальнейшем применена для анализа амилоидных агрегатов белков человека и других млекопитающих.

**Методология и методы исследования.** В ходе выполнения работы был использован целый ряд современных методов исследования, включая методы генетики микроорганизмов, молекулярно-биологические методы работы с нуклеиновыми кислотами и белками, биохимические методы анализа взаимодействия макромолекул, флуоресцентная и электронная микроскопия. Используются различные методы статистической обработки полученных результатов. В ходе диссертационного исследования разработан и применен новый метод анализа взаимодействия молекулярных шаперонов с амилоидными агрегатами.

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

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

1. Barbitoff Y. A., Matveenko A. G., Moskalenko S. E., Zemlyanko O. M., Newnam G. P., Patel A. X., Chernova T. A., Chernoff Y. O., Zhouravleva G. A. To CURE or not to CURE? Differential effects of the chaperone sorting factor Cur1 on yeast prions are mediated by the chaperone Sis1 // *Molecular Microbiology*. 2017. Vol. 105, no. 2. P. 242–257

2. Matveenکو A. G., Barbitoff Y. A., Jay-Garcia L. M., Chernoff Y. O., Zhouravleva G. A. Differential effects of chaperones on yeast prions: CURrent view // Current Genetics. 2018. Vol. 64, no. 2. P. 317–325
3. Drozdova P. B., Barbitoff Y. A., Belousov M. V., Skitchenko R. K., Rogoza T. M., Leclercq J. Y., Kajava A. V., Matveenکو A. G., Zhouravleva G. A., Bondarev S. A. Estimation of amyloid aggregate sizes with semi-denaturing detergent agarose gel electrophoresis and its limitations // Prion. 2020. Vol. 14, no. 1. P. 118–128
4. Barbitoff Y. A., Matveenکو A. G., Bondarev S. A., Maksiutenko E. M., Kulikova A. V., Zhouravleva G. A. Quantitative assessment of chaperone binding to amyloid aggregates identifies specificity of Hsp40 interaction with yeast prion fibrils // FEMS Yeast Research. 2020. Vol. 20, no. 4. foaa025
5. Barbitoff Y. A., Matveenکو A. G., Zhouravleva G. A. Differential interactions of molecular chaperones and yeast prions // Journal of Fungi. 2022. Vol. 8, no. 2. P. 1–18

**Объём и структура работы.** Диссертация состоит из введения и пяти глав. Полный объём диссертации составляет 111 страниц с 21 рисунком и 6 таблицами. Список литературы содержит 209 наименований.



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

### 1.1. Молекулярные шапероны и контроль качества белка

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

#### 1.1.1 История открытия шаперонов

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

Первое предположение о роли белков-шаперонов (или молекулярных

шаперонов) в контроле укладки белковых молекул было выдвинуто Пелэмом в 1984 г. (Pelham, 1984). Это предположение было сделано при изучении процессов, происходящих в живых клетках под воздействием высокой температуры (теплового шока). Эффекты теплового воздействия на молекулярные процессы в клетках подробно изучались с 1962 г., когда Ритосса обнаружил, что тепловое воздействие стимулирует экспрессию некоторых генов плодовых мушек *Drosophila melanogaster*. Кодированные этими генами белки получили впоследствии название белков теплового шока (heat shock proteins, HSP). Пелэм с коллегами исследовали белок теплового шока дрозофилы HSP70, активируемый при тепловом стрессе. Пелэм интерпретировал защитный эффект HSP70 при тепловом стрессе способностью этого белка разрушать белковые комплексы, формируемые неуложенными белковыми молекулами в условиях повышенной температуры (по Morange, 2005). Впоследствии гипотеза Пелэма о функции некоторых белков теплового шока была использована Эллисом, который на основании данных Пелэма и других исследователей заключил, что функция белков шаперонов в контроле укладки белков может быть общей и жизненно важной для всех живых объектов (Ellis, 1987).

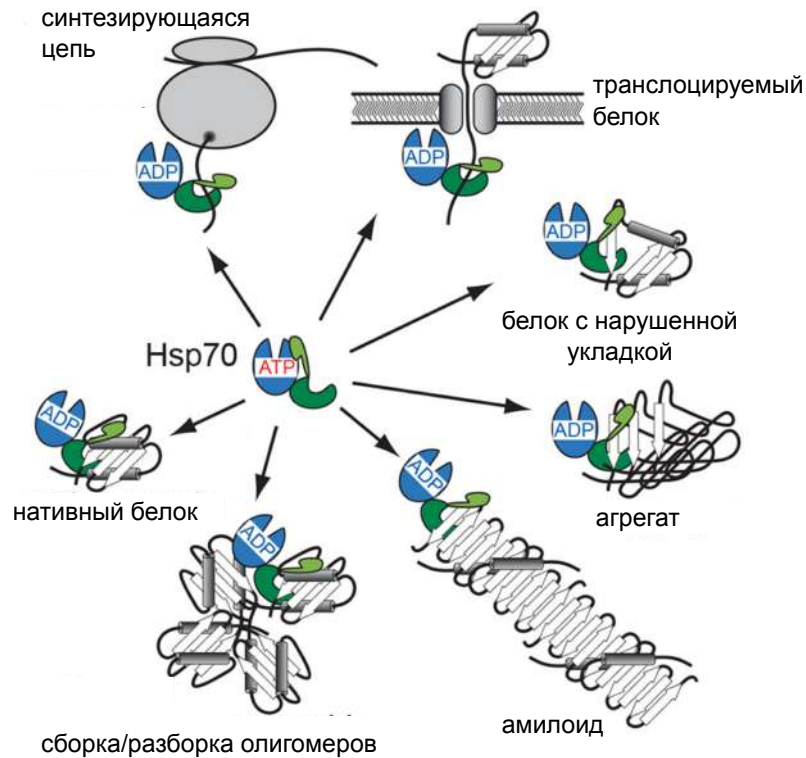
Вскоре после публикации работы Эллиса был предложен термин «шаперонин» для обозначения больших белковых комплексов, играющих роль в сборке олигомерных белковых комплексов. Данный термин был введен после того, как было показано, что белок кишечной палочки *Escherichia coli* GroEL (необходимый для сборки частиц бактериофага  $\lambda$ ) гомологичен Рубиско-связывающему белку из хлоропластов растений (именно с этим белком работала лаборатория Эллиса) (Hemmingsen *et al.*, 1988). Позднее представитель группы шаперонинов был найден у пекарских дрожжей, а мутанты по гену *MIF4*, кодирующему этот белок, характеризовались сниженной способностью к импорту белков в митохондрии. Дальнейшее исследование белков группы Hsp60 показало, что эти белки имеют широкую роль в фолдинге белковых цепей. Так, Хартлом с соавторами было показано, что субстрат Hsp60, дигидрофолатредуктаза (DHFR), способ-

ная к спонтанном рефолдингу в системе *in vitro*, в живой клетке связывалась с Hsp60 в неупорядоченном состоянии. Таким образом, белки группы Hsp60 должны были способствовать укладке этого белка, что уже косвенно влияло и на сборку олигомерных белковых комплексов. Эти результаты, опубликованные в 1989 г., и заложили основу парадигмы шаперон-опосредованного фолдинга полипептидной цепи (по Hartl, 2017).

### 1.1.2 Семейства молекулярных шаперонов

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

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

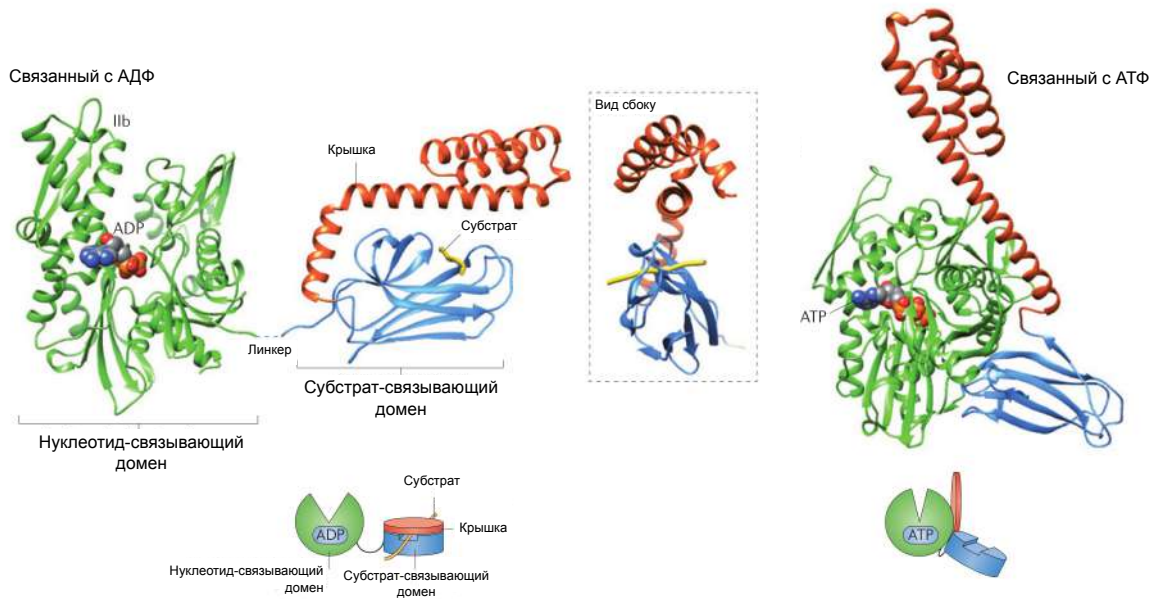


**Рисунок 1. Схема процессов, регулируемых молекулярными шаперонами системы Hsp70/Hsp40.** Адаптировано из (Mayer, Gierasch, 2019).

ют АТФазной активностью. Гидролиз АТФ необходим белкам этой группы для эффективного взаимодействия с белками-клиентами<sup>1</sup>.

Белки семейства Hsp70 характеризуются молекулярной массой около 70 кДа и состоят из двух основных доменов — нуклеотид-связывающего (АТФазного) домена (nucleotide-binding domain, NBD) и субстрат-связывающего домена (substrate-binding domain, SBD), а также небольшого С-концевого домена с неизвестной функцией (Bertelsen *et al.*, 2008). NBD отвечает за связывание АТФ и АТФазную активность шаперона, его укладка во многом похожа на укладку других АТФаз, таких как актин или гексокиназа (по Saibil, 2013). SBD непосредственно участвует в связывании белка-клиента, взаимодействие с которым происходит в специальной бороздке (cleft). Структура SBD состоит из двух важных элементов - основная часть домена имеет укладку « $\beta$ -сэндвича» и обозначается

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

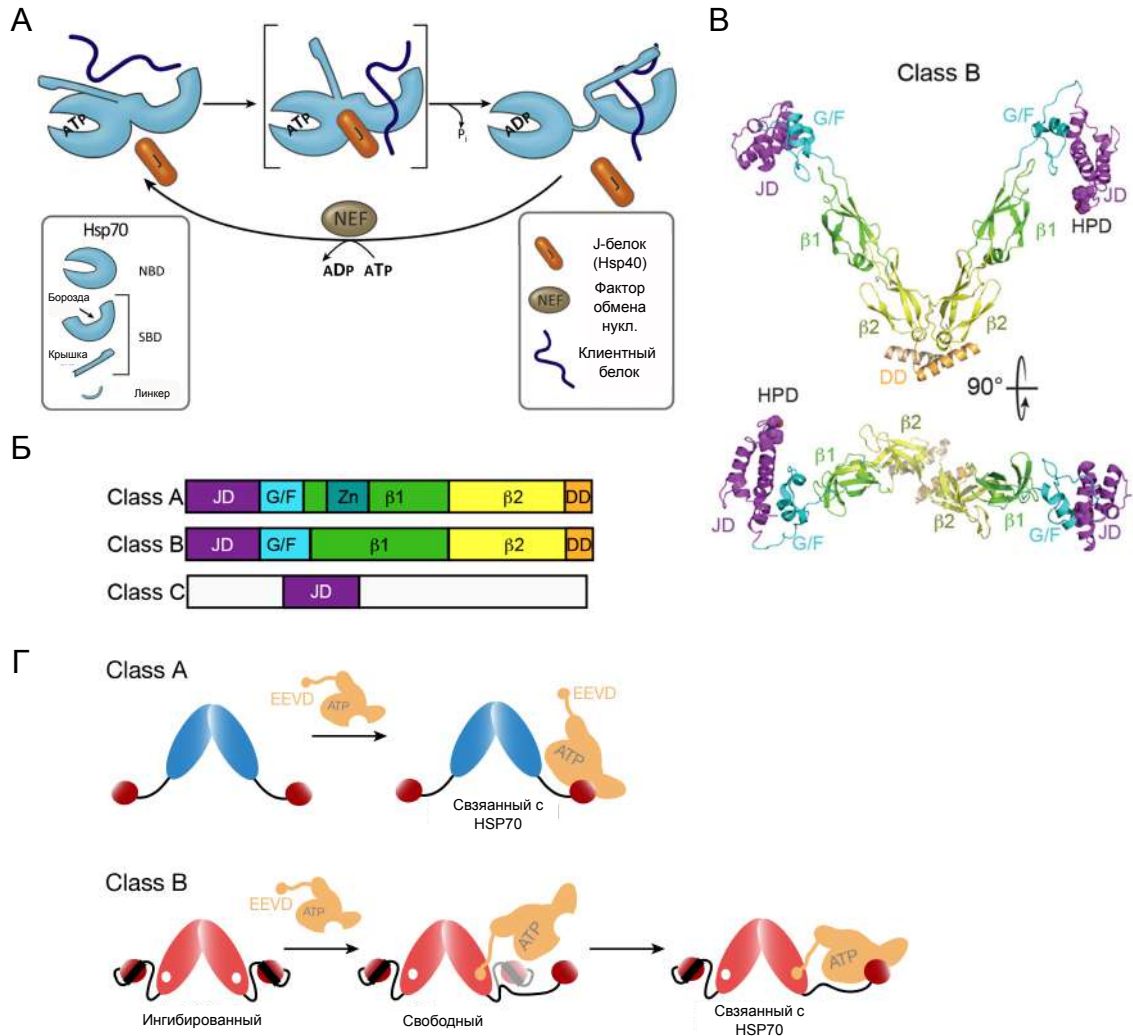


**Рисунок 2. Структура шаперонов Hsp70.** Показана пространственная структура (вверху) и схематическое изображение (внизу) молекулы Hsp70 в состоянии, связанном с АТФ (справа) или АДФ (слева) (модифицировано из Saibil, 2013).

как  $SBD\beta$ , в то время как вторая часть имеет  $\alpha$ -спиральную структуру (Zhu *et al.*, 1996).  $SBD\alpha$  соединен с  $SBD\beta$  подвижным участком и представляет из себя «крышку» (lid), которая играет важную роль в осуществлении функции Hsp70. При связывании субстрата в бороздке SBD и активации АТФазы Hsp70 происходят конформационные изменения в молекуле шаперона, что приводит к изменению положения крышки относительно SBD и ее «захлопыванию». Этот процесс обеспечивает надежное взаимодействие с субстратом и препятствует его преждевременной диссоциации. Напротив, замена АДФ на АТФ в NBD приводит к высвобождению субстратного белка (Рис. 2).

Гидролиз АТФ при связывании субстрата и высвобождение субстрата при замене нуклеотида регулируется кофакторами Hsp70, J-белками (Hsp40) и факторами обмена нуклеотидов (nucleotide exchange factors, NEF). Hsp40 стимулируют АТФазную активность Hsp70 при взаимодействии с клиентным белком, тем самым делая процесс захвата клиента более эффективным (Рис. 3А). Белки группы Hsp40 (называемые также бел-

ками с J-доменом или J-белками от названия первого охарактеризованного представителя группы Hsp40 - бактериального белка DnaJ) играют важнейшую роль в определении субстратной специфичности шаперонов группы



**Рисунок 3. Структура и функции кошаперонов группы Hsp40 (J-белков).** А. Схема, иллюстрирующая цикл активности Hsp70 и участие в нем J-белков (адаптировано из Craig, Marszalek, 2017). Б. Доменная структура J-белков трех основных классов (A, B, C). JD - J-домен, G/F - домен, обогащенный глицином и фенилаланином, β<sub>1</sub> и β<sub>2</sub> - клиент-связывающие домены (CTDI и CTDII), DD - димеризационный домен. В. Модель трехмерной структуры J-белка класса В. HPD - мотив из аминокислотных остатков гистидина, пролина и аспарагиновой кислоты, критически важный для активности J-домена. (Б, В) адаптировано из Mayer, Gierasch, 2019. Г. Схема взаимодействия Hsp70 с Hsp40 класса А (вверху) и класса В (внизу). Для класса В показано высвобождение J-домена от G/F-ингибирования (по Faust *et al.*, 2020).

Hsp70 (по Craig, Marszalek, 2017; Kampinga, Craig, 2010). Неудивительно, что количество генов, кодирующих Hsp40, в геномах про- и эукариот значительно превышает количество генов Hsp70 (например, у человека таких генов 41, а у риса — 125 (Powers, Balch, 2013))

Основными доменами, присутствующими в структуре Hsp40, являются вышеупомянутый J-домен и субстрат-связывающий домен. J-домен отвечает за взаимодействие с Hsp70 и активацию АТФазы (Greene *et al.*, 1998); критическую роль в этом процессе играют три высококонсервативных остатка в последовательности J-домена, формирующих HPD-мотив (Tsai, Douglas, 1996). В ходе стимуляции АТФазной активности HPD-мотив взаимодействует с линкером в составе Hsp70, а сам J-домен также взаимодействует с NBD и SBD $\beta$  (Kityk *et al.*, 2018). В большинстве случаев, J-домен располагается на N-конце белка, а субстрат-связывающий домен — на C-конце, за счет чего часто обозначается как CTD (C-terminal domain). В связи с большим разнообразием J-белков их разделяют на несколько групп. Согласно одной из распространенных классификаций, J-белки можно разделить на три класса (Рис. 3Б). Белки классов А и В содержат в своей структуре (от N-конца к C-концу) J-домен, домен, богатый глицином и фенилаланином (G/F-домен), два идущих подряд клиент-связывающих домена (CTDI и CTDII, или  $\beta_1$  и  $\beta_2$ ), а также димеризационный домен (CTD). Белки класса А отличаются от класса В наличием в составе CTDI  $Zn^{2+}$ -связывающего региона, а также сравнительно меньшей длиной G/F-домена. Представители третьего класса J-белков (класс С) имеют достаточно разнообразную структуру, причем J-домен в этой структуре может располагаться в различных участках белка, а не на N-конце (Mauger, Gierasch, 2019).

Важным функциональным отличием некоторых белков класса В является наличие особого механизма регуляции, называемом G/F-ингибированием (Faust *et al.*, 2020). При взаимодействии с клиентом J-домен у таких белков остается неспособным активировать АТФазу Hsp70 за счет того, что его взаимодействие с NBD Hsp70 ингибировано G/F-

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

Некоторые исследователи отмечают недостатки такой классификации J-белков (Craig, Marszalek, 2017). Так, многие неродственные по происхождению J-белки, сильно отличающиеся по последовательности, оказываются отнесены к одному классу. В частности, это характерно для третьего класса (С), в котором объединены все белки, не несущие N-концевой J-домен и G/F-богатый домен. В связи с подобными неточностями, присутствует необходимость в разработке иной классификации J-белков. Например, основой для выделения подгрупп может являться наличие характерных структурных элементов, таких как клиент-связывающий домен со структурой  $\beta$ -бочонка (пример структуры такого белка, относящегося к классу В по традиционной классификации, представлен на Рис. 3В). Помимо структуры, для разделения J-белков на группы можно использовать клиент-специфичность. Например, среди J-белков можно выделить белки с низкой субстратной специфичностью, взаимодействующие с различными клиентами, так и с конкретным белком или группой белков (Kamringa, Craig, 2010; Craig, Marszalek, 2017). Примером J-белка со специфичным клиентом является ауксиллин (Swa2 у дрожжей), участвующий в процес-



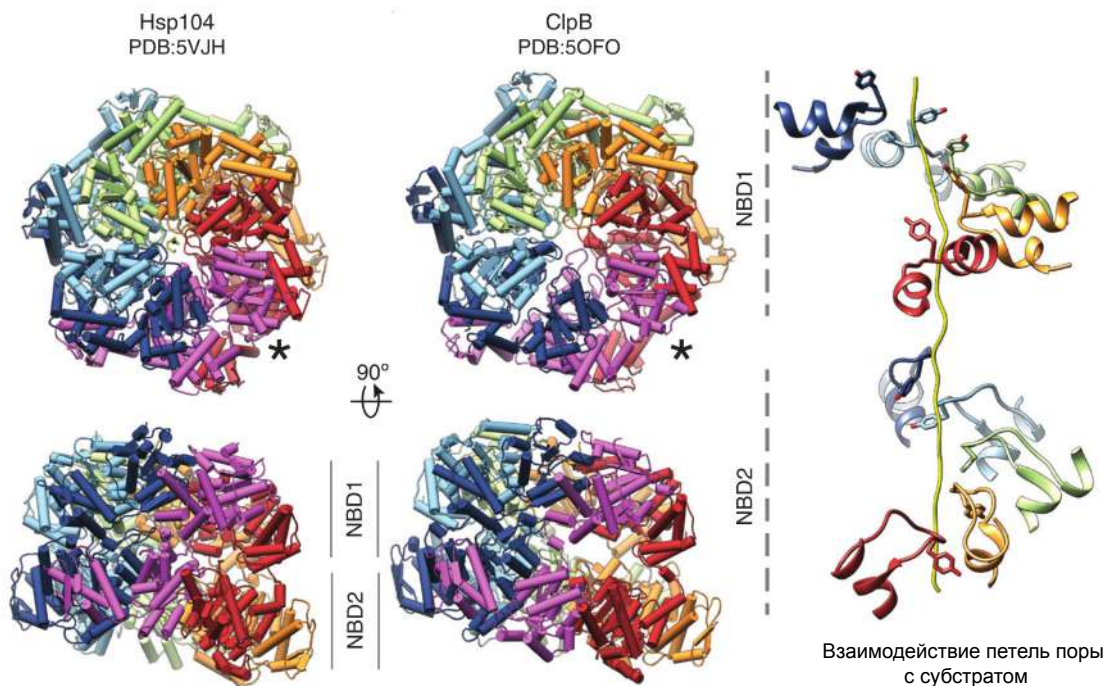
се удаления молекул клатрина с поверхности везикул (Krantz *et al.*, 2013; Rosenzweig *et al.*, 2019).

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

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

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

В отличие от других белков группы Hsp100, участвующих в АТФ-зависимом протеолизе, белки Hsp104 дрожжей *S. cerevisiae* и ClpB бактерий *E. coli* характеризуются уникальной способностью к дезагрегации (см. обзор Shorter, Southworth, 2019). Как и другие представители семейства, ClpB и Hsp104 формируют кольцевые гексамеры, мономеры которых образуют центральную пору шаперона (Duran *et al.*, 2017) (Рис.



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

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

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

поврежденных белков (Hemmingsen *et al.*, 1988; Goloubinoff *et al.*, 1989).

Hsp60, как и Hsp100, формируют комплексы в виде кольца, а каждое кольцо представлено семью и более мономерами. Так, бактериальный Hsp60, GroEL, формирует двойное кольцо молекулярным весом более 800 кДа, которое связывает субстрат в центре кольца. Другая субъединица шаперонинного комплекса, GroES, связывается с GroEL, формируя «крышку» (lid), изолирующую внутреннее пространство и субстрат (Martin *et al.*, 1993). Таким образом, шаперонин формирует изолированное пространство («клетку Anfinsen»), позволяющее субстрату проходить спонтанный процесс фолдинга или оставаться в неукладанном состоянии в полости шаперонина.

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

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

## 1.2. Прионы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

### 1.2.1 Прионы и амилоиды

Прионы были открыты как инфекционные агенты белковой природы, представляющие из себя самовоспроизводящиеся конформационные варианты нативных белков. Гипотеза о том, что белковые молекулы могут иметь инфекционные свойства, была предложена Прузинером для объяснения механизмов возникновения некоторых заболеваний человека и животных, объединяемых в группу инфекционных губчатых энцефалопатий (Prusiner, 1982). К 1982 г. накопилось достаточно данных, свидетельствующих, что инфекционный агент, вызывающий подобные заболевания, имеет невероятно малые размеры, устойчив к кипячению, обработке нуклеазами и ультрафильтрации, и, следовательно, не является ни бактерией, ни вирусом, ни любым другим известным на тот момент патогеном, а также не содержит нуклеиновых кислот. Для объяснения наблюдаемой картины Прузинер предложил гипотезу о том, что субстанция, вызывающая такие заболевания как болезнь Крейтцфельда-Якоба, куру или скрэпи, является белковой молекулой (прионом), способной к воспроизведению собственной структуры за счет изменения конформации таких же белковых молекул в заражаемом организме.

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

Агрегаты, обнаруженные в мозге больных прионными заболеваниями,

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

Так как и прионные болезни, и вышеупомянутые неинфекционные нейродегенеративные заболевания сопровождаются образованием амилоидных агрегатов все эти болезни были объединены в группу амилоидозов, а соответствующие агрегаты объединяются в группу патологических амилоидов (см. обзор Matiiv *et al.*, 2020). В то же время, за последние годы было охарактеризовано большое количество белков, формирующих амилоидные агрегаты при нормальных условиях; для некоторых из белков была показана функциональная важность таких амилоидных агрегатов (см. обзор Sergeeva, Galkin, 2020). Одним из примеров может являться белок Fxr1 крысы *Rattus norvegicus*, формирующий амилоиды в мозге. Предполагается, что эти агрегаты регулируют стабильность РНК (Sorova *et al.*, 2019).

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

ные амилоиды (подробнее см. Ryzhova *et al.*, 2018).

### 1.2.2 Разнообразие и свойства прионов дрожжей

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

В 1994 г. Викнер использовал гипотезу Прузинера для объяснения природы факторов  $\Psi$  и  $[URE3]$  (Wickner, 1994). Викнер сформулировал основные генетические критерии, необходимые для доказательства прионной природы фактора: 1) фенотипическое проявление фактора совпадает с фенотипом делеции его структурного гена или его мутации; 2) фактор подвергается обратимому излечению, т.е. клетка, потерявшая прионный фактор, может вновь приобрести его без внешних воздействий; и 3) временная сверхэкспрессия структурного гена прионного фактора увеличивает частоту его возникновения (Wickner, 2012).

Белки, являющиеся структурными детерминантами прионов  $[PSI^+]$  и  $[URE3]$ , давно установлены. Прион  $[PSI^+]$  является альтернативным конформационным вариантом фактора терминации трансляции eRF3 дрожжей, Sup35. Нонсенс-супрессия, наблюдаемая при переходе Sup35 в прионную форму, возникает следующим образом: при прионизации Sup35

концентрация его нормальной формы снижается, в результате чего не происходит эффективной стимуляции активности другого фактора терминации, eRF1 (Sup45). Как следствие, понижается эффективность терминации трансляции, что приводит к увеличению частоты прочтения преждевременных стоп-кодонов как значащих. В результате этого процесса увеличивается частота синтеза полноразмерного функционального продукта гена, содержащего нонсенс-мутацию, что ведет к супрессии её фенотипического проявления (по Liebman, Chernoff, 2012). При этом комбинация приона [*PSI*<sup>+</sup>] с определенными миссенс- и нонсенс-мутациями *sup45* приводит к слишком сильным дефектам терминации трансляции, вызывающим синтетическую летальность (Kiktev *et al.*, 2007).

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

Как и соответствующие белки высших эукариот, прионогенные белки дрожжей при переходе в прионную конформацию формируют длинные неразветвленные фибриллы, которые имеют амилоидную структуру и набор характерных свойств. Наличие таких белковых агрегатов можно установить при помощи полуденатурирующего электрофореза в агарозном геле (SDD-AGE) (Kryndushkin *et al.*, 2003), а также по увеличению доли белка в осадочной фракции при дифференциальном центрифугировании клеточных лизатов (Patino *et al.*, 1996; Kushnirov *et al.*, 2006). Скопления агрегированного белка можно также наблюдать при флуоресцентной микроскопии (Patino *et al.*, 1996). Важно, что для агрегации структурного белка прионного детерминанта чаще всего необходим не весь белок, а его участок, называемый также прионным доменом (Ross *et al.*, 2005).



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

Третьим по степени изученности можно считать прион  $[PIN^+]$  (Derkatch *et al.*, 1997), образованный амилоидной формой белка Rnq1 (Sondheimer, Lindquist, 2000, Derkatch *et al.*, 2001). Единственным фенотипическим проявлением  $[PIN^+]$  является его способность индуцировать  $[PSI^+]$ : присут-

ствии [ $PIN^+$ ] в клетке дрожжей повышает частоту появления приона [ $PSI^+$ ] (Derkatch *et al.*, 1997). В отличие от описанных выше прионных факторов, физиологическая функция белка Rnq1 неизвестна, а мутация или делеция гена *RNQ1* не приводит к увеличению частоты индукции [ $PSI^+$ ] (Derkatch *et al.*, 2001). Еще один известный прион дрожжей - [ $SWI^+$ ], прионная форма субъединицы комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF, Swi1 (Du *et al.*, 2008). Фенотипически наличие приона [ $SWI^+$ ] характеризуется сниженной способностью дрожжей к росту на средах с сахарами, отличными от глюкозы (например, с раффинозой), но в комбинации с прионом [ $PIN^+$ ], [ $SWI^+$ ] способен, так же как и [ $PSI^+$ ], приводить к усилению нонсенс-супрессии на определенном генетическом фоне (Nizhnikov *et al.*, 2016). Интересной чертой приона [ $SWI^+$ ] является его непосредственное влияние на конформацию взаимодействующих с ним транскрипционных факторов, что, в свою очередь, регулирует экспрессию генов в зависимости от [ $SWI^+$ ]-статуса клетки. Такой прион-зависимой регуляции подвержены, например, гены, ответственные за флокуляцию и инвазивный рост дрожжевых колоний (Du *et al.*, 2015). Появление приона [ $SWI^+$ ] приводит к глобальным изменениям транскрипта (Malovichko *et al.*, 2019). Помимо описанных выше, открыты также и другие прионы и прионоподобные факторы дрожжей, обладающие не менее интересными свойствами. Одним из интересных примеров является фактор [ $GAR^+$ ], который не имеет амилоидной структуры (по Crow, Li, 2011). Появление фактора [ $GAR^+$ ] обусловлено возрастанием в среде концентрации молочной кислоты, происходящее, например, при совместном росте культур дрожжей и бактерий (García *et al.*, 2016).

Важным свойством дрожжевых прионов является существование так называемых штаммов, или вариантов приона (см. обзор Kushnirov *et al.*, 2022). Наличие разнообразных вариантов не является уникальной особенностью прионов дрожжей — варианты охарактеризованы, например, для белка PrP млекопитающих (см. обзор Ghaemmaghami, 2017). Разные варианты приона характеризуются различной силой фенотипического прояв-

ления, связанной со специфической конформацией белка в составе амилоидных фибрилл, а также различной кинетикой их образования и фрагментации (Derkatch *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 2004). Различия в структуре агрегатов вариантов приона проявляются и при анализе протеазо-устойчивого кора фибриллы при помощи масс-спектрометрии (Kushnirov *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2021). Для приона  $[PSI^+]$  известно более 20 различных вариантов (Huang, King, 2020). Наиболее часто различают так называемые «сильные» (strong) и «слабые» (weak) варианты, обозначаемые как  $[PSI^+]^S$  и  $[PSI^+]^W$ , соответственно (Derkatch *et al.*, 1996). Установлено, что более сильное проявление фенотипа  $[PSI^+]^S$  связано с усиленной конверсией растворимого белка в прионную изоформу и включение его в агрегаты. Это происходит, в том числе, за счет большего количества амилоидных фибрилл в клетке и их меньшего размера. Слабый вариант  $[PSI^+]^W$  имеет, напротив, большую среднюю длину агрегатов в совокупности с меньшим их количеством. Как следствие, доля белка в растворимой фракции в клетках  $[PSI^+]^W$  заметно выше и достигает 20%, по сравнению с 3-5% в случае  $[PSI^+]^S$  (Derdowski *et al.*, 2010). Высказано предположение, что прионы дрожжей существуют в виде динамического «облака вариантов», т.е. в клетке одновременно присутствует ряд агрегатов различной структуры, хотя данная концепция не является общепринятой (Bateman, Wickner, 2013).

### 1.3. Система контроля качества белков и прионы дрожжей

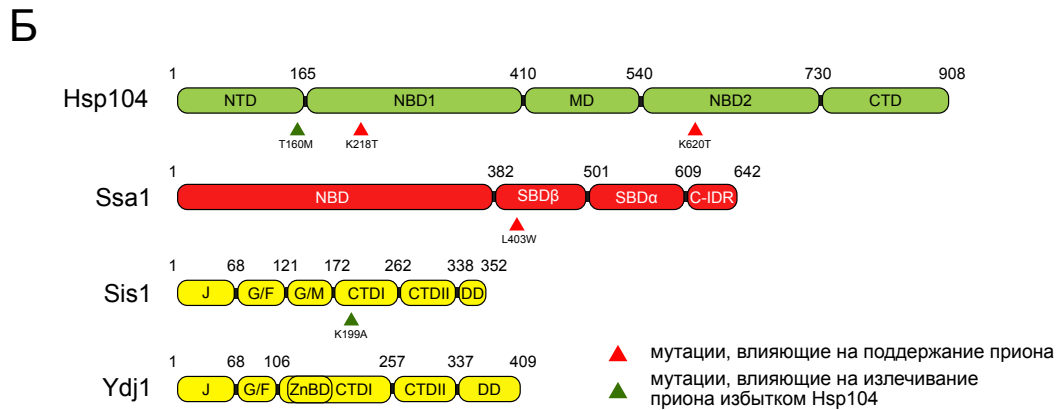
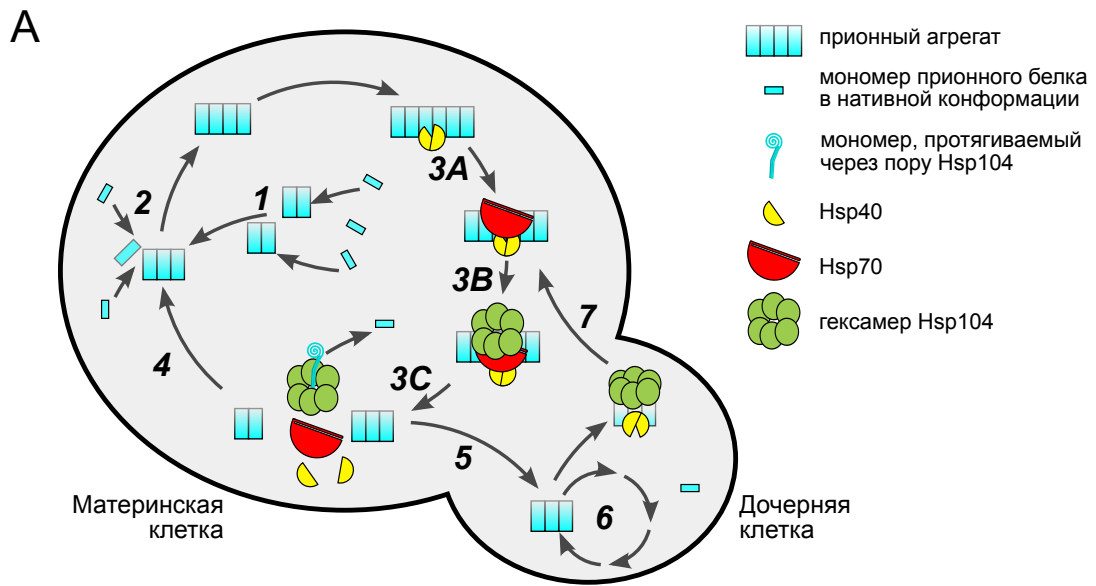
Поддержание и распространение прионов дрожжей невозможно без нескольких ключевых процессов: постоянной конверсии новых мономеров и их включения в состав существующих агрегатов, фрагментации агрегатов с формированием новых прионных «семян» (пропагонов), а также передачи прионных семян в дочерние клетки (Kushnirov, Ter-Avanesyan, 1998; Inoue, 2009; Chernova *et al.*, 2014; Barbitoff *et al.*, 2022) Совокупность этих процессов формирует жизненный цикл приона (Рис. 5А). Все процессы, входящие в жизненный цикл приона, в той или иной степени опо-

средованы взаимодействием приона с системой молекулярных шаперонов или иными компонентами системы контроля качества белка. Данные, полученные как *in vivo*, так и *in vitro*, свидетельствуют о роли шаперонов как в процессе формирования прионных агрегатов и прионной конверсии, так и в фрагментации амилоидных фибрилл (Chernoff *et al.*, 1999; Kushnirov *et al.*, 2000; Shorter, Lindquist, 2004; Krzewska, Melki, 2006; Shorter, Lindquist, 2006; Savistchenko *et al.*, 2008; Shorter, Lindquist, 2008; Kiktev *et al.*, 2015). Далее мы детально рассмотрим роль основных шаперонов в поддержании прионов дрожжей.

### 1.3.1 Hsp104 — ключевой регулятор поддержания прионов

Основным элементом системы молекулярных шаперонов, необходимым для поддержания дрожжевых прионов, является Hsp104, катализирующий фрагментацию прионных агрегатов. Участие Hsp104 в процессе «размножения» дрожжевого приона [*PSI*<sup>+</sup>] было продемонстрировано Черновым с соавторами в 1995 г. (Chernoff *et al.*, 1995). Делеция Hsp104, экспрессия доминантно негативной аллели Hsp104KT, а также ингибирование АТФ-азной активности Hsp104 при помощи гидрохлорида гуанидина, приводит к потере всех амилоидных дрожжевых прионов (Chernoff *et al.*, 1995; Moriyama *et al.*, 2000; Sondheimer, Lindquist, 2000; Wegrzyn *et al.*, 2001). При сверхэкспрессии Hsp104 также наблюдается изгнание прионов, однако это изгнание достаточно эффективно только для [*PSI*<sup>+</sup>] (Chernoff *et al.*, 1995; Sharma, Masison, 2008a; Matveenko *et al.*, 2018).

Механизм излечения прионов при сверхэкспрессии *HSP104* являлся предметом большого количества исследований. Показано, что делеция N-домена *HSP104* препятствует изгнанию приона при сверхэкспрессии этого шаперона, но не препятствует поддержанию приона при нормальных уровнях Hsp104 (Hung, Masison, 2006; Winkler *et al.*, 2012b). Кроме того, мутация T160M, располагающаяся в N-домене *HSP104* (Рис. 5Б), приводит к сходным эффектам; более того, варианты приона [*PSI*<sup>+</sup>], полученные *de novo* на фоне такой мутации, излечиваются даже нормальными уровнями



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

Hsp104 (Gorkovskiy *et al.*, 2017). Предложены три основные модели излечения приона при сверхэкспрессии *HSP104*. Первая модель предполагает, что сверхпродукция Hsp104 искажает соотношение концентраций шаперонов разных групп в цитозоле, что приводит к некорректному взаимодействию Hsp104 с прионным агрегатом (Winkler *et al.*, 2012a). Альтернативная модель предполагает наличие у Hsp104 способности к отщеплению («триммингу») мономеров с конца фибриллы, проявляющейся при его сверхпродукции и ведущей к быстрой разборке прионных агрегатов (Paushkin *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2014). Наконец, третья модель предполагает, что сверхпродукция Hsp104 приводит к нарушению сегрегации пропагонов между материнской и дочерней клетками (Ness *et al.*, 2017; Cox, Tuite, 2018). Существуют, однако, данные, свидетельствующие о потенциальной механистической общности процессов фрагментации агрегатов и излечения приона при избытке Hsp104. В частности, вышеупомянутая мутация T160M способна дестабилизировать некоторые варианты [*PSI*<sup>+</sup>] и нарушать фрагментацию прионных агрегатов (Huang *et al.*, 2021). Наряду с этим, делеция сайта связывания Hsp104 в M-домене Sup35 (участок 129—148 а.к.о.) приводит как к потере чувствительности [*PSI*<sup>+</sup>] к избытку Hsp104, так и к его дестабилизации (Helsen, Glover, 2012).

Интересно также отметить эффекты замены Hsp104 на химерные белки, содержащие некоторые домены Hsp104 и ClpB. Некоторые такие белки эффективно поддерживают прионы дрожжей, но для этого обязательно присутствие M-домена Hsp104 (Reidy *et al.*, 2012). Особый интерес представляет химерный белок 444B, содержащий NBD2 ClpB вместо аналогичного домена Hsp104. Такой вариант способствует поддержанию большинства прионов, но может излечивать только некоторые их варианты при сверхэкспрессии (Zhao *et al.*, 2017).

### 1.3.2 Роль различных Hsp70 в жизненном цикле прионов дрожжей

Шапероны группы Hsp70 также играют важную роль в поддержании прионов дрожжей (Newnam *et al.*, 1999). У дрожжей Hsp70 представле-

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

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

Помимо Ssa, в жизненном цикле прионов дрожжей играют роль и другие Hsp70, такие как Ssb1/2 и Ssz1. И Ssb1, и Ssz1 активно участвуют в фолдинге белка при трансляции и связаны с рибосомой. Ssz1 является частью рибосом-ассоциированного шаперонного комплекса (ribosome-associated chaperone complex, RAC). Сверхэкспрессия *SSB1* приводит к усилению дестабилизации [*PSI*<sup>+</sup>]; показано, что данный эффект обусловлен конкуренцией Ssb и Ssa за связывание прионных агрегатов (Chernoff, Kiktev, 2016). Дисбаланс в количестве Hsp70 и Hsp104 на ранних стадиях кратковремен-

ного теплового шока приводит к дестабилизации приона [ $PSI^+$ ] (Newnam *et al.*, 2011). Делеция *SSB1* снижает эффективность дестабилизации приона при тепловом шоке, в то время как делеция *SSZ1* усиливает её (Howie *et al.*, 2019).

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

### 1.3.3 Дифференциальные эффекты Hsp40 на прионы

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

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



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

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

клиентом (Lee *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006).

Показано, что Sis1 способствует понижению прионной токсичности приона [*PIN*<sup>+</sup>], а также токсичности, связанной со сверхэкспрессией Q-богатых районов мутантного белка хантингтина, и токсичности приона [*PSI*<sup>+</sup>] при сверхэкспрессии генов *SFP1* и *SUP35* (Gokhale *et al.*, 2005; Douglas *et al.*, 2008; Matveenko *et al.*, 2016). Недавно было также продемонстрировано, что токсичность, наблюдающаяся при замене нормальной аллели *SIS1* на вариант, содержащий только J- и G/F-домены в клетках, несущих прион [*PSI*<sup>+</sup>], вызывается избыточной агрегацией Sup35 и компенсируется только Sis1 с интактным CTD и димеризационным доменом (Kumar *et al.*, 2021).

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

**Ydj1 и иные Hsp40.** Наиболее интенсивно продуцируемым Hsp40 дрожжей, однако, является другой белок, Ydj1. Он принадлежит к первому классу Hsp40 (классу А) и, в отличие от Sis1, не является жизненно важным. Ydj1 также вовлечен в поддержание прионов дрожжей. Однако, сверхэкспрессия *YDJ1* излечивает прион [*URE3*] и усиливает прион [*PSI*<sup>+</sup>] (Moriyama *et al.*, 2000; Barbitoff *et al.*, 2017). При этом для обеспечения специфического эффекта Ydj1 достаточно исключительно его J-домена. Вероятно, одного взаимодействия J-домена Ydj1 достаточно для определения специфичности работы молекулярных шаперонов Hsp70 и Hsp90,

что в свою очередь может влиять на функциональность Hsp104 и на эффективность работы последнего как дезагрегазы (Harris *et al.*, 2014; Reidy *et al.*, 2014).

Помимо основных цитозольных Hsp40 в поддержании прионов задействованы еще три представителя семейства J-белков: Arj1, Swa2 и Zuo1. Zuo1 является компонентом упомянутого ранее RAC, и его влияние на прионы сходно с таковым для Hsp70-Ssz1. Делеция гена *ZUO1* увеличивает частоту индукции [*PSI*<sup>+</sup>] и способствует излечиванию приона при тепловом шоке (Amor *et al.*, 2015; Kiktev *et al.*, 2015; Howie *et al.*, 2019). Arj1 способствует изгнанию [*PSI*<sup>+</sup>] при сверхэкспрессии *HSP104*, а его делеция препятствует этому процессу, но только в случае сильного варианта [*PSI*<sup>+</sup>] (Astor *et al.*, 2018). Arj1 содержит в своей структуре особый QS-домен, характеризующийся структурной неупорядоченностью. Именно этот домен, но не CTD Arj1, необходим для излечивания прионов избытком Hsp104 (Berger *et al.*, 2020). Swa2, дрожжевой гомолог ауксилена, необходим для поддержания приона [*URE3*], который дестабилизируется при делеции соответствующего гена (Higurashi *et al.*, 2008; Troisi *et al.*, 2015).

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

ваемые Q-тельцами или CytoQ (Kaganovich *et al.*, 2008; Escusa-Toret *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2015a; Miller *et al.*, 2015b).

IPOD считается местом скопления белков, укладка которых необратимо нарушена — в частности, в IPOD наблюдаются скопления дрожжевых прионогенных белков, в особенности при их сверхпродукции (Kaganovich *et al.*, 2008). INQ и CytoQ, напротив, являются местами скопления аморфных, неструктурированных белковых агрегатов и выполняют функцию временной изоляции неправильно сложенных белков. В соответствии с этой моделью, INQ и CytoQ формируются в первую очередь в стрессовых условиях (Miller *et al.*, 2015b). В последние годы накопление белков в CytoQ, INQ и IPOD стало рассматриваться как один из основных сценариев работы системы контроля качества белков, помогающий клетке справиться с избытком неправильно уложенных белков. В соответствии с этой гипотезой, было показано, что изоляция белков в CytoQ/INQ позволяет поддерживать функциональность системы Hsp70 при стрессе (Ho *et al.*, 2019). Сортировка в каждый из компартментов осуществляется с помощью различных шаперонов и факторов сортировки белков, основные из которых — Btn2 и Hsp42 — также именуется агрегазами. Контроль транспортировки агрегатов в JUNQ/INQ осуществляется при помощи белка Btn2, в этом процессе принимает активное участие Sis1 (Malinowska *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2015a); Hsp42 контролирует перенос белков в цитоплазматические компартменты — IPOD и CytoQ (Specht *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2015a).

Известно, что сверхпродукция Hsp42 и Btn2 приводит к изгнанию приона [URE3] (Kryndushkin *et al.*, 2008; Wickner *et al.*, 2014), а сверхэкспрессия *BTN2* способна также изгонять искусственный прион [NRP1C<sup>+</sup>], образованный химерным белком, состоящим из прионного домена белка Npr1 и С-концевого домена Sup35 (Malinowska *et al.*, 2012). Помимо этого, сверхпродукция Hsp42 приводит к усилению прионного фенотипа [PSI<sup>+</sup>], хотя молекулярные механизмы этого эффекта остаются слабо изученными (Barbitoff *et al.*, 2017).

Ген *CURI* (от англ. Curing of [URE3]) является паралогом гена *BTN2*,

возникшим в результате полногеномной дупликации в эволюции дрожжей (Byrne, Wolfe, 2005). В 2008 г. была впервые продемонстрирована способность *CUR1* излечивать дрожжевой прион [*URE3*] при сверхэкспрессии (Kryndushkin *et al.*, 2008). Аналогичный эффект наблюдался и для искусственного приона [*NRP1C<sup>+</sup>*] (Malinovska *et al.*, 2012) и для приона [*PSI<sup>+</sup>*] (Zhao *et al.*, 2018). Сверхэкспрессия *CUR1* приводит к изменению внутриклеточной локализации *Sis1* (Malinovska *et al.*, 2012); такой антиприонный эффект изменения локализации *Sis1* является ожидаемым ввиду зависимости всех прионов от уровня этого Hsp40 (см. выше). Позднее было показано, что *Cur1* и *Btn2* изгоняют некоторые варианты [*URE3*] даже без искусственной сверхэкспрессии (Wickner *et al.*, 2014).

В ходе исследований в нашей лаборатории ген *CUR1* был выявлен при скрининге геномной библиотеки дрожжей как ген, усиливающий синтетическую летальность мутаций *sup45* с прионом [*PSI<sup>+</sup>*] (Kiktev *et al.*, 2011). В дальнейшем было показано, что сверхэкспрессия *CUR1* специфически усиливает фенотип [*PSI<sup>+</sup>*]. Таким образом, сверхэкспрессия *CUR1* противоположным образом влияет на различные прионы дрожжей. Тем не менее, для штаммов, несущих как [*PSI<sup>+</sup>*], так и [*URE3*], показано изменение внутриклеточной локализации *Sis1* при сверхпродукции *Cur1* (Barbitoff *et al.*, 2017). Это наблюдение говорит о том, что изменение внутриклеточного баланса *Sis1* и снижение его цитозольной концентрации может положительно сказываться на поддержании и распространении некоторых прионов (например, [*PSI<sup>+</sup>*]). Данная гипотеза, однако, требует дальнейшей проверки.

#### 1.4. Заключение

За время, прошедшее с момента открытия молекулярных шаперонов, были описаны различные классы этих белков. Исследования в области структурной биологии позволили детально расшифровать цикл работы даже таких сложных молекулярных машин, как дезагрегазы Hsp104 и ClpB. В то же время, увеличение количества информации о различных шаперо-

нах и других элементах системы контроля качества белка привело к рождению концепции «шаперонной сети» или «сети протеостаза» — сложной системы, большое количество компонентов которой работают сообща для поддержания протеостаза (Balch *et al.*, 2008).

Учитывая общую сложность устройства шаперонных сетей, неудивительно, что молекулярные шапероны разных групп оказывают существенное влияние на прионы дрожжей, причем как способствуя их поддержанию, так и препятствуя ему. В то же время, слабо охарактеризованы механизмы, лежащие в основе дифференциальных эффектов шаперонов на прионы. Как было указано выше, такие дифференциальные эффекты убедительно показаны для Ydj1 и фактора сортировки белков Cug1, чьи эффекты опосредуются Sis1. Принимая во внимание центральную роль J-белков в субстратной специфичности Hsp70, можно предположить, что наблюдаемые разнонаправленные эффекты отражают роль J-белков в определении судьбы белковых агрегатов в эукариотических клетках. Таким образом, изучение механизмов наблюдаемых эффектов поможет понять принципы взаимодействия шаперонных сетей с амилоидными агрегатами и разработать подходы к терапии амилоидозов высших эукариот.

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1. Штаммы бактерий и дрожжей

Список использованных в работе штаммов *E. coli* представлен в таблице 1. Штамм DH5 $\alpha$  был использован для наработки плазмид, штаммы BL21 (DE3), NiCo21 (DE3), Rosetta (DE3) и Zeta - для наработки и очистки дрожжевых белков. Штамм Zeta (предоставлен В.Е. Твороговой) является производным от Rosetta (DE3) и демонстрирует отличающиеся от исходного штамма характеристики роста и продукции белков.

Список использованных в работе штаммов дрожжей *S. cerevisiae* представлен в таблице 2. Штамм дрожжей 2-prb1 $\Delta$ 0-P-74-D694 был использован для наработки и очистки белков. Данный штамм является производным широко используемого штамма 74-D694. Данный штамм несет делецию гена *PRB1*, кодирующего вакуолярную протеазу Б (Moehle *et al.*, 1987). Штамм U-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 был получен при помощи замещения плазмиды pRS315-SIS1 в штамме T-P<sup>T</sup>-YAL2171 (Barbitoff *et al.*, 2022) на плазмиду YCplac33-SIS1. Штаммы L-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 и L $\Delta$ -T-P<sup>T</sup>-YAL2171

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

Название штамма	Генотип	Происхождение
DH5 $\alpha$	<i>supE44 <math>\Delta</math>lacU169 (<math>\phi</math>80 lacZ<math>\Delta</math>M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA</i>	Hanahan, 1983
BL21 (DE3)	<i>F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) <math>\lambda</math>(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5])</i>	Studier, Moffatt, 1986
NiCo21 (DE3)	<i>ompT gal [dcm] [lon] <math>\Delta</math>hsdS glmS6Ala arnA::CBD slyD::CBD can::CBD fhuA2 (<math>\lambda</math> DE3) <math>\lambda</math> DE3 = <math>\lambda</math> sBamHIo <math>\Delta</math>EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 <math>\Delta</math>nin5</i>	NEB #C2529H
Rosetta (DE3)	<i>F- ompT hsdSB(RB- mB-) gal dcm<math>\lambda</math>(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5]) pRARE (CamR)</i>	Novagen #70954 (предоставлен К.В. Волковым)
Zeta	<i>F- ompT hsdSB(RB- mB-) gal dcm<math>\lambda</math>(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5]) pRARE (CamR)</i>	предоставлен В.Е. Твороговой

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

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

были получены замещением плазмиды YCplac33-SIS1 в штамме U-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 на плазмиду YCplac111-SIS1 или YCplac111-SIS1ΔDD, соответственно.



Таблица 3. Плазмиды, использованные в данной работе

Плазмида	Описание	Происхождение
pPROEX-HTb-RNQ1	AmpR, <i>HTb-RNQ1</i>	Данная работа
pID129	AmpR, <i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P<sub>RNQ1</sub>-RNQ1</i>	Kadnar <i>et al.</i> , 2010
pET-20b-SUP35NM	AmpR, <i>SUP35NM-His<sub>6</sub></i>	Allen <i>et al.</i> , 2005
pET-20b-SUP35NM-M1	AmpR, <i>SUP35NM-M1-His<sub>6</sub></i>	Бондарев, 2014
pET-20b-SUP35NM-M2	AmpR, <i>SUP35NM-M2-His<sub>6</sub></i>	Бондарев, 2014
pET-20b-SUP35NM-M4	AmpR, <i>SUP35NM-M4-His<sub>6</sub></i>	Бондарев, 2014
pET-20b-SUP35NM-M5	AmpR, <i>SUP35NM-M5-His<sub>6</sub></i>	Бондарев, 2014
pET-20b-SUP35NM $\Delta$ BS	AmpR, <i>SUP35NM<math>\Delta</math>BS-His<sub>6</sub></i>	Данная работа
pPROEX-HTb-Sis1	AmpR, <i>HTb-SIS1</i>	Shorter, Lindquist, 2004
pPROEX-HTb-Sis1 $\Delta$ DD	AmpR, <i>HTb-sis1<math>\Delta</math>DD</i>	Данная работа
pPROEX-HTb-HSP104	AmpR, <i>HTb-HSP104</i>	Данная работа
pGPD-HSP104	AmpR, $2\mu$ , <i>URA3</i> , <i>P<sub>TDH3</sub>-HSP104</i>	А.А. Рубель, не опубликована
pPROEX-HTb-HSP104 $\Delta$ N	AmpR, <i>HTb-HSP104<math>\Delta</math>N</i>	Данная работа
pTEF-SSA1	AmpR, <i>CEN</i> , <i>URA3</i> , <i>P<sub>TEF1</sub>-His<sub>6</sub>-Xpress-SSA1</i>	James <i>et al.</i> , 1997
pTEF-SSA1-21	AmpR, <i>CEN</i> , <i>URA3</i> , <i>P<sub>TEF1</sub>-His<sub>6</sub>-Xpress-SSA1-21</i>	Данная работа
pRS426	$2\mu$ , <i>URA3</i>	Christianson <i>et al.</i> , 1992
pRS426-CUR1	$2\mu$ , <i>URA3</i> , <i>P<sub>CUR1</sub>-CUR1</i>	Barbitoff <i>et al.</i> , 2017
pRS426-cur1 $\Delta$ 3-22	$2\mu$ , <i>URA3</i> , <i>P<sub>CUR1</sub>-cur1<math>\Delta</math>3-22</i>	Barbitoff <i>et al.</i> , 2017
pRS315	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i>	Sikorski, Hieter, 1989
YCplac111	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i>	Gietz, Sugino, 1988
pRS315-SIS1	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P<sub>SIS1</sub>-SIS1</i>	Gokhale <i>et al.</i> , 2005
YCplac111-SIS1	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P<sub>SIS1</sub>-SIS1</i>	Данная работа
YCplac111-SIS1 $\Delta$ DD	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P<sub>SIS1</sub>-sis1<math>\Delta</math>DD</i>	Данная работа
pAG415ADH1-Sis1-EGFP	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P<sub>ADH1</sub>-SIS1-EGFP</i>	Malinovska <i>et al.</i> , 2012
pAG415ADH1-NLS-Sis1-EGFP	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P<sub>ADH1</sub>-NLS-SIS1-EGFP</i>	Malinovska <i>et al.</i> , 2012
pAG415ADH1-NES-Sis1-EGFP	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P<sub>ADH1</sub>-NES-SIS1-EGFP</i>	Malinovska <i>et al.</i> , 2012
pAG415ADH1-Sis1 $\Delta$ DD-EGFP	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P<sub>ADH1</sub>-sis1<math>\Delta</math>DD-EGFP</i>	Malinovska <i>et al.</i> , 2012
pR16CUP-SUP35NM-yTagRFP-T	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P<sub>CUP1</sub>-SUP35NM-yTagRFP-T</i>	А.Г. Матвеевко, не опубликовано

## 2.2. Плазмиды

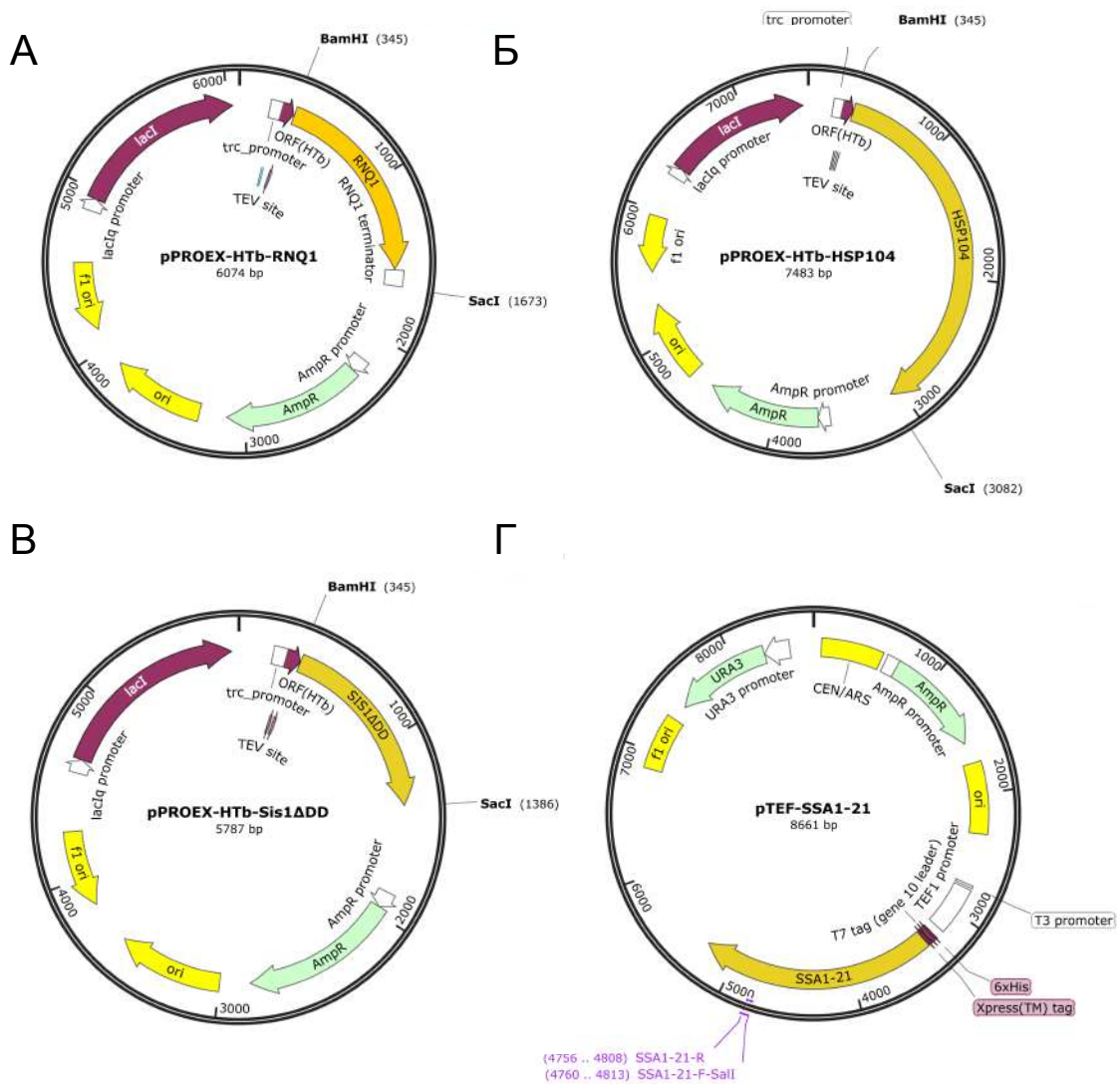
Плазмиды, использованные в работе, представлены в таблице 3. Последовательности праймеров, использованных при конструировании плазмид, указаны в таблице 4. Для создания плазмид pPROEX-НТb-RNQ1 и pPROEX-НТb-HSP104 (Рис. 6А-Б) мы клонировали фрагменты плазмид pID129 (Kadnar *et al.*, 2010) и pGPD-HSP104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

Конструкция pPROEX-НТb-HSP104 $\Delta$ N была получена при помощи амплификации фрагмента последовательности гена *HSP104*, не содержащего N-домен, при помощи праймеров Hsp104-delN147-BamHI и

**Таблица 4.** Праймеры для ПЦР, использованные в данной работе

Праймер	Последовательность (5' → 3')
M13rev(-48)20-mer	agcggataacaatttcacac
Sis1-deltaDD-SacI-End-R	cgtcGAGCTCTCAattggatagtcacttt
Hsp104-delN147-BamHI	agctGGATCCatgcgtggtaacactagaattgact
Hsp104CloneRS	gactcgagctcttaattctaggtcatcatcaatttc
supa1_R	ggaactggagacaagcttcaagcttttgctttgaaagtcgttca
supa2_F	atgtctttgaacgactttcaaaagcaaaagactttgaagcttgctcca
SSA1-21-F-SalI	tttcgatgctgacttaacggatttGgaatgtttccgccgtaaaagggtac
SSA1-21-R	cttttcgacggcggaaacattcCaataaccgtagagtcgacatcgaaagtga

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



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

Hsp104CloneRS с последующей обработкой полученного ПЦР-продукта рестриктазами BamHI и SacI и лигированием в обработанный этими же рестриктазами остов исходной плазмиды.

Плазмида YCplac111-SIS1 была получена при помощи клонирования фрагмента плазмиды pRS315-SIS1, полученного при ее обработке рестриктазами BamHI и SalI, в обработанный этими же ферментами остов

вектора YCplac111. Для получения конструкции YCplac111-SIS1 $\Delta$ DD мы произвели замену фрагмента плазмиды YCplac111-SIS1, содержащего 3' участок гена *SIS1*, на соответствующий участок из плазмиды pPROEX-NTb-Sis1 $\Delta$ DD при помощи рестриктаз XhoI и SacI.

Получение плазмид pET-20b-SUP35NM $\Delta$ BS (А. Михайличенко, не опубликовано) и pTEF-SSA1-21 (Рис. 6г) (Barbitoff *et al.*, 2022) производили с использованием методики сайт-направленного мутагенеза. Для этого производили амплификацию соответствующей плазмиды (pET-20b-SUP35NM или pTEF-SSA1) с использованием высокоточной полимеразы AccuPrime<sup>TM</sup> Pfx (Invitrogen, #12344-024) и соответствующей пары праймеров (supa1\_R и supa2\_F для pET-20b-SUP35NM $\Delta$ BS или SSA1-21-F-SalI и SSA1-21-R в случае pTEF-SSA1-21).

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

### 2.3. Среды и условия культивирования

Бактерии культивировали в чашках Петри при 37° С на стандартной бактериальной среде LB (20 г агара, 10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl на 1 л среды) с добавлением ампициллина в концентрации 100 мкг/мл при необходимости.

Для получения суспензионных культур бактерий использовали среды LB или 2TY (16 г триптона, 10 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl на 1 л среды) (Sambrook *et al.*, 1989) с добавлением ампициллина в концентрации 100 мкг/мл при необходимости. Среда 2TY с добавлением ампициллина использовалась для культивирования бактерий, продуцирующих гетерологичные белки.

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

повышения активности молекулярных шаперонов.

Дрожжи, несущие плазмиду для очистки целевого белка, культивировали при температуре 30° С в стандартной дрожжевой среде SC (Kaiser *et al.*, 1994) без добавления урацила в течение ночи, после чего ночную культуру разводили чистой средой до конечного значения  $OD_{600} = 0.1$ . Клетки выращивали до  $OD_{600} = 2.0$ , после чего собирали при помощи центрифугирования.

## 2.4. Генетические методы

### 2.4.1 Трансформация клеток дрожжей и бактерий

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

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

### 2.4.2 Оценка частоты потери приона [*URE3*]

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

манта.

## **2.5. Флуоресцентная микроскопия**

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

## **2.6. Молекулярно-биологические методы**

### **2.6.1 Полимеразная цепная реакция**

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

### **2.6.2 Рестрикция**

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

### **2.6.3 Лигирование ДНК-фрагментов**

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

### **2.6.4 Выделение плазмидной ДНК из бактерий**

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

### **2.6.5 Электрофорез ДНК**

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

### **2.6.6 Выделение и электрофорез белков из клеток дрожжей и бактерий**

Для анализа уровней белков в клетках дрожжей при помощи денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) выделение белка из клеток дрожжей производили по методу щелочного лизиса

(Kushnirov *et al.*, 2000, Zhang *et al.*, 2011). Для приготовления лизата использовали 1,5 мл культуры с оптической плотностью  $OD_{600} = 0,75$ .

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

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

Для проведения вестерн-блоттинга мембрану инкубировали в течение 15 минут в 1% (w/v) растворе blocking agent (GE Healthcare) в буфере TTBS (на 1 литр - 9 г NaCl, 15 мл 1 М Трис-HCl (pH 7,6), 0,5 мл Tween 20). После инкубации мембраны с соответствующими первичными антителами (Таблица 5) и вторичными антителами (GE Healthcare) производили детекцию результатов с использованием инструмента GeneGnome (SynGene) и набора реагентов ECL Select Western Blot Detection Reagent (GE Healthcare).

**Таблица 5.** Первичные антитела, использованные в данной работе

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



### **2.6.7 Полуденатурирующий электрофорез в агарозном геле (SDD-AGE)**

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

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

### **2.7.1 Оптимизация условий для наработки белков в клетках бактерий**

Оптимальные условия продукции белков подбирали при помощи анализа количества белка в клеточных лизатах разных штаммов при разных температурах культивирования. Бактерии, трансформированные сконструированными плазмидами, выращивали в течение ночи, после чего ночную культуру разводили в 100 раз и индуцировали экспрессию целевого белка добавлением IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Пробы, отобранные из культур в начале эксперимента, а также через 2 и 5 часов после культивирования в присутствии IPTG, анализировали при помощи SDS-PAGE с последующим окрашиванием геля Кумасси G250 или вестерн-блот гибридизацией. Оптимальные уровни продукции наблюдались в следующих штаммах: BL21 (DE3) - для Rnq1 и Sis1 $\Delta$ DD, NiCo21 (DE3) - для Sup35NM и его вариантов, Rosetta (DE3) - для Sis1.

### 2.7.2 Препаративная очистка белков

Для очистки дрожжевых прионогенных белков мы трансформировали клетки соответствующего штамма *E. coli* плазмидой для продукции целевого белка. Полученных трансформантов выращивали в среде 2TY с добавлением ампициллина до  $OD_{600} = 0.3$ , после чего добавляли IPTG до конечной концентрации 1мМ и инкубировали при оптимальных условиях для конкретного целевого белка. Для проведения хроматографической очистки белка в денатурирующих условиях к осажденным клеткам добавляли лизирующий буфер А, содержащий 20 мМ Трис-НСl (рН 8,0) и 8 М мочевины из расчета 3 мл буфера на 1 г клеток, и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После этого полученный лизат осветляли при помощи центрифугирования при скорости 30,000 g в течение 20 минут. Для проведения очистки использовали надосадочную фракцию.

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

Для очистки белков из клеток дрожжей *S. cerevisiae* клетки, трансформированные плазмидой для продукции соответствующего белка, выращивали при 30° С в среде SC (Kaiser *et al.*, 1994) без добавления урацила до  $OD_{600} = 2.0$ , после чего осаждали при помощи центрифугирования. Для выделения белка к осадку клеток добавляли лизирующий буфер Б с добавлением ингибиторов протеаз (Sigma) (20 мкл на 1 мл буфера). Буфер добавляли из расчёта 1 мл буфера на 1 г клеток. Лизис проводили с ис-

пользованием стеклянных шариков и гомогенизатора по стандартной процедуре (Drozdova *et al.*, 2020).

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

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

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

раживали при помощи жидкого азота, после чего сохраняли при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.7.3 Получение амилоидных фибрилл

При получении амилоидных фибрилл амилоидогенные белки, сохраненные в метаноле, осаждали при помощи центрифугирования, после чего высушивали осадок при помощи вакуумного концентратора (20 минут при скорости вращения 2000 об/мин). Полученный сухой осадок растворяли небольшим объемом (5-20 мкл) буфера, содержащим 6 М ГГХ, 20 мМ Tris-HCl, pH 8.0, а также 150 мМ NaCl. Концентрацию белка измеряли на основе спектра поглощения ультрафиолетового излучения при помощи прибора NanoDrop 2000 (ThermoFisher). Затем белок разводили буфером для получения фибрилл до необходимой конечной концентрации в буфере необходимого состава. Состав раствора для получения фибрилл был следующим: 150 мМ NaCl, 5 мМ  $\text{KPO}_4$  (pH = 7.4). Для фибриллизации Rnq1 буфер также содержал 4 М мочевины. Для проверки наличия детергент-устойчивых агрегатов в растворе проводили SDS-PAGE анализ проб до и после кипячения в присутствии SDS.

Для дополнительной проверки полученных SDS-устойчивых агрегатов оценивали связывание агрегатов с амилоид-специфическим красителем тиофлавином Т. Для проведения такого анализа 100 мкл препарата белка смешивали с 5 мкл раствора тиофлавина Т (2,5 мМ в 5 мМ  $\text{KPO}_4$  pH = 7.4). Спектр флуоресценции детектировали при помощи системы CLARIOstar plus (BMG Labtech).

### 2.7.4 Оценка активности молекулярных шаперонов *in vitro*

Для оценки активности очищенных дрожжевых шаперонов использовали методику, основанную на восстановлении активности денатурированной светлячковой люциферазы (Glover, Lindquist, 1998). Рекombинантную люциферазу светлячка (abcam, #ab100961) растворяли в реакционном буфере (25 мМ Tris-HCl pH 7.6, 50 мМ KCl, 8 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 8 мМ дитиотрепто-

ла (ДТТ), 0,1 мМ ЭДТА, 10% глицерина, 0.25% Triton X-100) (модифицировано из (Schumacher *et al.*, 1996) и разводили мочевиной до конечной концентрации люциферазы 10 мкМ и конечной концентрации мочевины 4 М. Денатурированный таким образом фермент разводили в 100 раз реакционным буфером, содержащим соответствующую комбинацию очищенных дрожжевых шаперонов (использованные концентрации шаперонов - 1  $\mu$ М Hsp40 и 1  $\mu$ М Hsp70). Смесь агрегатов люциферазы и шаперонов инкубировали в течение 60 минут при 26 ° С. Активность люциферазы измеряли при помощи набора реактивов Luciferase Assay System (Promega, #E1500) и системы CLARIOstar Plus (BMG Labtech). Измерение интенсивности люминесценции производили в 3 независимых технических повторностях.

## 2.8. Электронная микроскопия

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

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

## 2.9. Анализ связывания шаперонов с фибриллами

Анализ взаимодействия шаперонов с фибриллами проводили по разработанной нами методике (Barbitoff *et al.*, 2020). На первом этапе раствор, содержащий полученные *in vitro* амилоидные фибриллы соответствующе-

го белка, центрифугировали в течение 30 минут при скорости 14000 g, после чего удаляли буфер и растворяли осадок в 50-100 мкл реакционного буфера 20 mM Tris-HCl (pH = 8.0), 200 mM NaCl, 5% глицерина, 5 mM БМЭ, 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Krzewska, Melki, 2006). После этого полученный раствор фибрилл в высокой концентрации смешивали с очищенными шаперонами в объеме 50 мкл; конечная концентрация фибрилл составляла от 4 до 40 μM, концентрация шаперонов - от 1 до 4 μM в зависимости от эксперимента (см. главу 3). Для экспериментов с добавлением Hsp70 и Hsp104 в смесь также добавляли 5 mM АТФ или 5 mM негидролизуемого аналога АТФ, АМФ-ФНФ. В отдельных экспериментах также использовали 5 mM ГТФ и АТФ-регенерирующую систему (100 мкг/мл креатинфосфокиназы (Sigma), 10 mM креатинфосфата). Смесь шаперонов и фибрилл в реакционном буфере инкубировали в течение 1 часа с перемешиванием при комнатной температуре, после чего фракционировали смесь центрифугированием скорости 14000 об/мин в течение 20 минут. Надосадочную фракцию отбирали в отдельную микропробирку, полученный осадок ресуспендировали в аналогичном объеме реакционного буфера. Распределение белков по фракциям анализировали при помощи SDS-PAGE. Каждый эксперимент проводили как минимум в 3 технических повторностях.

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

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

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

, где  $[F]$  - концентрация белка в составе фибрилл, а  $K_D$  - оцениваемая константа диссоциации (Motulsky, Neubig, 2010),  $a$  - поправочный коэффициент, отражающий ошибку метода (фоновый уровень осаждения целевого

белка). Концентрацию белка в составе фибрилл ( $[F]$ ) оценивали по соотношению белка в надосадочной и осадочной фракциях при центрифугировании исходного препарата фибрилл.

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

## 2.10. Статистическая обработка данных

Статистический анализ производили с использованием языка программирования R (R Core Team, 2014), для визуализации данных использовали пакет ‘ggplot2’ (Wickham, 2016). Сравнение количественных показателей проводили с использованием критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Статистическое сравнение констант диссоциации проводили по  $t$ -критерию (определение статистики для сравнения регрессионных моделей дано в Clogg *et al.*, 1995). Поправку на множественные сравнения осуществляли по методу Бенджамини-Хохберга. Скрипты, использованные для анализа данных в работе, могут быть найдены по адресу: [https://github.com/mrbarbitoff/phd\\_2022](https://github.com/mrbarbitoff/phd_2022).

## Глава 3. Результаты

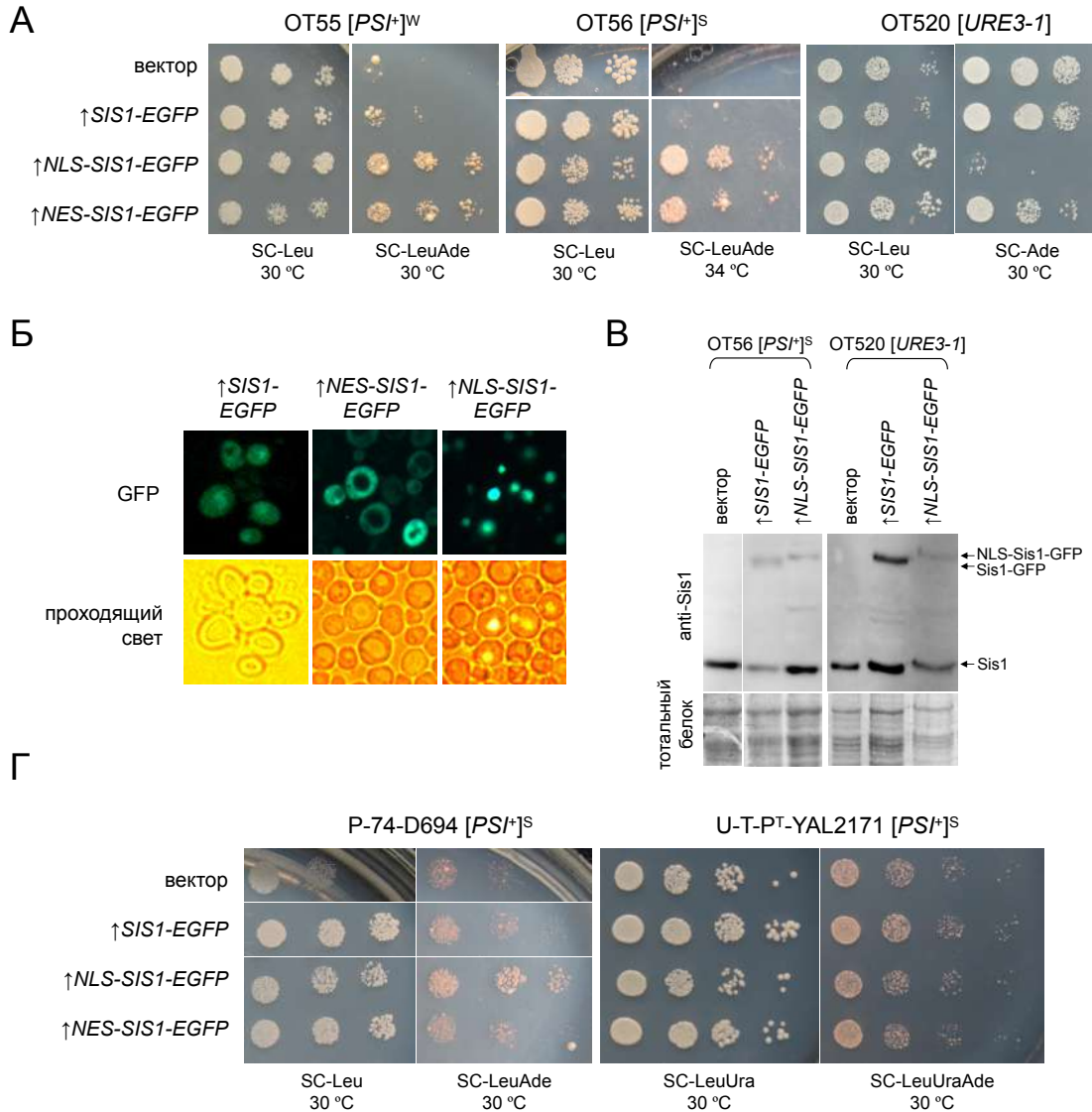
### 3.1. Характеристика дифференциальных эффектов *Sis1* на прионы дрожжей

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

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

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





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

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

Для доказательства того, что наблюдаемые эффекты связаны именно с изменением локализации Sis1, мы проверили локализацию белков NLS-Sis1-EGFP и NES-Sis1-EGFP в клетке дрожжей и не нашли отклонений от ранее описанного характера их локализации (Рис. 7Б). Более того, мы проверили уровень различных вариантов белка Sis1 в клетках, сверхэкспрессирующих *SIS1-EGFP* или *NLS-SIS1-EGFP*. Количество белка Sis1-EGFP и NLS-Sis1-EGFP не отличалось (Рис. 9Г), что свидетельствует о том, что эффекты химерной конструкции *NLS-SIS1* не связаны с увеличенной продукцией белка.

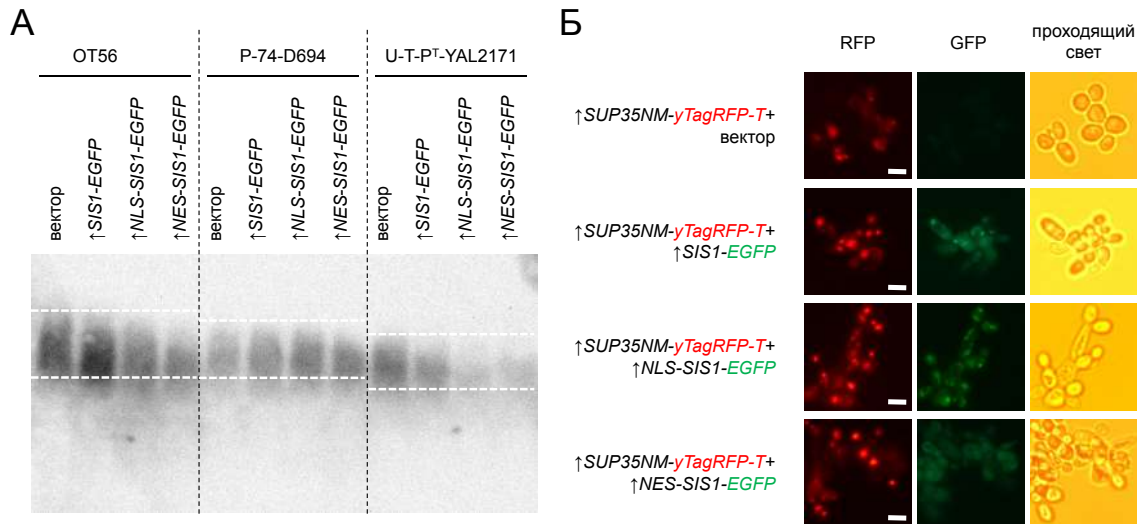
Далее мы проверили, воспроизводятся ли наблюдаемые эффекты NLS-Sis1 и NES-Sis1 в штаммах с иным генетическим фоном и вариантами [*PSI<sup>+</sup>*]. Для этого мы использовали штамм P-74-D694, содержащий другой сильный вариант приона [*PSI<sup>+</sup>*] и принадлежащий к Петергофским генетическим линиям,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

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

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

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

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



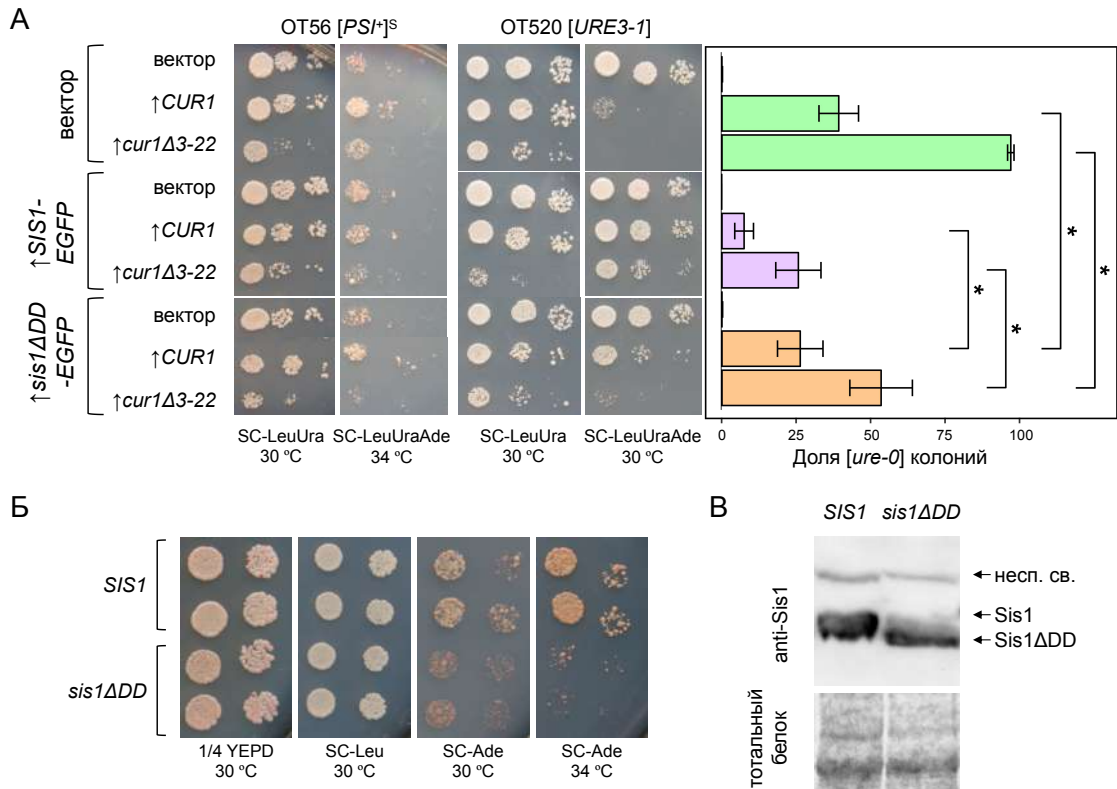
**Рисунок 8. Сверхпродукция NLS-Sis1 и NES-Sis1 не влияет на размер и морфологию агрегатов Sup35 А.** Результаты анализа размера агрегатов  $[PSI^+]$  в клетках штаммов OT56, P-74-D694 и U-T-P<sup>T</sup>-YAL2171, трансформированных вектором или конструкциями для сверхэкспрессии *SIS1-EGFP*, *NLS-SIS1-EGFP*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

### Sis1-EGFP.

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

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

Влияние релокализации Sis1 на прионы дрожжей, наблюдаемое при сверхпродукции фактора Cur1 или химерного белка NLS-Sis1, зависит от



**Рисунок 9. Делеция димеризационного домена *Sis1* ослабляет проявление [*PSI*<sup>+</sup>].** **А.** Слева, десятикратные серийные разведения репрезентативных клонов OT56 и OT520, трансформированных pRS426, pRS426-*CUR1* или pRS426-*cur1Δ3-22* в комбинации с вектором, pAG415ADH-*SIS1*-EGFP или pAG415ADH-*Sis1ΔDD*-EGFP. Справа, количественный анализ потери приона [*URE3*] при сверхэкспрессии вариантов *CUR1* и *SIS1* или *sis1ΔDD*. Показаны средние значения и 95 %-ные доверительные интервалы для средних. \*,  $p < 0.05$  согласно *U*-критерию Вилкоксона-Манна-Уитни. **Б.** Двадцатикратные серийные разведения репрезентативных клонов штаммов L-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 (*SIS1*) и LΔ-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 (*sis1ΔDD*). **В.** Сравнение уровней белка *Sis1* дикого типа и *Sis1ΔDD* в штаммах L-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 и LΔ-T-P<sup>T</sup>-YAL2171, соответственно, при помощи вестерн-блот гибридизации. В качестве контроля использовалась окраска тотального белка Кумасси R250. Детекцию целевого белка производили антителами SS2. «несп. св.» - неспецифическое связывание антител.

димеризации *Sis1* (Malinovska *et al.*, 2012). В соответствии с этими данными, дополнительная экспрессия варианта *Sis1* без димеризационного домена должна эффективно компенсировать влияние изменения локализации *Sis1*.

Для проверки этой гипотезы мы проанализировали фенотип клеток

штаммов OT56 [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>S</sup> и OT520 [*URE3*], экспрессирующих *CUR1* совместно с нормальным вариантом *SIS1* (*SIS1-EGFP*) и вариантом с делецией С-терминального димеризационного домена (*sis1ΔDD-EGFP*). Вопреки ожиданию, дополнительная экспрессия *sis1ΔDD-EGFP* менее эффективно компенсировала эффекты сверхпродукции Cur1 как на [*PSI*<sup>+</sup>], так и на [*URE3*] (Рис. 9А). Так, дополнительная экспрессия полноразмерного варианта *SIS1-EGFP* снижала частоту потери приона [*URE3*] в клетках, сверхпродуцирующих протеолитически стабильный вариант Cur1 Δ3-22, с 97.2% до 25.7%. В то же время, дополнительная сверхпродукция *sis1ΔDD-EGFP* приводила к менее выраженной компенсации влияния Cur1 Δ3-22 (частота потери [*URE3*] составляла 53.5%).

Меньшая способность *Sis1ΔDD* компенсировать эффекты релокализации *Sis1* на прионы может объясняться тем, что такой вариант менее эффективно способствует фрагментации прионных агрегатов в клетке. В соответствии с этой гипотезой, делеция димеризационного домена дестабилизирует [*URE3*] (Reidy *et al.*, 2014). В то же время, негативное влияние делеции димеризационного домена на [*PSI*<sup>+</sup>] ранее не было продемонстрировано. Для проверки того, может ли делеция димеризационного домена *Sis1* ослаблять фенотипическое проявление [*PSI*<sup>+</sup>], нами был сконструирован штамм, несущий *sis1ΔDD* на плазмиде в качестве единственного эндогенного источника *Sis1* (LΔ-T-P<sup>T</sup>-YAL2171). Сравнение эффективности нонсенс-супрессии в этом штамме со штаммом L-T-P<sup>T</sup>-YAL2171, несущим полноразмерный вариант *SIS1*, подтвердило выраженное ослабление фенотипического проявления [*PSI*<sup>+</sup>] (Рис. 9Б). Различия в эффективности супрессии были значительно более очевидны при культивировании дрожжей в условиях повышенной температуры. Важно заметить, что различия в силе фенотипического проявления [*PSI*<sup>+</sup>] в штаммах L-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 и LΔ-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 не связаны с различным уровнем продукции белка (Рис. 9В).

Таким образом, мономерная форма не способна полностью компенсировать эффекты изменения внутриклеточной локализации *Sis1* на прионы

дрожжей. Это явление, наиболее вероятно, связано с тем, что такая форма имеет сниженную активность в поддержании прионов дрожжей.

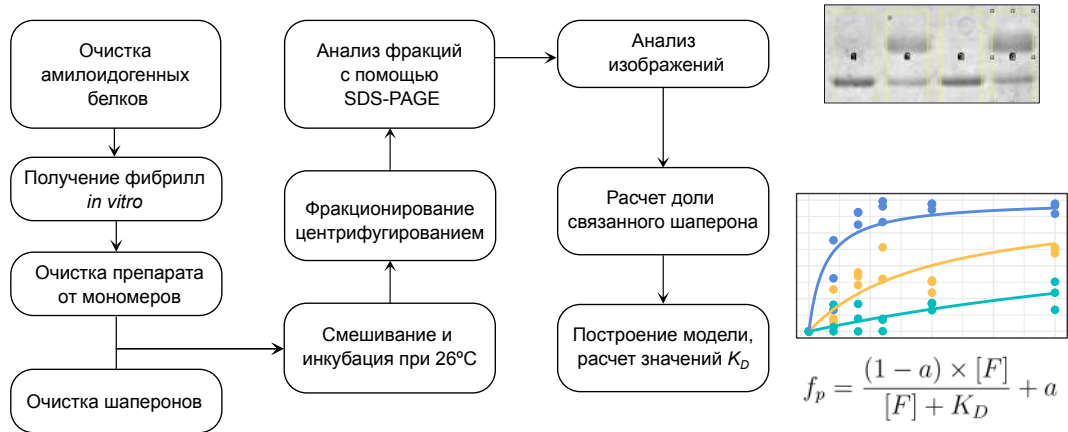
### **3.2. Анализ связывания Hsp40 с амилоидными фибриллами**

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

Для проверки этой гипотезы нами был разработан метод для количественной оценки эффективности связывания шаперонов с амилоидными фибриллами (Рис. 10). Предложенный нами метод основан на фракционировании смеси очищенных молекулярных шаперонов с фибриллами в системе *in vitro* при помощи центрифугирования. При центрифугировании амилоидные фибриллы вместе со связанными молекулярными шаперонами локализуются в осадочной фракции, что позволяет рассчитать долю связанных молекул шаперона при анализе осадочной и надосадочной фракций при помощи SDS-PAGE.

#### **3.2.1 Подготовка препаратов очищенных шаперонов и амилоидных фибрилл**

Для изучения параметров взаимодействия шаперонов с амилоидными фибриллами нами был получен необходимый набор очищенных дрожжевых шаперонов и фибрилл дрожжевых прионогенных белков. Ввиду сложностей с получением амилоидных фибрилл Ure2 мы сосредоточились на

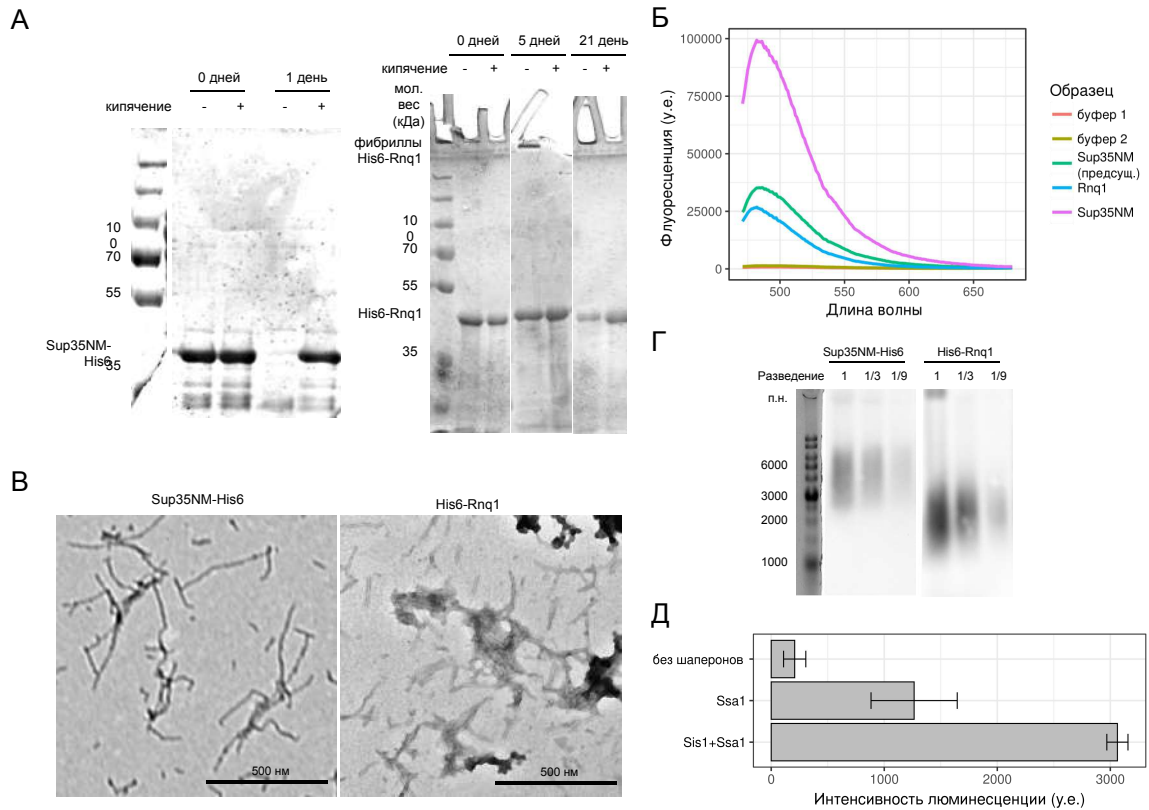


**Рисунок 10. Количественная оценка констант связывания Hsp40 с амилоидными фибриллами.** Показана схема проведения эксперимента для анализа эффективности связывания шаперона и амилоидных агрегатами.

работе с фибриллами двух белков — Sup35NM и Rnq1, структурного детерминанта приона  $[PIN^+]$ . Прион  $[PIN^+]$  характеризуется значительно более выраженной зависимостью от внутриклеточного уровня Sis1 по сравнению с  $[PSI^+]$  (Higurashi *et al.*, 2008).

Мы получили амилоидные фибриллы очищенных белков Sup35NM-His<sub>6</sub> и His<sub>6</sub>-Rnq1. Sup35NM характеризовался значительно более эффективным формированием агрегатов уже через сутки инкубации (Рис. 11А), в то время как формирование амилоида Rnq1 занимало значительно более долгое время. Для проверки того, что полученные агрегаты характеризуются ожидаемыми структурными особенностями амилоидов, мы проверили связывание агрегатов с амилоид-специфическим красителем тиофлавином Т. Данный анализ подтвердил, что агрегаты и Sup35NM, и Rnq1 взаимодействуют с тиофлавином Т, что можно наблюдать по характерному изменению спектра флуоресценции (Рис. 11Б). Далее мы проанализировали морфологию полученных агрегатов при помощи ТЭМ с негативным контрастированием. На электронных микрофотографиях наблюдались характерные фибриллярные структуры, медианная длина которых составляла 347 нм в случае Sup35NM и 146 нм в случае Rnq1 (Рис. 11В). Анализ препа-





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

ратов полученных фибрилл при помощи SDD-AGE также показал сходные различия в молекулярной массе агрегатов (Рис. 11Г), причем оцененный

по данным SDD-AGE молекулярный вес фибрилл хорошо соответствовал оценкам по данным ТЭМ (Drozdova *et al.*, 2020). На основе полученных результатов мы заключили, что полученные нами агрегаты Sup35NM и Rnq1 обладают характерным набором амилоидных свойств.

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

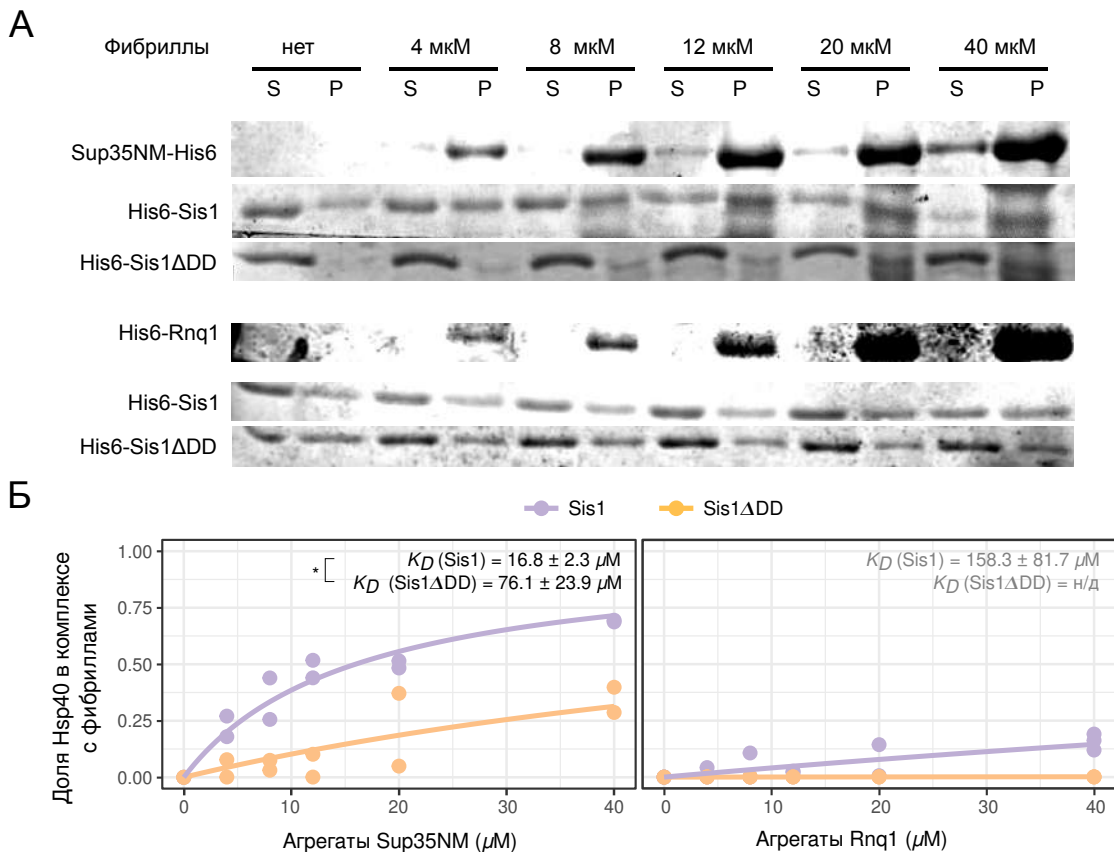
### **3.2.2 Sis1 эффективно взаимодействует с фибриллами Sup35NM, но не Rnq1**

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

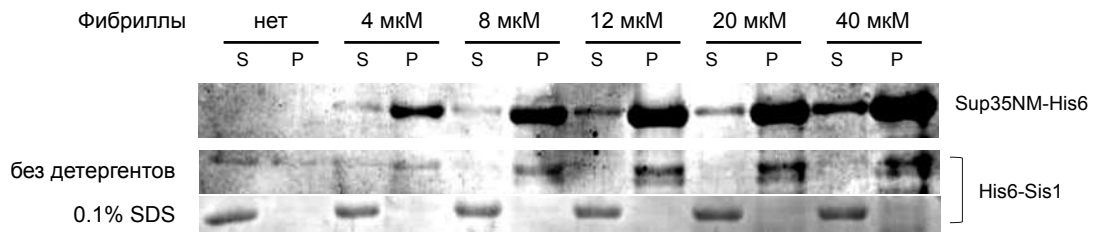
Мы обнаружили, что Sis1 эффективно связывается с фибриллами Sup35NM. Так, количество Sis1 в осадочной фракции превышало 50% уже при концентрации фибрилл в 20  $\mu$ M ( $K_D = 16.8 \pm 2.3 \mu$ M,  $p < 0.001$  согласно  $t$ -критерию). Напротив, взаимодействие с фибриллами Rnq1 было крайне слабым, а большая часть молекул шаперона оставалась в надосадочной фракции даже при концентрации фибрилл 40  $\mu$ M (Рис. 12) ( $K_D = 158.3 \pm 81.7 \mu$ M,  $p > 0.05$ ). При этом делеция димеризационного домена Sis1 приводила к ослаблению его взаимодействия с амилоидными агрегатами Sup35NM ( $K_D = 76.1 \pm 23.9 \mu$ M,  $p$ -значение при сравнении с полнораз-

мерным белком  $< 0.05$ ). Взаимодействие варианта  $Sis1\Delta DD$  с фибриллами  $Rnq1$  не наблюдалось в наших экспериментах (Рис. 12).

Высокая эффективность связывания  $Sis1$  с фибриллами  $Sup35NM$  может свидетельствовать о формировании детергент-устойчивых комплексов шаперона с фибриллой. Свидетельства такого детергент-устойчивого



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



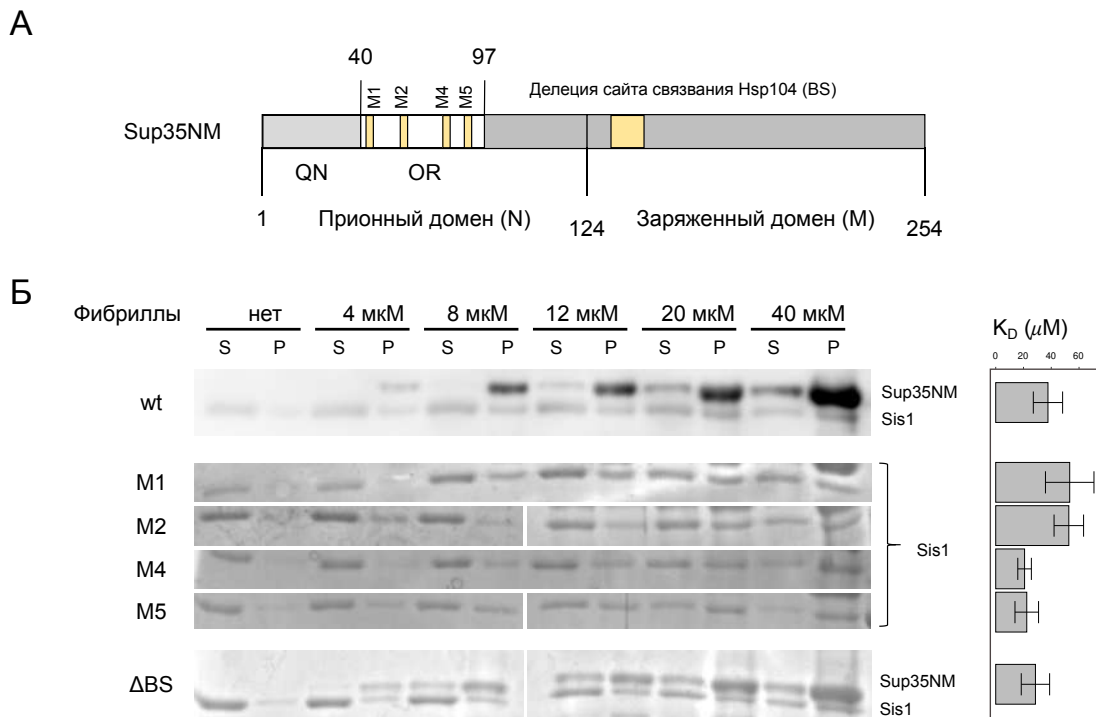
**Рисунок 13. Комплексы Sis1 с фибриллами Sup35NM не устойчивы к обработке детергентами.** Распределение белков по надосадочной и осадочной фракции при центрифугировании смеси Sis1 с фибриллами Sup35NM без предварительного добавления детергентов или с добавлением 0,1% SDS. S — надосадочная фракция, супернатант;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

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

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

На следующем этапе работы мы проанализировали влияние мутаций в N- и M-доменах Sup35 на взаимодействие Sis1 с фибриллами Sup35NM. Для исследования нами были использованы 5 мутаций (Рис. 14А). Четыре из использованных мутаций локализируются в олигопептидных повторах в N-домене Sup35 (*sup35-M1*, *sup35-M2*, *sup35-M4*, *sup35-M5*) (Bondarev *et al.*, 2013). Эти мутации представляют собой замены полярных остат-

ков на заряженные в 1-ом, 2-ом, 4-ом и 5-ом олигопептидных повторах, соответственно. Замена аллели *SUP35* дикого типа у дрожжей на мутантные аллели *sup35-M1* и *sup35-M2* приводит к потере приона [*PSI*<sup>+</sup>], в то время как мутации *sup35-M4* и *sup35-M5* способны поддерживать предсуществующий вариант приона (Bondarev *et al.*, 2013). Все 4 мутации по своей природе должны значительно изменять укладку мономера в составе фибриллы. Также нами были получены амилоидные фибриллы варианта Sup35NM с делецией участка 131—140 а.к.о. в М-домене, соответствующего сайту связывания Hsp104 (Helsen, Glover, 2012). Схожая делеция,



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

**Таблица 6.** Значения  $K_D$  комплексов Sis1 с фибриллами вариантов Sup35NM

Вариант	$K_D$	p-значение <sup>†</sup>
Sup35NM	$37.1 \pm 8.8$	
Sup35NM-M1	$40.8 \pm 13.9$	0.22
Sup35NM-M2	$57.3 \pm 9.8$	0.07
Sup35NM-M4	$24.1 \pm 4.2$	0.10
Sup35NM-M5	$26.1 \pm 7.3$	0.17
Sup35NM $\Delta$ BS	$32.1 \pm 9.1$	0.35

<sup>†</sup> - p-значение согласно *t*-критерию при сравнении  $K_D$  для фибрилл мутантного варианта и фибрилл белка дикого типа.

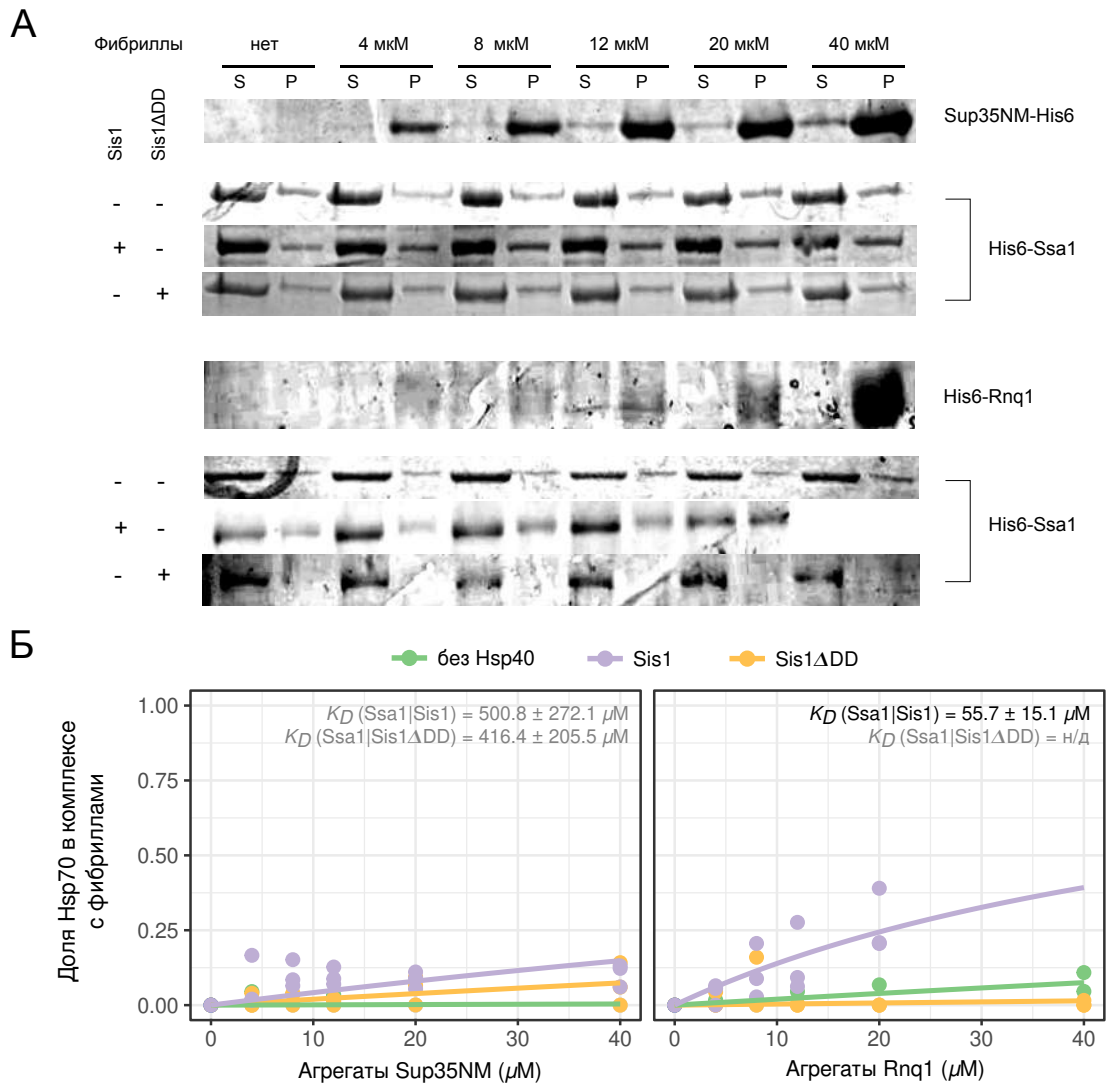
затрагивающая участок 129—148 а.к.о., препятствует излечиванию [*PSI*<sup>+</sup>] сверхэкспрессией *HSP104*.

Анализ связывания Sis1 с фибриллами, сформированными вышеуказанными вариантами Sup35NM, производили по методике, аналогичной использованной для оценки  $K_D$  Sis1 с фибриллами Sup35NM дикого типа. Мы обнаружили, что эффективность взаимодействия Sis1 с фибриллами была сходной для всех изученных мутантных вариантов Sup35NM (Рис. 14Б), а оцененные при помощи нашего метода значения  $K_D$  не демонстрировали значимых различий (значения  $K_D$  приведены в таблице 6).

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

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

Далее мы изучили влияние обнаруженных различий в связывании Hsp40 с амилоидными фибриллами на эффективность привлечения к фибриллам молекулярных шаперонов других групп (Hsp70 и Hsp104). Сначала мы изучили формирование комплексов Hsp70-Ssa1 с фибриллами Sup35NM и Rnq1 без добавления Hsp40 и в присутствии Sis1 или Sis1 $\Delta$ DD. Для этого мы смешивали Ssa1 и Hsp40 в концентрации 4  $\mu$ M с фибриллами, варьируя их концентрацию от 4 до 40  $\mu$ M. Анализ проводили в присутствии 5 mM АТФ и АТФ-регенерирующей системы (100 мкг/мл креатинфосфо-



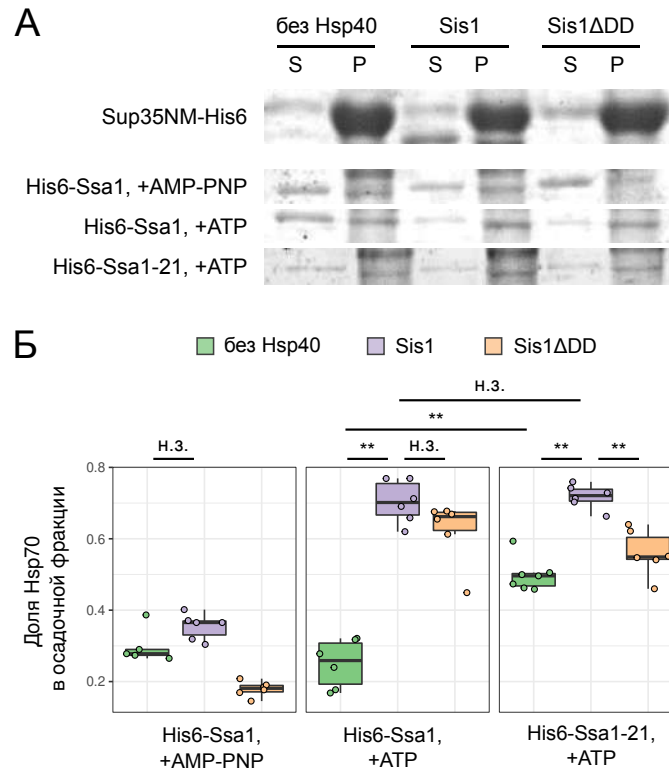
**Рисунок 15. Эффективное связывание Ssa1 наблюдается только с фибриллами Rnq1 в присутствии полноразмерного Sis1.** А. Распределение Hsp70-Ssa1 по надосадочной и осадочной фракциям при добавлении в смесь амилоидных фибрилл соответствующего белка в указанной концентрации и указанных Hsp40. Приведена одна репрезентативная техническая повторность для каждой комбинации белков. Показаны результаты анализа SDS-PAGE с окрашиванием геля Кумасси R250. Вверху, Sup35NM; внизу, Rnq1. Б. Результаты количественного анализа экспериментов, представленных на (А). Приведены доли связанного Hsp70-Ssa1 после поправки на уровень осаждения без добавления фибрилл. Каждая точка соответствует одной повторности эксперимента с указанными концентрациями белков. Кривые соответствуют оптимальным регрессионным моделям для каждого из случаев. Значения  $K_D$  приведены для комплексов Ssa1 с фибриллами в присутствии Sis1 или Sis1ΔDD. Комбинации, для которых полученные значения  $K_D$  недостоверны ( $p > 0.05$ ) отмечены серым шрифтом.

киназы и 10 мМ креатинфосфата) для поддержания уровня АТФ в пробе. Анализ доли связанного Ssa1 показал, что эффективное взаимодействие наблюдается только с фибриллами Rnq1 в присутствии полноразмерного варианта Sis1 (Рис. 15), ( $K_D = 55.7 \pm 15.1 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ ). Делеция димеризационного домена Sis1 приводила к полной потере способности привлекать Ssa1 к фибриллам Rnq1 (Рис. 15А). При анализе привлечения Ssa1 к фибриллам Sup35NM мы не наблюдали достоверного связывания ни в одном из случаев ( $p > 0.05$ ) несмотря на незначительное увеличение количества Ssa1 в осадочной фракции при большой концентрации фибрилл (Рис. 15).

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

Мы также исследовали привлечение Hsp70 с агрегатами Sup35NM при





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

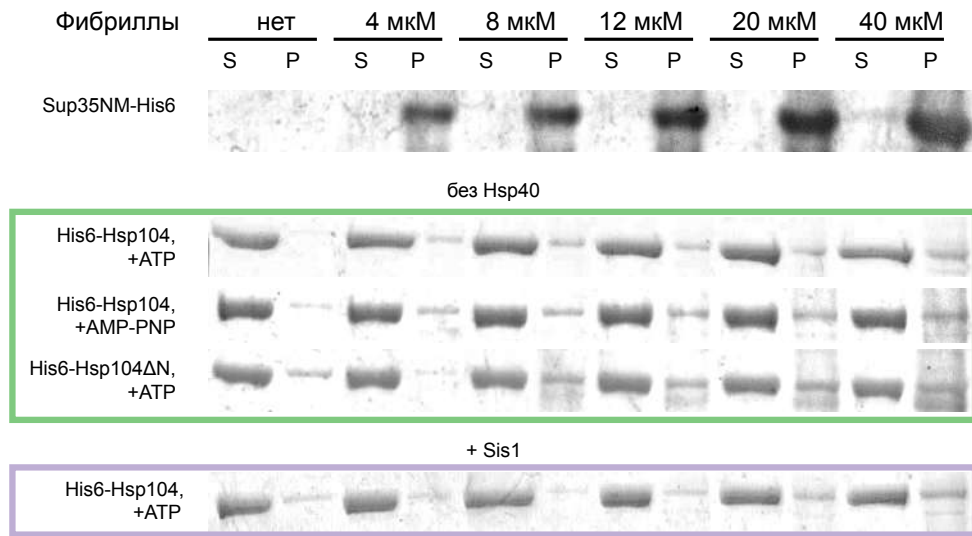
использовании мутантного варианта Ssa1, Ssa1-21. Мутация *SSA1-21* характеризуется доминантно негативным эффектом на поддержание некоторых вариантов приона [*PSI*<sup>+</sup>] (Jung *et al.*, 2000; Jones, Masison, 2003; Barbitoff *et al.*, 2022). Мутантный белок Ssa1-21 также связывался с фибриллами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

21 к агрегатам Sup35NM при наличии в смеси Sis1 $\Delta$ DD была достоверно ниже, чем при добавлении полноразмерного Sis1 ( $p < 0.01$ ).

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют об отсутствии прямой взаимосвязи между связыванием Hsp40 с фибриллами и привлечением к ним Hsp70. Так, Sis1 эффективно формирует комплексы с Sup35NM и характеризуется более низкой эффективностью рекрутирования Hsp70 к агрегатам Sup35NM по сравнению с агрегатами Rnq1, несмотря на значительно более низкое сродство к этим агрегатам. В то же время, делеция димеризационного домена Sis1 ослабляет его взаимодействие с фибриллами Sup35NM, но не влияет на рекрутирование Hsp70.

### 3.3.2 Sis1 не стимулирует прямое взаимодействие Hsp104 с агрегатами

Положительное влияние Sis1 на излечение [ $PSI^+$ ] при сверхэкспрессии *HSP104* позволяет предположить, что формирование прочных комплексов Sis1 с амилоидными фибриллами Sup35 может стимулировать взаимодействие Hsp104 с агрегатами независимо от Hsp70. Для проверки этой гипотезы мы также проанализировали формирование комплексов Hsp104 в концентрации 2  $\mu$ M с амилоидными агрегатами Sup35NM, варьируя их концентрацию от 4 до 40  $\mu$ M. Мы наблюдали незначительное увеличение количества Hsp104 в осадочной фракции при большом избытке фибрилл Sup35NM (Рис. 17), причем это увеличение наблюдалось как в присутствии АТФ, так и в присутствии АМФ-ФНФ. Аналогичная картина наблюдалась и для варианта Hsp104 $\Delta$ N, который неспособен излечивать [ $PSI^+$ ] при сверхэкспрессии (Hung, Masison, 2006). Количественный анализ полученных данных, однако, не выявил достоверного связывания ни в одном из случаев ( $p > 0.05$ ). Добавление Sis1 в смесь никак не сказывалось на взаимодействии Hsp104 с агрегатами (Рис. 17). Полученные результаты свидетельствуют о том, что Hsp104 не формирует стабильных комплексов с фибриллами Sup35NM ни в присутствии, ни в отсутствии Sis1; наиболее вероятно, что для связывания необходимы другие кофакторы. Необходимо



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

заметить, однако, что полученные данные могут объясняться сниженной функциональной активностью рекомбинантного Hsp104 ввиду наличия у него N-концевой His<sub>6</sub>-метки. Таким образом, данный вопрос требует дальнейшего исследования.

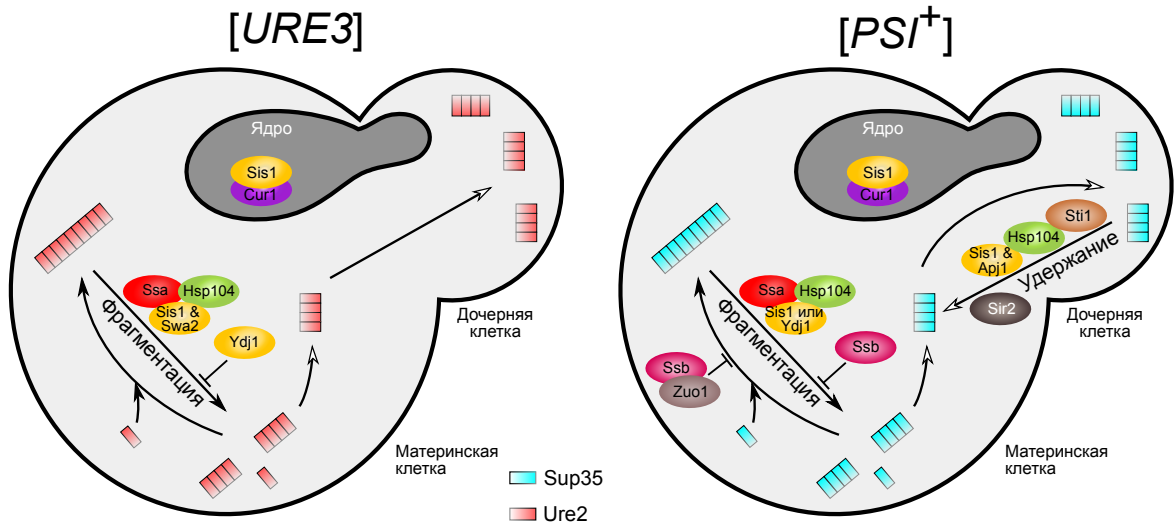
## Глава 4. Обсуждение

### 4.1. Роль Hsp40 в жизненном цикле прионов дрожжей

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

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

В совокупности с описанными нами ранее разнонаправленными эффектами Hsp40-Ydj1 и фактора Cur1 на прионы [*PSI*<sup>+</sup>] и [*URE3*], а также существующими в литературе описаниями эффектов иных шаперонов



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

на прионы дрожжей, полученные данные позволяют нам сформулировать уточненную модель поддержания различных прионов дрожжей (Рис. 18). Так, поддержание приона [URE3] строго зависит от высоких уровней Sis1, а также от активности кошаперона Swa2. Эти белки критически важны для фрагментации фибрилл Ure2 и формирования прионных семян. Ydj1, напротив, препятствует фрагментации агрегатов [URE3], вследствие чего его сверхэкспрессия приводит к изгнанию этого приона (Moriyama *et al.*, 2000; Sharma, Masison, 2008b). Для приона [PSI<sup>+</sup>], напротив, и Sis1, и Ydj1, вероятнее всего, способствуют фрагментации агрегатов; это предположение подтверждается как данными, полученными нами *in vivo* (Barbitoff *et al.*, 2017), так и результатами экспериментов в системе *in vitro* (Shorter, Lindquist, 2008). В то же время, в отличие от [URE3], поддержание [PSI<sup>+</sup>] зависит от второго Hsp104-опосредованного процесса, удержания прионных семян в материнской клетке. Этот процесс способствует изгнанию приона при сверхпродукции Hsp104. Известно, что сверхпродукция Sis1

способствует этому процессу (Kryndushkin *et al.*, 2002). Помимо Sis1, в этом процессе играют важную роль и другие кофакторы, такие как Hsp40-Apj1, Sti1 и Sir2 (Astor *et al.*, 2018; Gorkovskiy *et al.*, 2017; Howie *et al.*, 2019). Таким образом, изменение внутриклеточной локализации Sis1 и падение его цитозольной концентрации может в большей степени сказываться на удержании семян в материнской клетке ввиду того, что для протекания этого процесса необходим Sis1, а Ydj1 не способен выполнять эту функцию. Напротив, фрагментация агрегатов может быть менее зависима от локализации Sis1 за счет выполнения его функции иными белками группы Hsp40.

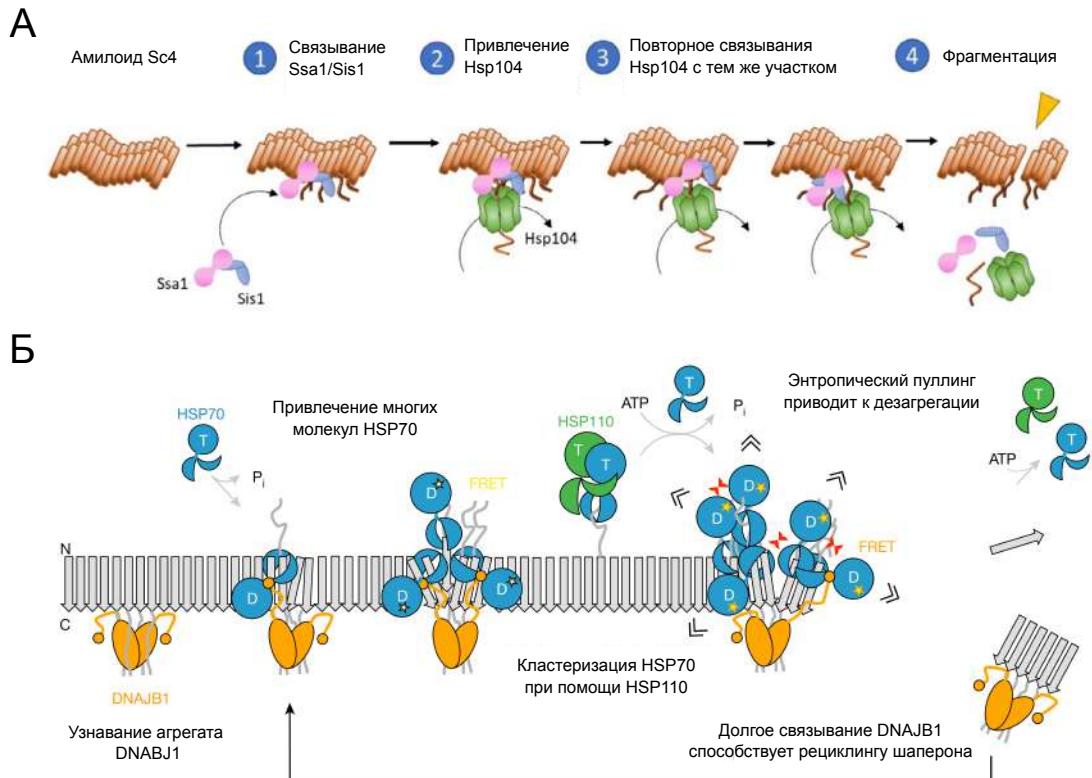
Стоит заметить, что предложенная нами модель основывается на наличии независимого механизма удержания семян в материнской клетке. Этот механизм, как было сказано ранее, наиболее активно проявляется при сверхэкспрессии *HSP104*, однако работает и при нормальных его уровнях (Gorkovskiy *et al.*, 2017).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

## 4.2. Молекулярные механизмы дезагрегации амилоидов

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

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

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



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

ции агрегата является совместное связывание комплекса Sis1/Ssa1 с фибриллой с последующим многократным привлечением Hsp104 к одному и тому же участку фибриллы (Рис. 19А).

Данные, полученные нами в ходе исследования, противоречат результатам из вышеуказанных работ. Так, мы наблюдали эффективное взаимодействие Sis1 с амилоидными фибриллами Sup35NM без участия каких-либо кофакторов (Рис. 12, 14, Barbitoff *et al.*, 2020). Несовпадение наших результатов с литературными данными может быть вызвано двумя основными причинами: во-первых, в работе Krzewska, Melki, 2006 были использованы агрегаты полноразмерного белка Sup35, а не его фрагмента Sup35NM. В работе Nakagawa *et al.*, 2022 был использован именно Sup35NM, однако фибриллы типа Sc4 были получены при иных темпера-



турных условиях по сравнению с нашими экспериментами. В то же время, авторы не приводят данные о взаимодействии Sis1 с другим типом фибрилл Sup35NM, использованном в их исследовании — Sc37.

Взаимодействие Sis1 с агрегатами Sup35NM, схожее с наблюдаемым в наших экспериментах, было отмечено в работе лаборатории Линдквист (Shorter, Lindquist, 2008). В этом исследовании Sis1 демонстрировал способность взаимодействовать как с олигомерной, так и с фибриллярной формой Sup35NM. Первичность взаимодействия Hsp40 с агрегатом в нормальном цикле дезагрегации амилоида также показана для системы дезагрегации агрегатов  $\alpha$ -синуклеина (Wentink *et al.*, 2020). В этом исследовании была предложена модель дезагрегации амилоидных фибрилл в клетках млекопитающих, опосредованной исключительно системой Hsp40/Hsp70 (Рис. 18Б). Согласно этой модели, ключевую роль в фрагментации фибриллы играет кластеризация молекул Hsp70 в одном участке амилоидной фибриллы. Сам процесс дезагрегации, по мнению авторов, обусловлен механизмом ”энтропического давления”(entropic pulling) — многочисленных разнонаправленных движений кластеризованных молекул Hsp70. Важную роль в образовании кластеров играет также и фактор обмена нуклеотидов, Hsp110. Помимо прочего, в данной модели предполагается, что долговременное связывание Hsp40-DNAJB1 с фибриллой может способствовать рециклингу шаперонов.

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

протофиламентов в составе агрегата.

### 4.3. Функциональное значение связывания Sis1 с агрегатами

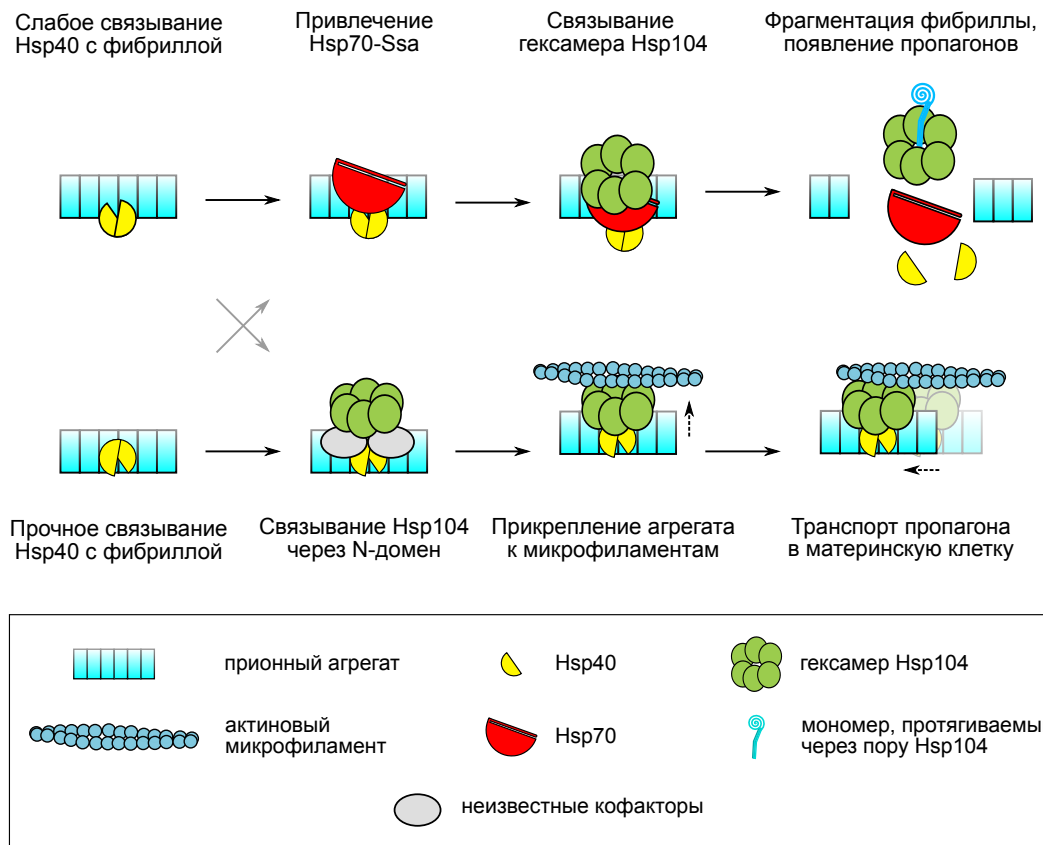
Несмотря на вышеописанные особенности, мы наблюдали устойчивые и воспроизводимые различия в эффективности связывания Sis1 с фибриллами разных белков и в эффективности привлечения к ним Hsp70 (Рис. 12, 15, 16, Barbitoff *et al.*, 2020). Как уже было замечено ранее, мы не наблюдали четкой взаимосвязи между связыванием Hsp40 с фибриллами и эффективностью привлечения к ним Ssa1 (Рис. 20). Эти результаты могут говорить о том, что процесс фрагментации амилоидных фибрилл в клетках дрожжей может начинаться как с первичного связывания Hsp40 с фибриллой, так и с совместного связывания с ней комплекса Hsp40/Hsp70. Заметим, что эффективность привлечения Ssa1 к фибриллам в наших экспериментах относительно точно соответствовала наблюдаемым эффектам на поддержание приона — делеция димеризационного домена Sis1 снижала эффективность рекрутирования Ssa1 (Рис. 15, 16), что согласуется с

Hsp40	Прион/белок	Связывание с фибрилой	Изгнание $\uparrow$ HSP104	Привлечение Ssa1	Поддержание приона
Sis1	[PSI <sup>+</sup> ]/Sup35NM				
Sis1 $\Delta$ DD	[PSI <sup>+</sup> ]/Sup35NM		**	*	**
Sis1	[RNQ <sup>+</sup> ]/Rnq1				
Sis1 $\Delta$ DD	[RNQ <sup>+</sup> ]/Rnq1				**

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

ослаблением фенотипа [*PSI*<sup>+</sup>] и некоторых вариантов [*PIN*<sup>+</sup>] (Stein, True, 2014). В то же время, наблюдаемые нами различия в эффективности связывания *Sis1* с фибриллой хорошо соотносятся с возможностью изгнания соответствующего приона сверхэкспрессией *HSP104* (Рис. 20). Можно предложить два альтернативных объяснения этому феномену: во-первых, можно предположить, что стабильное взаимодействие *Hsp40* с агрегатом способствует внутриклеточной сортировке комплекса *Hsp40*-фибрилла; во-вторых, высокоаффинное связывание *Sis1* с фибриллой может модифицировать активность других компонентов шаперонной системы и изменять протекание цикла дезагрегации.

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



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

Hsp40 и привлечением Hsp70 к фибриллам (Рис. 15, 20) можно предположить, что сила связывания Hsp40 не предопределяет судьбу конкретного амилоидного агрегата, но способствует протеканию процесса по одному из путей.

Литературные данные свидетельствуют о том, что важную роль в Hsp104-опосредованном удержании прионных семян может играть актиновый цитоскелет. Делеции генов, кодирующих актин-связывающий белок Lsb2 и деацетилазу Sir2, заметно сказываются на дестабилизации  $[PSI^+]$  при тепловом шоке (Howie *et al.*, 2019). Известно также, что взаимодействие Hsp104 и актинового цитоскелета принимает активное уча-

ствие в контроле асимметричной сегрегации белковых агрегатов (Tessarz *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010). Таким образом, процесс удержания прионных семян также может включать в себя присоединение агрегатов в комплексе с Hsp104 к актиновому цитоскелету и транспорт в материнскую клетку, опосредованный полярисомой.

Можно высказать целый ряд предположений, объясняющих необходимость наличия в клетке двух независимых процессов, опосредованных системой Hsp40/Hsp70/Hsp104. Такая система может использоваться клеткой для дифференциального распределения и сортировки патологических и функциональных белковых агрегатов. Например, удержание агрегатов в клетке в ходе ее деления может препятствовать распространению патологических белковых агрегатов, снижая их отрицательное влияние на популяцию клеток или организм. В последние годы у человека был обнаружен ряд белков, которые могут служить кандидатами на роль Hsp104-подобной дезагрегазы (например, Ruvbl1/2 (Zaarur *et al.*, 2015) и Torsin A (Adam *et al.*, 2017)). Дальнейшие исследования в этой области позволят понять, распространяются ли модели Hsp104-опосредованного определения судьбы белкового агрегата на процессы, сопровождающие амилоидозы человека и млекопитающих.

## Глава 5. Выводы

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

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

### Список литературы

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

9. Astor M. T., Kamiya E., Sporn Z. A., Berger S. E., Hines J. K. Variant-specific and reciprocal Hsp40 functions in Hsp104-mediated prion elimination // *Molecular Microbiology*. 2018. Vol. 109. P. 41–62.
10. Balch W. E., Morimoto R. I., Dillin A., Kelly J. W. Adapting proteostasis for disease intervention // *Science*. 2008. Vol. 319, no. 5865. P. 916–919.
11. Barbitoff Y. A., Matveenko A. G., Moskalenko S. E., Zemlyanko O. M., Newnam G. P., Patel A. X., Chernova T. A., Chernoff Y. O., Zhouravleva G. A. To CURE or not to CURE? Differential effects of the chaperone sorting factor Cur1 on yeast prions are mediated by the chaperone Sis1 // *Molecular Microbiology*. 2017. Vol. 105, no. 2. P. 242–257.
12. Barbitoff Y. A., Matveenko A. G., Bondarev S. A., Maksiutenko E. M., Kulikova A. V., Zhouravleva G. A. Quantitative assessment of chaperone binding to amyloid aggregates identifies specificity of Hsp40 interaction with yeast prion fibrils // *FEMS Yeast Research*. 2020. Vol. 20, no. 4. foaa025.
13. Barbitoff Y. A., Matveenko A. G., Zhouravleva G. A. Differential interactions of molecular chaperones and yeast prions // *Journal of Fungi*. 2022. Vol. 8, no. 2. P. 1–18.
14. Bateman D. A., Wickner R. B. The  $[PSI^+]$  Prion Exists as a Dynamic Cloud of Variants // *PLoS Genetics*. 2013. Vol. 9, no. 1. P. 1–13.
15. Berger S. E., Nolte A. M., Kamiya E., Hines J. K. Three J-proteins impact Hsp104-mediated variant-specific prion elimination: a new critical role for a low-complexity domain // *Current Genetics*. 2020. Feb. Vol. 66, no. 1. P. 51–58.
16. Bertelsen E. B., Zhou H., Lowry D. F., Flynn G. C., Dahlquist F. W. Topology and dynamics of the 10 kDa C-terminal domain of DnaK in solution // *Protein Science*. 2008. Dec. Vol. 8, no. 2. P. 343–354.
17. Bondarev S. A., Shchepachev V. V., Kajava A. V., Zhouravleva G. A. Effect of charged residues in the N-domain of Sup35 protein on prion  $[PSI^+]$  stability and propagation // *Journal of Biological Chemistry*. 2013. Vol. 288, no. 40. P. 28503–28513.



18. Boorstein W. R., Ziegelhoffer T., Craig E. A. Molecular evolution of the *HSP70* multigene family. // *Journal of Molecular Evolution*. 1994. Vol. 38, no. 1. P. 1–17.
19. Brachmann A., Baxa U., Wickner R. B. Prion generation in vitro: amyloid of Ure2p is infectious. // *EMBO Journal*. 2005. Vol. 24, no. 17. P. 3082–3092.
20. Byrne K. P., Wolfe K. H. The Yeast Gene Order Browser: Combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species // *Genome Research*. 2005. Vol. 15. P. 1456–1461.
21. Chabelskaya S., Kiktev D., Inge-Vechtomov S., Philippe M., Zhouravleva G. Nonsense mutations in the essential gene *SUP35* of *Saccharomyces cerevisiae* are non-lethal. // *Molecular Genetics and Genomics*. 2004. Vol. 272, no. 3. P. 297–307.
22. Cheetham M. E., Caplan A. J. Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. // *Cell Stress & Chaperones*. 1998. Vol. 3, no. 1. P. 28–36.
23. Chernoff Y. O., Lindquist S. L., Ono B., Inge-Vechtomov S. G., Liebman S. W. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [*PSI*<sup>+</sup>]. // *Science*. 1995. Vol. 268, no. 5212. P. 880–884.
24. Chernoff Y. O., Newnam G. P., Kumar J., Allen K., Zink A. D. Evidence for a protein mutator in yeast: role of the Hsp70-related chaperone *ssb* in formation, stability, and toxicity of the [*PSI*] prion. // *Molecular and Cellular Biology*. 1999. Vol. 19, no. 12. P. 8103–12.
25. Chernoff Y. O., Kiktev D. A. Dual role of ribosome-associated chaperones in prion formation and propagation // *Current Genetics*. 2016. Vol. 62, no. 4. P. 677–685.
26. Chernova T. A., Wilkinson K. D., Chernoff Y. O. Physiological and environmental control of yeast prions. // *FEMS Microbiology reviews*. 2014. Vol. 38, no. 2. P. 326–44.

27. Christianson T. W., Sikorski R. S., Dante M., Shero J. H., Hieter P. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. // *Gene*. 1992. Vol. 110, no. 1. P. 119–122.
28. Clogg C. C., Petkova E., Haritou A. Statistical methods for comparing regression coefficients between models. // *American Journal of Sociology*. US, 1995. Vol. 100, no. 5. P. 1261–1293.
29. Cox B. S.  $\Psi$ , A cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast // *Heredity*. 1965. Vol. 20, no. 4. P. 505–521.
30. Cox B., Tuite M. The life of [PSI] // *Current Genetics*. 2018. Vol. 64, no. 1. P. 1–8.
31. Craig E. A., Marszalek J. How do J-proteins get Hsp70 to do so many different things? // *Trends in Biochemical Sciences*. 2017. Vol. 42, no. 5. P. 355–368.
32. Cranz-Mileva S., Imkamp F., Kolygo K., Maglica Ž., Kress W., Weber-Ban E. The Flexible Attachment of the N-Domains to the ClpA Ring Body Allows their Use On Demand // *Journal of Molecular Biology*. 2008. Vol. 378, no. 2. P. 412–424.
33. Crow E. T., Li L. Newly identified prions in budding yeast, and their possible functions // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2011. Vol. 22, no. 5. P. 452–459.
34. DePace A. H., Santoso A., Hillner P., Weissman J. S. A critical role for amino-terminal glutamine/asparagine repeats in the formation and propagation of a yeast prion // *Cell*. 1998. Vol. 93, no. 7. P. 1241–1252.
35. Derdowski A., Sindi S. S., Klaips C. L. A size threshold limits prion transmission and establishes phenotypic diversity // *Science*. 2010. Vol. 330, no. 6004. P. 680–683.
36. Derkatch I. L., Chernoff Y. O., Kushnirov V. V., Inge-Vechtomov S. G., Liebman S. W. Genesis and variability of [PSI] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genetics*. 1996. Dec. Vol. 144, no. 4. P. 1375–1386.

37. Derkatch I. L., Bradley M. E., Zhou P., Chernoff Y. O., Liebman S. W. Genetic and environmental factors affecting the de novo appearance of the [PSI<sup>+</sup>] prion in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genetics*. 1997. Vol. 147, no. 2. P. 507–519.
38. Derkatch I. L., Bradley M. E., Hong J. Y., Liebman S. W. Prions affect the appearance of other prions: the story of [PIN<sup>+</sup>] // *Cell*. 2001. Vol. 106. P. 171–182.
39. Deville C., Carroni M., Franke K. B., Topf M., Bukau B., Mogk A., Saibil H. R. Structural pathway of regulated substrate transfer and threading through an Hsp100 disaggregase // *Science Advances*. 2017. Vol. 3, no. 8. e1701726.
40. Dobson C. M. Protein folding and misfolding // *Nature*. 2003. Vol. 426, no. 6968. P. 884–890.
41. Douglas P. M., Treusch S., Ren H.-Y., Halfmann R., Duennwald M. L., Lindquist S., Cyr D. M. Chaperone-dependent amyloid assembly protects cells from prion toxicity. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. Vol. 105, no. 20. P. 7206–7211.
42. Drozdova P. B., Tarasov O. V., Matveenko A. G., Radchenko E. A., Sopova J. V., Polev D. E., Inge-Vechtomov S. G., Dobrynin P. V. Genome Sequencing and Comparative Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Strains of the Peterhof Genetic Collection. // *PloS one*. 2016. Vol. 11, no. 5. e0154722.
43. Drozdova P. B., Barbitoff Y. A., Belousov M. V., Skitchenko R. K., Rogoza T. M., Leclercq J. Y., Kajava A. V., Matveenko A. G., Zhouravleva G. A., Bondarev S. A. Estimation of amyloid aggregate sizes with semi-denaturing detergent agarose gel electrophoresis and its limitations // *Prion*. 2020. Vol. 14, no. 1. P. 118–128.
44. Du Z., Park K.-w., Yu H., Fan Q., Li L. Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nature Genetics*. 2008. Vol. 40, no. 4. P. 460–465.

45. Du Z., Zhang Y., Li L. The yeast prion [*SWI*<sup>+</sup>] abolishes multicellular growth by triggering conformational changes of multiple regulators required for flocculin gene expression // *Cell Reports*. 2015. Vol. 13, no. 12. P. 2865–2878.
46. Duran E. C., Weaver C. L., Lucius A. L. Comparative analysis of the structure and function of AAA+ motors ClpA, ClpB, and Hsp104: Common threads and disparate functions // *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2017. Vol. 4. P. 54.
47. Eaglestone S. S., Ruddock L. W., Cox B. S., Tuite M. F. Guanidine hydrochloride blocks a critical step in the propagation of the prion-like determinant [*PSI*<sup>+</sup>] of *Saccharomyces cerevisiae* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000. Vol. 97, no. 1. P. 240–244.
48. Ellis J. Proteins as molecular chaperones // *Nature*. 1987. Vol. 328, no. 6129. P. 378–379.
49. Escusa-Toret S., Vonk W. I., Frydman J. Spatial sequestration of misfolded proteins by a dynamic chaperone pathway enhances cellular fitness during stress // *Nature Cell Biology*. 2013. Vol. 15, no. 10. P. 1231–1243.
50. Faust O., Abayev-Avraham M., Wentink A. S., Maurer M., Nillegoda N. B., London N., Bukau B., Rosenzweig R. HSP40 proteins use class-specific regulation to drive HSP70 functional diversity // *Nature*. 2020. Nov. Vol. 587, no. 7834. P. 489–494.
51. Fohlman J., Eaker D., Karlsoon E., Thesleff S. Taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian snake taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*). Isolation, characterization, quaternary structure and pharmacological properties // *European Journal of Biochemistry*. England, 1976. Sept. Vol. 68, no. 2. P. 457–469.
52. Franzmann T. M., Janel M., Pozniakovsky A., Mahamid J., Holehouse A. S., Nüske E., Richter D., Baumeister W., Grill S. W., Pappu R. V., Hyman A. A., Alberti S. Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness // *Science*. 2018. Jan. Vol. 359, no. 6371. eaao5654.

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

62. Gorkovskiy A., Reidy M., Masison D. C., Wickner R. B. Hsp104 disaggregase at normal levels cures many [*PSI*<sup>+</sup>] prion variants in a process promoted by Sti1p, Hsp90, and Sis1p // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017. In press.
63. Greene M. K., Maskos K., Landry S. J. Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998. Vol. 95, no. 11. P. 6108–6113.
64. Halfmann R., Lindquist S. Screening for amyloid aggregation by Semi-Denaturing Detergent-Agarose Gel Electrophoresis. // *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 2008. No. 17.
65. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *Journal of Molecular Biology*. 1983. Vol. 166, no. 4. P. 557–580.
66. Harris J. M., Nguyen P. P., Patel M. J., Sporn Z. a., Hines J. K. Functional diversification of Hsp40: distinct J-protein functional requirements for two prions allow for chaperone-dependent prion selection // *PLoS Genetics*. 2014. Vol. 10, no. 7. e1004510.
67. Hartl F. U. Unfolding the chaperone story // *Molecular Biology of the Cell*. 2017. Nov. Vol. 28, no. 22. P. 2919–2923.
68. Helsen C. W., Glover J. R. Insight into molecular basis of curing of [*PSI*<sup>+</sup>] prion by overexpression of 104-kDa heat shock protein (Hsp104) // *Journal of Biological Chemistry*. 2012. Vol. 287, no. 1. P. 542–556.
69. Hemmingsen S. M., Woolford C., Vies S. M. van der, Tilly K., Dennis D. T., Georgopoulos C. P., Hendrix R. W., Ellis R. J. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly // *Nature*. 1988. May. Vol. 333, no. 6171. P. 330–334.
70. Higurashi T., Hines J. K., Sahi C., Aron R., Craig E. A. Specificity of the J-protein Sis1 in the propagation of 3 yeast prions. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. Vol. 105, no. 43. P. 16596–16601.

71. Hines J. K., Li X., Du Z., Higurashi T., Li L., Craig E. A. [*SWT<sup>+</sup>*], the prion formed by the chromatin remodeling factor Swi1, is highly sensitive to alterations in Hsp70 chaperone system activity // *PLoS Genetics*. 2011. Vol. 7, no. 2. P. 27–29.
72. Ho C. T., Grousl T., Shatz O., Jawed A., Ruger-Herreros C., Semmelink M., Zahn R., Richter K., Bukau B., Mogk A. Cellular sequestrases maintain basal Hsp70 capacity ensuring balanced proteostasis // *Nature Communications*. 2019. Vol. 10, no. 1. P. 1–15.
73. Howie R. L., Jay-Garcia L. M., Kiktev D. A., Faber Q. L., Murphy M., Rees K. A., Sachwani N., Chernoff Y. O. Role of the cell asymmetry apparatus and ribosome-associated chaperones in the destabilization of a *Saccharomyces cerevisiae* prion by heat shock // *Genetics*. 2019. Vol. 212, no. 3. P. 757–771.
74. Huang Y. W., King C.-Y. A complete catalog of wild-type Sup35 prion variants and their protein-only propagation // *Current Genetics*. 2020. Feb. Vol. 66, no. 1. P. 97–122.
75. Huang Y. W., Kushnirov V. V., King C. Y. Mutable yeast prion variants are stabilized by a defective Hsp104 chaperone // *Molecular Microbiology*. 2021. Vol. 115, no. 4. P. 774–788.
76. Hung G.-C., Masison D. C. N-Terminal Domain of Yeast Hsp104 Chaperone Is Dispensable for Thermotolerance and Prion Propagation but Necessary for Curing Prions by Hsp104 Overexpression // *Genetics*. 2006. Vol. 173, June. P. 611–620.
77. Iadanza M. G., Jackson M. P., Hewitt E. W., Ranson N. A., Radford S. E. A new era for understanding amyloid structures and disease // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018. Vol. 19, no. 12. P. 755–773.
78. Inoue Y. Life cycle of yeast prions: propagation mediated by amyloid fibrils // *Protein & Peptide Letters*. 2009. Mar. Vol. 16, no. 3. P. 271–276.
79. James P., Pfund C., Craig E. a. Functional specificity among Hsp70 molecular chaperones. // *Science*. 1997. Vol. 275, no. 5298. P. 387–389.

80. Jones G. W., Masison D. C. *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 mutations affect  $[PSI^+]$  prion propagation and cell growth differently and implicate Hsp40 and tetratricopeptide repeat cochaperones in impairment of  $[PSI^+]$  // Genetics. 2003. Vol. 163, no. 2. P. 495–506.
81. Jung G., Jones G., Wegrzyn R. D., Masison D. C. A role for cytosolic hsp70 in yeast  $[PSI^+]$  prion propagation and  $[PSI^+]$  as a cellular stress. // Genetics. 2000. Oct. Vol. 156, no. 2. P. 559–70.
82. Kadnar M. L., Articov G., Derkatch I. L. Distinct type of transmission barrier revealed by study of multiple prion determinants of Rnq1 // PLoS Genetics. 2010. Vol. 6, no. 1. P. 31–34.
83. Kaganovich D., Kopito R., Frydman J. Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. // Nature. 2008. Vol. 454, no. 7208. P. 1088–1095.
84. Kaiser C., Michaelis S., Mitchell A. Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. P. 234.
85. Kampinga H. H., Craig E. A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2010. Vol. 11, no. 8. P. 579–592.
86. Kiktev D., Inge-Vechtomov S., Zhouravleva G. Prion-dependent lethality of *sup45* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. // Prion. 2007. Vol. 1, no. 2. P. 136–143.
87. Kiktev D. A., Chernoff Y. O., Archipenko A. V., Zhouravleva G. A. Identification of genes influencing synthetic lethality of genetic and epigenetic alterations in translation termination factors in yeast // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2011. Vol. 438, no. 3. P. 117–119.
88. Kiktev D. A., Melomed M. M., Lu C. D., Newnam G. P., Chernoff Y. O. Feedback control of prion formation and propagation by the ribosome-associated chaperone complex // Molecular Microbiology. 2015. Vol. 96, no. 3. P. 621–632.
89. Kirkland P. A., Reidy M., Masison D. C. Functions of yeast Hsp40 chaperone Sis1p dispensable for prion propagation but important for prion cur-



- ing and protection from prion toxicity // *Genetics*. 2011. Vol. 188, no. 3. P. 565–577.
90. Kityk R., Kopp J., Mayer M. P. Molecular Mechanism of J-Domain-Triggered ATP Hydrolysis by Hsp70 Chaperones // *Molecular Cell*. 2018. Vol. 69, no. 2. 227–237.e4.
91. Klaips C. L., Gropp M. H. M., Hipp M. S., Hartl F. U. Sis1 potentiates the stress response to protein aggregation and elevated temperature // *Nature Communications*. 2020. Dec. Vol. 11, no. 1. P. 6271.
92. Kominek J., Marszalek J., Neuvéglise C., Craig E. A., Williams B. L. The complex evolutionary dynamics of Hsp70s: A genomic and functional perspective // *Genome Biology and Evolution*. 2013. Vol. 5, no. 12. P. 2460–2477.
93. Krantz K. C., Puchalla J., Thapa R., Kobayashi C., Bisher M., Viehweg J., Carr C. M., Rye H. S. Clathrin coat disassembly by the yeast hsc70/Ssa1p and auxilin/Swa2p proteins observed by single-particle burst analysis spectroscopy // *Journal of Biological Chemistry*. 2013. Vol. 288, no. 37. P. 26721–26730.
94. Kroschwald S., Maharana S., Mateju D., Malinowska L., Elisabeth N., Poser I., Richter D., Alberti S. Promiscuous interactions and protein disaggregases determine the material state of stress-inducible RNP granules // *eLife*. 2015. Vol. 4. e06807.
95. Kryndushkin D. S., Smirnov V. N., Ter-Avanesyan M. D., Kushnirov V. V. Increased expression of Hsp40 chaperones, transcriptional factors, and ribosomal protein Rpp0 can cure yeast prions // *Journal of Biological Chemistry*. 2002. Vol. 277, no. 26. P. 23702–23708.
96. Kryndushkin D. S., Alexandrov I. M., Ter-Avanesyan M. D., Kushnirov V. V. Yeast [*PSI*<sup>+</sup>] Prion Aggregates Are Formed by Small Sup35 Polymers Fragmented by Hsp104 // *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Dec. Vol. 278, no. 49. P. 49636–49643.

97. Kryndushkin D. S., Shewmaker F., Wickner R. B. Curing of the [*URE3*] prion by Btn2p, a Batten disease-related protein. // *EMBO Journal*. 2008. Vol. 27, no. 20. P. 2725–2735.
98. Kryndushkin D. S., Engel A., Edskes H., Wickner R. B. Molecular chaperone Hsp104 can promote yeast prion generation // *Genetics*. 2011. Vol. 188, no. 2. P. 339–348.
99. Krzewska J., Melki R. Molecular chaperones and the assembly of the prion Sup35p, an in vitro study // *EMBO Journal*. 2006. Vol. 25, no. 4. P. 822–833.
100. Kumar S., Dine E. A., Paddock E., Steinberg D. N., Greene L. E., Masison D. C. Mutations outside the Ure2 amyloid-forming region disrupt [*URE3*] prion propagation and alter interactions with protein quality control factors // *Molecular and Cellular Biology*. 2020. Oct. Vol. 40, no. 21. e00294–20.
101. Kumar J., Reidy M., Masison D. C. Yeast J-protein Sis1 prevents prion toxicity by moderating depletion of prion protein // *Genetics*. 2021. Oct. Vol. 219, no. 2. iyab129.
102. Kushnirov V. V., Ter-Avanesyan M. D. Structure and replication of yeast prions // *Cell*. 1998. Vol. 94, no. 1. P. 13–16.
103. Kushnirov V. V., Kryndushkin D. S., Boguta M., Smirnov V. N., Ter-Avanesyan M. D. Chaperones that cure yeast artificial [*PSI*<sup>+</sup>] and their prion-specific effects // *Current Biology*. 2000. Vol. 10, no. 22. P. 1443–1446.
104. Kushnirov V. V., Alexandrov I. M., Mitkevich O. V., Shkundina I. S., Ter-Avanesyan M. D. Purification and analysis of prion and amyloid aggregates. // *Methods (San Diego, Calif.)* 2006. May. Vol. 39, no. 1. P. 50–55.
105. Kushnirov V. V., Dergalev A. A., Alexandrov A. I. Proteinase K resistant cores of prions and amyloids // *Prion*. 2020. Vol. 14, no. 1. P. 11–19.

106. Kushnirov V. V., Dergalev A. A., Alexandrov A. I. Amyloid fragmentation and disaggregation in yeast and animals // *Biomolecules*. 2021. Dec. Vol. 11, no. 12. P. 1884.
107. Kushnirov V. V., Dergalev A. A., Alieva M. K., Alexandrov A. I. Structural bases of prion variation in yeast // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23, no. 10. P. 5738.
108. Lacroute F. Non-Mendelian mutation allowing ureidosuccinic acid uptake in yeast. // *Journal of bacteriology*. 1971. Vol. 106, no. 2. P. 519–522.
109. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227, no. 5259. P. 680–685.
110. Laskey R. A., Honda B. M., Mills A. D., Finch J. T. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA // *Nature*. 1978. Vol. 275, October. P. 416–420.
111. Lee S., Fan C. Y., Michael Younger J., Ren H. Identification of essential residues in the type II Hsp40 Sis1 that function in polypeptide binding // *Journal of Biological Chemistry*. 2002. Vol. 277, no. 24. P. 21675–21682.
112. Lee J., Sung N., Mercado J. M., Hryc C. F., Chang C., Lee S., Tsai F. T. Overlapping and specific functions of the Hsp104 N-domain define its role in protein disaggregation // *Scientific Reports*. 2017. Dec. Vol. 7, no. 1. P. 11184.
113. Levinthal, Cyrus. Are there pathways for protein folding? // *J. Chim. Phys.* 1968. Vol. 65. P. 44–45.
114. Li J., Wu Y., Qian X., Sha B. Crystal structure of yeast Sis1 peptide-binding fragment and Hsp70 Ssa1 C-terminal complex. // *The Biochemical journal*. 2006. Vol. 398, no. 3. P. 353–360.
115. Liebman S. W., Chernoff Y. O. Prions in yeast // *Genetics*. 2012. Vol. 191, no. 4. P. 1041–1072.
116. Liu Q., Hendrickson W. A. Insights into Hsp70 Chaperone Activity from a Crystal Structure of the Yeast Hsp110 Sse1 // *Cell*. 2007. Vol. 131, no. 1. P. 106–120.

117. Liu B., Larsson L., Caballero A., Hao X., Öling D., Grantham J., Nyström T. The polarisome is required for segregation and retrograde transport of protein aggregates // *Cell*. 2010. Vol. 140, no. 2. P. 257–267.
118. Lotz S. K., Knighton L. E., Nitika, Jones G. W., Truman A. W. Not quite the SSAME: unique roles for the yeast cytosolic Hsp70s // *Current Genetics*. 2019. Vol. 65, no. 5. P. 1127–1134.
119. Malinovska L., Kroschwald S., Munder M. C., Richter D., Alberti S. Molecular chaperones and stress-inducible protein-sorting factors coordinate the spatiotemporal distribution of protein aggregates // *Molecular Biology of the Cell*. 2012. Vol. 23, no. 16. P. 3041–3056.
120. 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*<sup>+</sup>] Prion and *SWI1* Deletion in Yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes*. 2019. Mar. Vol. 10, no. 3. P. 212.
121. Martin J., Mayhew M., Langer T., Hartl F. U. The reaction cycle of GroEL and GroES in chaperonin-assisted protein folding // *Nature*. 1993. Vol. 366, no. 6452. P. 228–233.
122. Masison D. C., Wickner R. B. Prion-Inducing Domain of Yeast Ure2p and Protease Resistance of Ure2p in Prion-Containing Cells // *Science*. 1995. Oct. Vol. 270, no. 5233. P. 93–95.
123. Matiiv A. B., Trubitsina N. P., Matveenکو A. G., Barbitoff Y. A., Zhouravleva G. A., Bondarev S. A. Amyloid and Amyloid-Like Aggregates: Diversity and the Term Crisis // *Biochemistry (Moscow)*. 2020. Sept. Vol. 85, no. 9. P. 1011–1034.
124. Matiiv A. B., Trubitsina N. P., Matveenکو A. G., Barbitoff Y. A., Zhouravleva G. A., Bondarev S. A. Structure and Polymorphism of Amyloid and Amyloid-Like Aggregates // *Biochemistry (Moscow)*. 2022. Vol. 87, no. 5. P. 450–463.
125. Matveenکو A. G., Drozdova P. B., Belousov M. V., Moskalenko S. E., Bondarev S. A., Barbitoff Y. A., Nizhnikov A. A., Zhouravleva G. A.

- SFPI*-mediated prion-dependent lethality is caused by increased Sup35 aggregation and alleviated by Sis1 // *Genes to Cells*. 2016. Vol. 21, no. 12. P. 1290–1308.
126. Matveenko A. G., Barbitoff Y. A., Jay-Garcia L. M., Chernoff Y. O., Zhouravleva G. A. Differential effects of chaperones on yeast prions: CURrent view // *Current Genetics*. 2018. Vol. 64, no. 2. P. 317–325.
127. Mayer M. P., Gierasch L. M. Recent advances in the structural and mechanistic aspects of Hsp70 molecular chaperones // *Journal of Biological Chemistry*. 2019. Vol. 294, no. 6. P. 2085–2097.
128. Merz P. A., Rohwer R. G., Kasczak R., Wisniewski H. M., Somerville R. A., Gibbs C. J. J., Gajdusek D. C. Infection-specific particle from the unconventional slow virus diseases. // *Science*. 1984. Vol. 225, no. 4660. P. 437–440.
129. Miller S. B., Ho C.-T., Winkler J., Khokhrina M., Neuner A., Mohamed M. Y. H., Guilbride D. L., Richter K., Lisby M., Schiebel E., Mogk A., Bukau B. Compartment-specific aggregates direct distinct nuclear and cytoplasmic aggregate deposition. // *EMBO Journal*. 2015a. Vol. 34, no. 6. P. 778–797.
130. Miller S. B., Mogk A., Bukau B. Spatially organized aggregation of misfolded proteins as cellular stress defense strategy // *Journal of Molecular Biology*. 2015b. Vol. 427, no. 7. P. 1564–1574.
131. Moehle C. M., Aynardi M. W., Kolodny M. R., Park F. J., Jones E. W. Protease B of *Saccharomyces cerevisiae*: Isolation and Regulation of the *PRB1* Structural Gene // *Genetics*. 1987. Feb. Vol. 115, no. 2. P. 255–263.
132. Morange M. What history tells us. II. The discovery of chaperone function // *Journal of Biosciences*. 2005. Vol. 30, no. 4. P. 461–464.
133. Moriyama H., Edskes H. K., Wickner R. B. [*URE3*] prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for chaperone Hsp104 and curing by overexpressed chaperone Ydj1p // *Molecular and cellular biology*. 2000. Vol. 20, no. 23. P. 8916–8922.

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

- ation of cytosolic proteins by sequestering the Sis1p chaperone // *Cell*. 2013. Vol. 154, no. 1. P. 134–145.
143. Park Y.-N., Zhao X., Yim Y.-I., Todor H., Ellerbrock R., Reidy M., Eisenberg E., Masison D. C., Greene L. E. Hsp104 Overexpression Cures *Saccharomyces cerevisiae* [*PSI*<sup>+</sup>] by Causing Dissolution of the Prion Seeds // *Eukaryotic Cell*. 2014. May. Vol. 13, no. 5. P. 635–647.
  144. Patino M. M., Liu J.-j., Glover J. R., Lindquist S. Support for the Prion Hypothesis for Inheritance of a Phenotypic Trait in Yeast // *Science*. 1996. Aug. Vol. 273, no. 5275. P. 622–626.
  145. Paushkin S. V., Kushnirov V. V., Smirnov V. N., Ter-Avanesyan M. D. Propagation of the yeast prion-like [*PSI*<sup>+</sup> determinant is mediated by oligomerization of the *SUP35*-encoded polypeptide chain release factor. // *EMBO Journal*. 1996. June. Vol. 15, no. 12. P. 3127–3134.
  146. Pelham H. R. B. Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock // *EMBO Journal*. 1984. Vol. 3, no. 13. P. 3095–3100.
  147. Powers E. T., Balch W. E. Diversity in the origins of proteostasis networks—a driver for protein function in evolution // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013. Vol. 14, no. 4. P. 237–248.
  148. Prusiner S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. // *Science*. 1982. Vol. 216, no. 4542. P. 136–144.
  149. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing / R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2014.
  150. Reidy M., Miot M., Masison D. C. Prokaryotic chaperones support yeast prions and thermotolerance and define disaggregation machinery interactions // *Genetics*. 2012. Vol. 192, no. 1. P. 185–193.
  151. Reidy M., Sharma R., Shastry S., Roberts B.-L., Albino-Flores I., Wickner S., Masison D. C. Hsp40s specify functions of Hsp104 and Hsp90 protein chaperone machines // *PLoS Genetics*. 2014. Vol. 10, no. 10. e1004720.
  152. Rohner N., Jarosz D. F., Kowalko J. E., Yoshizawa M., Jeffery W. R., Borowsky R. L., Lindquist S., Tabin C. J. Cryptic Variation in Morpho-

- logical Evolution: HSP90 as a Capacitor for Loss of Eyes in Cavefish // *Science*. 2013. Dec. Vol. 342, no. 6164. P. 1372–1375.
153. Rosenzweig R., Nillegoda N. B., Mayer M. P., Bukau B. The Hsp70 chaperone network // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019. Vol. 20, no. 11. P. 665–680.
154. Ross E. D., Minton A., Wickner R. B. Prion domains: sequences, structures and interactions. // *Nature Cell Biology*. 2005. Vol. 7, no. 11. P. 1039–1044.
155. Ryzhova T. A., Sopova J. V., Zadorsky S. P., Siniukova V. A., Sergeeva A. V., Galkina S. A., Nizhnikov A. A., Shenfeld A. A., Volkov K. V., Galkin A. P. Screening for amyloid proteins in the yeast proteome // *Current Genetics*. 2018. Apr. Vol. 64, no. 2. P. 469–478.
156. Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013. Vol. 14, no. 10. P. 630–642.
157. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Elsevier, 04/1989. P. 1626.
158. Sambrook J., Russell D. W. Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride // *Cold Spring Harbor Protocols*. 2006. Vol. 2006, no. 1. pdb.prot3932.
159. Savistchenko J., Krzewska J., Fay N., Melki R. Molecular chaperones and the assembly of the prion Ure2p in vitro // *Journal of Biological Chemistry*. 2008. Vol. 283, no. 23. P. 15732–15739.
160. Schuermann J. P., Jiang J., Cuellar J., Llorca O., Wang L., Gimenez L. E., Jin S., Taylor A. B., Demeler B., Morano K. A., Hart P. J., Valpuesta J. M., Lafer E. M., Sousa R. Structure of the Hsp110:Hsc70 Nucleotide Exchange Machine // *Molecular Cell*. 2008. Vol. 31, no. 2. P. 232–243.
161. Schumacher R. J., Hansen W. J., Freeman B. C., Alnemri E., Litwack G., Toft D. O. Cooperative action of Hsp70, Hsp90, and DnaJ proteins in protein renaturation // *Biochemistry*. 1996. Vol. 35, no. 47. P. 14889–14898.



162. Schwimmer C., Masison D. C. Antagonistic interactions between yeast [*PSI*<sup>+</sup>] and [*URE3*] prions and curing of [*URE3*] by Hsp70 protein chaperone Ssa1p but not by Ssa2p. // *Molecular and cellular biology*. 2002. Vol. 22, no. 11. P. 3590–3598.
163. Scior A., Buntru A., Arnsburg K., Ast A., Iburg M., Juenemann K., Pigazzini M. L., Mlody B., Puchkov D., Priller J., Wanker E. E., Prigione A., Kirstein J. Complete suppression of Htt fibrilization and disaggregation of Htt fibrils by a trimeric chaperone complex // *EMBO Journal*. 2018. Vol. 37, no. 2. P. 282–299.
164. Sergeeva A. V., Galkin A. P. Functional amyloids of eukaryotes: criteria, classification, and biological significance // *Current Genetics*. 2020. Vol. 66, no. 5. P. 849–866.
165. Sharma D., Masison D. C. Functionally redundant isoforms of a yeast Hsp70 chaperone subfamily have different antiprion effects // *Genetics*. 2008a. Vol. 179, no. 3. P. 1301–1311.
166. Sharma D., Masison D. C. Functionally redundant isoforms of a yeast Hsp70 chaperone subfamily have different antiprion effects // *Genetics*. 2008b. Vol. 179, no. 3. P. 1301–1311.
167. Sharma D., Martineau C. N., Le Dall M. T., Reidy M., Masison D. C., Kabani M. Function of SSA subfamily of Hsp70 within and across species varies widely in complementing *Saccharomyces cerevisiae* cell growth and prion propagation // *PLoS ONE*. 2009. Vol. 4, no. 8.
168. Shorter J., Lindquist S. Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers. // *Science (New York, N.Y.)* 2004. June. Vol. 304, no. 5678. P. 1793–1797.
169. Shorter J., Lindquist S. Destruction or potentiation of different prions catalyzed by similar Hsp104 remodeling activities // *Molecular Cell*. 2006. Vol. 23, no. 3. P. 425–438.
170. Shorter J., Lindquist S. Hsp104, Hsp70 and Hsp40 interplay regulates formation, growth and elimination of Sup35 prions // *EMBO Journal*. 2008. Vol. 27, no. 20. P. 2712–2724.

171. Shorter J., Southworth D. R. Spiraling in control: structures and mechanisms of the Hsp104 disaggregase // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2019. Aug. Vol. 11, no. 8. a034033.
172. Sikorski R. S., Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genetics*. 1989. Vol. 122, no. 1. P. 19–27.
173. Snider J., Thibault G., Houry W. A. The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins // *Genome Biology*. 2008. Vol. 9, no. 4. P. 1–8.
174. Son M., Wickner R. B. Antiprion systems in yeast cooperate to cure or prevent the generation of nearly all [*PSI*<sup>+</sup>] and [*URE3*] prions // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2022. July. Vol. 119, no. 28. P. 1–9.
175. Sondheimer N., Lindquist S. Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. // *Molecular cell*. 2000. Vol. 5, no. 1. P. 163–172.
176. Sondheimer N., Lopez N., Craig E. a., Lindquist S. The role of Sis1 in the maintenance of the [RNQ<sup>+</sup>] prion // *EMBO Journal*. 2001. Vol. 20, no. 10. P. 2435–2442.
177. Sopova J. V., Koshel E. I., Belashova T. A., Zadorsky S. P., Sergeeva A. V., Siniukova V. A., Shenfeld A. A., Velizhanina M. E., Volkov K. V., Nizhnikov A. A., Kachkin D. V., Gaginskaya E. R., Galkin A. P. RNA-binding protein FXR1 is presented in rat brain in amyloid form // *Scientific Reports*. 2019. Dec. Vol. 9, no. 1. P. 18983.
178. Specht S., Miller S. B. M., Mogk A., Bukau B. Hsp42 is required for sequestration of protein aggregates into deposition sites in *Saccharomyces cerevisiae* // *Journal of Cell Biology*. 2011. Vol. 195, no. 4. P. 617–629.
179. Stansfield I., Jones K. M., Kushnirov V. V., Dagkesamanskaya A. R., Poznyakovski A. I., Paushkin S. V., Nierras C. R., Cox B. S., Ter-Avanesyan M. D., Tuite M. F. The products of the *SUP45* (eRF1) and *SUP35* genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. // *EMBO Journal*. 1995. Sept. Vol. 14, no. 17. P. 4365–73.

180. Stein K. C., True H. L. Structural variants of yeast prions show conformer-specific requirements for chaperone activity // *Molecular Microbiology*. 2014. Vol. 93, no. 6. P. 1156–1171.
181. Studier F. W., Moffatt B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes // *Journal of Molecular Biology*. 1986. Vol. 189, no. 1. P. 113–130.
182. Sweeny E. A., Shorter J. Mechanistic and Structural Insights into the Prion-Disaggregase Activity of Hsp104 // *Journal of Molecular Biology*. 2016. Vol. 428, no. 9. P. 1870–1885.
183. Taipale M., Jarosz D. F., Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: Emerging mechanistic insights // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010. Vol. 11, no. 7. P. 515–528.
184. Tanaka M., Chien P., Naber N., Cooke R., Weissman J. S. Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences // *Nature*. 2004. Vol. 428, no. 6980. P. 323–328.
185. Ter-Avanesyan M. D., Kushnirov V. V., Dagkesamanskaya A. R., Didichenko S. A., Chernoff Y. O., Inge-Vechtomov S. G., Smirnov V. N. Deletion analysis of the SUP35 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two non-overlapping functional regions in the encoded protein // *Molecular Microbiology*. 1993. Mar. Vol. 7, no. 5. P. 683–692.
186. Ter-Avanesyan M. D., Dagkesamanskaya A. R., Kushnirov V. V., Smirnov V. N. The SUP35 omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [*psi*<sup>+</sup>] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genetics*. 1994. July. Vol. 137, no. 3. P. 671–676.
187. Tessarz P., Schwarz M., Mogk A., Bukau B. The yeast AAA+ chaperone Hsp104 is part of a network that links the actin cytoskeleton with the inheritance of damaged proteins // *Molecular and Cellular Biology*. 2009. July. Vol. 29, no. 13. P. 3738–3745.
188. Tipton K. a., Verges K. J., Weissman J. S. In Vivo Monitoring of the Prion Replication Cycle Reveals a Critical Role for Sis1 in Delivering Substrates to Hsp104 // *Molecular Cell*. 2008. Vol. 32, no. 4. P. 584–591.

189. Troisi E. M., Rockman M. E., Nguyen P. P., Oliver E. E., Hines J. K. Swa2, the yeast homolog of mammalian auxilin, is specifically required for the propagation of the prion variant [*URE3-1*] // *Molecular Microbiology*. 2015. Vol. 97, no. 5. P. 926–941.
190. Tsai J., Douglas M. G. A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding // *Journal of Biological Chemistry*. 1996. Vol. 271, no. 16. P. 9347–9354.
191. Uversky V. N. Mysterious oligomerization of the amyloidogenic proteins // *FEBS Journal*. 2010. Vol. 277, no. 14. P. 2940–2953.
192. Walsh P., Bursać D., Law Y. C., Cyr D., Lithgow T. The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. // *EMBO reports*. 2004. Vol. 5, no. 6. P. 567–571.
193. Wang J., Song J. J., Franklin M. C., Kamtekar S., Im Y. J., Rho S. H., Seong I. S., Lee C. S., Chung C. H., Eom S. H. Crystal structures of the HslVU peptidase-ATPase complex reveal an ATP-dependent proteolysis mechanism // *Structure*. 2001. Vol. 9, no. 2. P. 177–184.
194. Wegrzyn R. D., Bapat K., Newnam G. P., Zink a. D., Chernoff Y. O. Mechanism of prion loss after Hsp104 inactivation in yeast. // *Molecular and cellular biology*. 2001. Vol. 21, no. 14. P. 4656–4669.
195. Wentink A. S., Nillegoda N. B., Feufel J., Ubartaitė G., Schneider C. P., De Los Rios P., Hennig J., Barducci A., Bukau B. Molecular dissection of amyloid disaggregation by human HSP70 // *Nature*. 2020. Nov. Vol. 587, no. 7834. P. 483–488.
196. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016. P. 260.
197. Wickner R. B. [*URE3*] as an altered *URE2* protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Science*. 1994. Vol. 264, no. 5158. P. 566–569.

198. Wickner R. B. Discovering protein-based inheritance through yeast genetics. // *Journal of Biological Chemistry*. 2012. Vol. 287, no. 18. P. 14432–14442.
199. Wickner R. B., Edskes H. K., Bateman D. a., Kelly A. C., Gorkovskiy A., Dayani Y., Zhou A. Amyloids and yeast prion biology // *Biochemistry*. 2013. Vol. 52, no. 9. P. 1514–1527.
200. Wickner R. B., Bezsonov E., Bateman D. a. Normal levels of the antiprion proteins Btn2 and Cur1 cure most newly formed [*URE3*] prion variants. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014. Vol. 111, no. 26. E2711–20.
201. Winkler J., Tyedmers J., Bukau B., Mogk A. Chaperone networks in protein disaggregation and prion propagation // *Journal of Structural Biology*. 2012a. Vol. 179, no. 2. P. 152–160.
202. Winkler J., Tyedmers J., Bukau B., Mogk A. Hsp70 targets Hsp100 chaperones to substrates for protein disaggregation and prion fragmentation // *Journal of Cell Biology*. 2012b. Vol. 198, no. 3. P. 387–404.
203. Yu C.-i., King C.-y. Forms and abundance of chaperone proteins influence yeast prion variant competition // *Molecular Microbiology*. 2019. Mar. Vol. 111, no. 3. P. 798–810.
204. Zaarur N., Xu X., Lestienne P., Meriin A. B., McComb M., Costello C. E., Newnam G. P., Ganti R., Romanova N. V., Shanmugasundaram M., Bandejas T. M., Matias P. M., Lobachev K. S., Lednev I. K., Chernoff Y. O., Sherman M. Y. RuvbL 1 and RuvbL 2 enhance aggresome formation and disaggregate amyloid fibrils // *EMBO Journal*. 2015. Vol. 34, no. 18. P. 2363–2382.
205. Zhang T., Lei J., Yang H., Xu K., Wang R., Zhang Z. An improved method for whole protein extraction from yeast *Saccharomyces cerevisiae* Tingting // *Yeast* (Chichester, England). 2011. Vol. 28, no. 11. P. 795–798.
206. Zhao X., Rodriguez R., Silberman R. E., Ahearn J. M., Saidha S., Cummins K. C., Eisenberg E., Greene L. E. Heat shock protein 104 (Hsp104)-mediated curing of [*PSI*<sup>+</sup>] yeast prions depends on both [*PSI*<sup>+</sup>] conforma-

- tion and the properties of the Hsp104 homologs // *Journal of Biological Chemistry*. 2017. Vol. 292, no. 21. P. 8630–8641.
207. Zhao X., Lanz J., Steinberg D., Pease T., Ahearn J. M., Bezsonov E. E., Staguhn E. D., Eisenberg E., Masison D. C., Greene L. E. Real-time imaging of yeast cells reveals several distinct mechanisms of curing of the [URE3] prion // *Journal of Biological Chemistry*. 2018. Vol. 293, no. 9. P. 3104–3117.
208. Zhouravleva G., Frolova L., Le Goff X., Le Guellec R., Inge-Vechtomov S., Kisselev L., Philippe M. Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. // *EMBO Journal*. 1995. Aug. Vol. 14, no. 16. P. 4065–72.
209. Zhu X., Zhao X., Burkholder W. F., Gragerov A., Ogata C. M., Gottesman M. E., Hendrickson W. A. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK // *Science*. 1996. Vol. 272, no. 5268. P. 1606–1614.

## Благодарности

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

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

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

Saint-Petersburg State University

*As Manuscript*

Barbitov Iurii Aleksandrovich

**Mechanisms of the differential effects of the Sis1 chaperone on prions in  
yeast *Saccharomyces cerevisiae***

Scientific specialization 1.5.7. Genetics

Thesis for a Candidate degree in biological sciences

Translation from Russian

Scientific supervisor:

Doctor of biological sciences, professor

Zhouravleva Galina Anatolyevna

Saint-Petersburg

2022



## Table of contents

List of abbreviations and symbols .....	115
Introduction .....	116
Chapter 1. Differential interactions of molecular chaperones and yeast prions (literature review) .....	120
1.1 Molecular chaperones and protein quality control .....	120
1.1.1 History of chaperone discovery .....	120
1.1.2 Molecular chaperone families .....	122
1.2 Prions in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	131
1.2.1 Prions and amyloids .....	131
1.2.2 Yeast prions: diversity and properties .....	132
1.3 The protein quality control system and yeast prions .....	137
1.3.1 Hsp104 — a key regulator of yeast prion propagation ..	137
1.3.2 The role of Hsp70 in the life cycle of yeast prions ..	140
1.3.3 Differential effects of Hsp40 on prions .....	141
1.4 Conclusion .....	146
Chapter 2. Materials and methods .....	147
2.1 Yeast and bacteria strains .....	147
2.2 Plasmids .....	148
2.3 Media and growth conditions .....	152
2.4 Genetic methods .....	153
2.4.1 Transformation of yeast and bacteria .....	153
2.4.2 [ <i>URE3</i> ] prion loss rate estimation .....	153
2.5 Fluorescence microscopy .....	153
2.6 Methods of molecular biology .....	154
2.6.1 Polymerase chain reaction .....	154
2.6.2 Restriction .....	154
2.6.3 DNA fragment ligation .....	154
2.6.4 Plasmid DNA extraction from bacteria .....	154
2.6.5 DNA electrophoresis .....	155
2.6.6 Protein extraction and electrophoresis .....	155
2.6.7 Semi-denaturing agarose gel electrophoresis (SDD-AGE)	156
2.7 Preparation of yeast chaperone and amyloid fibril samples <i>in vitro</i>	156
2.7.1 Optimization of protein production conditions .....	156
2.7.2 Protein purification .....	157
2.7.3 Amyloid fibril generation .....	158
2.7.4 Analysis of chaperone activity <i>in vitro</i> .....	159
2.8 Electron microscopy .....	160
2.9 Chaperone binding assay .....	160
2.10 Statistical analysis .....	161
Chapter 3. Results .....	163
3.1 Characterization of the differential effects of Sis1 on yeast prions	163
3.1.1 Changes in Sis1 intracellular localization differentially	163
affect yeast prions .....	163
3.1.2 Changes in Sis1 localization do not affect aggregate size	165

3.1.3	Deletion of the Sis1 dimerization domain weakens [ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ]	167
3.2	Analysis of Hsp40 binding to amyloid fibrils . . . . .	169
3.2.1	Preparation of purified chaperones and amyloid fibrils .	170
3.2.2	Sis1 efficiently interacts with Sup35NM, but not Rnq1 fibrils . . . . .	172
3.2.3	Mutations in oligopeptide repeats in Sup35 do not affect Sis1 binding . . . . .	174
3.3	Relationship between Hsp40 binding and recruitment of other chaperones to fibrils . . . . .	176
3.3.1	Hsp40 binding efficiency does not affect Hsp70 recruitment . . . . .	176
3.3.2	Sis1 does not stimulate direct Hsp104 binding to fibrils .	179
Chapter 4.	Discussion . . . . .	182
4.1	The role of Hsp40 in the yeast prion life cycle . . . . .	182
4.2	Molecular mechanisms of amyloid disaggregation . . . . .	184
4.3	The functional impact of Hsp40 binding to aggregates . . . . .	187
Chapter 5.	Conclusions . . . . .	191
References	. . . . .	192
Acknowledgements	. . . . .	216

**List of abbreviations and symbols**

- a.a. — amino acid;  
AMP-PNP — adenylyl-iminodiphosphate;  
ATP — adenosine triphosphate;  
CTD — C-terminal domain;  
CytoQ — cytoplasmic quality (control deposit);  
DD — dimerization domain;  
GTP — guanosine triphosphate;  
HTb — a sequence encoding the His<sub>6</sub>-tag, TEV protease site, and containing the BamHI restriction site;  
INQ — intranuclear quality control (deposit);  
IPOD — insoluble protein deposit;  
IPTG — isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside;  
NBD — nucleotide-binding domain;  
NLS — nuclear localization signal;  
NES — nuclear export signal;  
PQC — protein quality control;  
SBD — substrate-binding domain;  
SDD-AGE — semi-denaturing detergent agarose gel electrophoresis;  
SDS-PAGE — polyacrylamid gel electrophoresis with SDS;  
w/v — weight/volume

## Introduction

**The relevance of the topic.** During the course of their lives, living organisms encounter a great variety of stresses. To survive under stressful conditions, cells have acquired many different systems to combat the undesirable effects of stress. One such system is the Protein Quality Control (PQC) system, which is designed to protect the cell from toxicity associated with protein conformation abnormalities.

Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a convenient model organism to study a variety of processes occurring in the eukaryotic cell. Various components of the PQC system can be studied in the model system of yeast prions. Yeast prions are infectious determinants of protein nature, which are self-replicating conformational variants of native proteins. Yeast prions propagate through interactions with various elements of the PQC system - molecular chaperones and protein sorting factors. Interestingly, different chaperones have differential effects on the maintenance of the most studied yeast prions, [PSI<sup>+</sup>] and [URE3]. Such differential effects of chaperones on prion maintenance are of great interest for basic and applied research due to the fact that understanding the mechanisms of interaction between chaperones and protein aggregates may help to develop new methods for diagnosis and therapy of human and mammalian proteinopathies.

**The extent of development of the topic** A number of examples of differential effects of chaperones on yeast prions have been described in the literature (Reidy *et al.*, 2012; Stein, True, 2014; Reidy *et al.*, 2014; Barbitoff *et al.*, 2017). Differential effects of the Cur1 factor on prions (Barbitoff *et al.*, 2017) have been described in the works of our laboratory, and were shown to be potentially related to changes in the intracellular balance of Sis1. At the same time, there are no data on the ability of Sis1 to exert opposite effects on prions. Also, there are no studies in the literature devoted to quantitative analysis of prion-chaperone interactions, nor has a universal model been proposed to explain the differential effects of chaperones on prion maintenance.

**Purpose of the work:** to study the molecular mechanisms of the differential effects of the chaperone Sis1 on prions in yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

The following objectives were formulated to achieve the goal:

1. Characterize the effect of changes in intracellular Sis1 balance on yeast prion maintenance.
2. Assess the efficiency of Sis1 binding to amyloid fibrils of different proteins *in vitro*.
3. Study the effect of Sis1 dimerization domain deletion on its interaction with amyloid fibrils *in vitro*.
4. Examine the relationship between the binding of Sis1 to aggregates and the efficiency of recruitment of chaperones from other groups to them.

**Scientific novelty of the work** This work shows for the first time the positive effect of changing Sis1 localization on the maintenance of the  $[PSI^+]$  prion. A new method for analyzing the binding of molecular chaperones to amyloid aggregates in the *in vitro* system was developed. The first quantitative assessments of the interaction efficiency of Sis1, Ssa1 and Hsp104 with amyloid aggregates of yeast prionogenic proteins were obtained. The previously undescribed effects of Sis1 dimerization domain deletion on both prion maintenance and interaction with amyloid aggregates were found. A new model describing the differential interaction of chaperones with prion aggregates in yeast *S. cerevisiae* has been proposed.

**Theoretical and practical significance of the work.** The results obtained in this research extend the existing theoretical concepts of the mechanisms of interaction between molecular chaperones of different groups with amyloid aggregates in eukaryotic cells. The proposed methodology for analyzing the interaction of chaperones with protein aggregates can be further applied to the analysis of amyloid aggregates of human and other mammalian proteins.

**Methodology and methods of research** A number of modern research methods were used, including microbial genetics, molecular biological techniques for nucleic acids and proteins, biochemical methods for analyzing macromolecule interactions, fluorescence and electron microscopy. Various

methods of statistical processing of the obtained results were used. In the course of the dissertation research we developed and used a new method to analyze the interaction of molecular chaperones with amyloid aggregates.

**Main points made for the defense.** It has been shown that a change in the intracellular localization of the molecular chaperone Sis1 is capable of exerting opposite effects on yeast prions. The efficiency of Sis1 binding to amyloid fibrils of the prionogenic protein Sup35<sup>NM</sup> in the *in vitro* system is higher than to Rnq1 fibrils. Mutations in the oligopeptide repeats within the prion domain of Sup35 do not affect the interaction of Sis1 with amyloid aggregates of this protein. Deletion of the dimerization domain of Sis1 weakens its interaction with amyloid fibrils of various proteins and can lead to reduced efficiency of Hsp70 recruitment to the aggregates.

**The degree of validity and approbation of the results.** The main results of the thesis work were presented and discussed at 6 international conferences and published in 5 articles in peer-reviewed scientific journals:

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

with yeast prion fibrils // FEMS Yeast Research. 2020. Vol. 20, no. 4. foaa025

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

**The scope and structure of the work.** The thesis consists of an introduction and five chapters. The full volume of the thesis is 105 pages with 21 figures and 6 tables. List of references contains 209 titles.

## **Chapter 1. Differential interactions of molecular chaperones and yeast prions (literature review)**

### **1.1. Molecular chaperones and protein quality control**

The process of protein folding is one of the most interesting in cell biology. Any long protein molecule can take on an extremely large number of spatial structures (Levinthal, Cyrus, 1968). Nevertheless, proteins are capable of spontaneously restoring their native structure — a phenomenon discovered by Anfinsen in *in vitro* experiments in 1961 (Anfinsen *et al.*, 1961). In a living cell, however, the folding of a protein molecule can often be disrupted. Disruption of the folding process can, in turn, lead to a number of negative consequences for the cell, including the formation of undesirable protein aggregates (Dobson, 2003). To counteract misfolding and protein aggregation in the cell, there is a PQC system, the key components of which are molecular chaperones.

#### **1.1.1 History of chaperone discovery**

The word «chaperon» (from French chaperon — «a lady accompanying and observing a younger woman in public») was first used in the scientific literature in relation to a protein molecule in 1976 (Fohlman *et al.*, 1976). In that paper, Folman used the term to refer to the protein  $\beta$  and  $\gamma$  subunits of a protein neurotoxin from the venom of Australian taipan snakes (taipoxin), which, as Folman hypothesized, contributed to the stability of the toxin. Two years later, Lasky first used the phrase «molecular chaperone» to refer to the function of nucleoplasmin with respect to histones in nucleosome assembly (Laskey *et al.*, 1978).

The role of chaperone proteins (or molecular chaperones) in controlling protein folding was first suggested by Pelham in 1984 (Pelham, 1984). This assumption was made when studying the processes that occur in living cells under the influence of high temperature (heat shock). The effects of heat exposure on molecular processes in cells have been studied in detail since



1962, when Ritossa discovered that heat exposure stimulates the expression of some genes in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. The proteins encoded by these genes were subsequently called heat shock proteins (HSP). Pelham and colleagues investigated the *Drosophila* heat shock protein HSP70, which is activated by heat stress. Pelham interpreted the protective effect of HSP70 under heat stress by the ability of this protein to degrade protein complexes formed by unfolded protein molecules under conditions of elevated temperature (by Morange, 2005). Subsequently, Pelham's hypothesis about the function of certain heat shock proteins was used by Ellis, who concluded, based on data from Pelham and others, that the function of chaperone proteins in controlling protein folding may be common and vital to all living objects (Ellis, 1987).

Shortly after Ellis' work was published, the term «chaperonin» was proposed to refer to the large protein complexes that play a role in the assembly of oligomeric protein complexes. This term was introduced after it was shown that the *Escherichia coli* GroEL protein (required for the assembly of bacteriophage  $\lambda$  particles) was homologous to the Rubisco-binding protein from plant chloroplasts (this was the protein Ellis' lab worked with) (Hemmingsen *et al.*, 1988). Later, a representative of the chaperonin group was found in baker's yeast, and mutants of the *MIF4* gene encoding this protein were characterized by a reduced ability to import proteins into mitochondria. Further study of Hsp60 group proteins showed that these proteins have a broad role in protein chain folding. Hartl *et al.* showed that Hsp60 substrate, dihydrofolate reductase (DHFR), which is capable of spontaneous refolding in an *in vitro* system, bound to Hsp60 in an unfolded state in live cells. Thus, the proteins of Hsp60 group should have contributed to the folding of this protein, which indirectly influences the assembly of oligomeric protein complexes as well. These results, published in 1989, laid the emergence of the chaperone-mediated polypeptide chain folding paradigm (by Hartl, 2017).

### 1.1.2 Molecular chaperone families

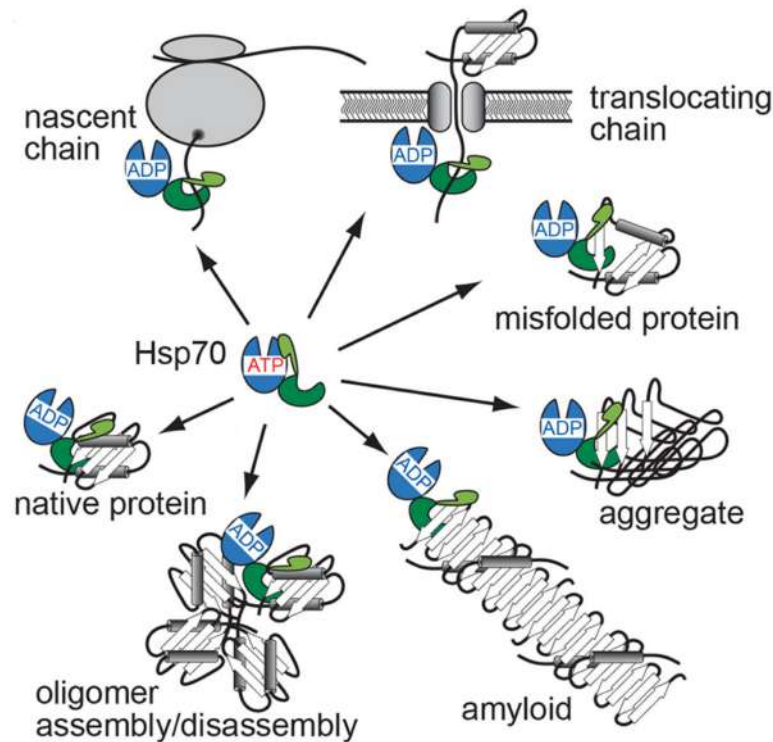
During the study of molecular chaperones, several major families of these proteins have been identified. The main families are Hsp60, Hsp70, Hsp90, and Hsp100. Chaperones of Hsp60 and Hsp70 groups are directly responsible for protein folding; representatives of Hsp90 family are mainly involved in stabilization of protein structures and regulatory processes, while Hsp100 is responsible for ATP-dependent proteolysis and disaggregation (for review, see Saibil, 2013). In the following sections, we will discuss the representatives of the aforementioned groups of chaperones in more detail, focusing mainly on the systems whose operation is investigated in this study, Hsp70 and Hsp100.

**Hsp70 and Hsp40 chaperone system.** Proteins of the Hsp70 group play one of the key roles in protein folding processes in both prokaryotes and eukaryotes. Hsp70 contribute to co- or posttranslational folding of newly synthesized protein chains, translocation of proteins across organelle membranes, and determine the fate of misfolded protein molecules or protein aggregates (Fig. 1, Mayer, Gierasch, 2019). Chaperones of this group represent the dominant fraction of chaperones in the cell. In the genome of most living organisms there are several paralogous genes encoding proteins of this group. For example, the human genome contains about 17 genes encoding Hsp70; the yeast genome *S. cerevisiae* — 14, and the rice genome — 26 (Powers, Balch, 2013; Kominek *et al.*, 2013). Like the other major groups of molecular chaperones, Hsp70 has ATPase activity. ATP hydrolysis is necessary for proteins in this group to interact effectively with client proteins<sup>1</sup>.

Hsp70 family proteins are characterized by a molecular weight of about 70 kDa and consist of two main domains — the nucleotide-binding (ATPase) domain (NBD) and the substrate-binding domain (SBD), as well as a small C-terminal domain with unknown function (Bertelsen *et al.*, 2008). The NBD is responsible for ATP binding and ATPase activity of the chaperone, and its fold

---

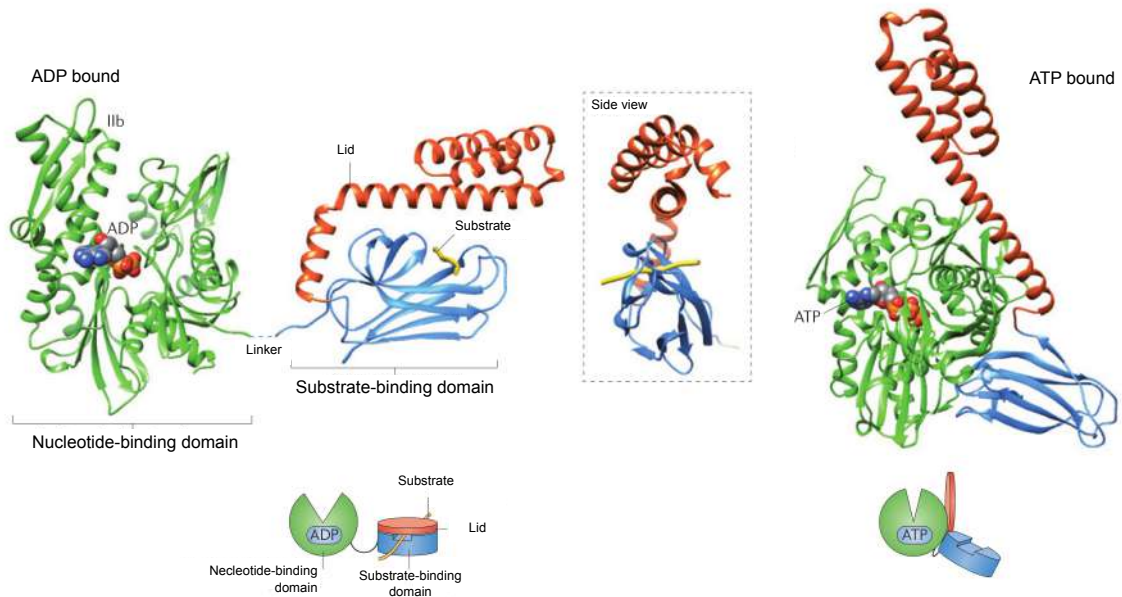
<sup>1</sup>The terms «client» and «substrate» are often used synonymously to define proteins that are the targets of chaperone activity.



**Figure 1. Processes regulated by molecular chaperones of the Hsp70/Hsp40 system.** Adapted from (Mayer, Gierasch, 2019).

is largely similar to that of other ATPases, such as actin or hexokinase (by Saibil, 2013). SBD is directly involved in the binding of the client protein, the interaction with which occurs in a cleft. The SBD structure consists of two important elements - the main part of the domain has a « $\beta$ -sandwich» fold and is denoted as SBD $\beta$ , while the second part has an  $\alpha$ -helical structure (Zhu *et al.*, 1996). The SBD $\alpha$  is connected to the SBD $\beta$  by a mobile region and represents a lid which plays an important role in the function of Hsp70. When the substrate binds in the SBD cleft, and the Hsp70 ATPase is activated, conformational changes occur in the chaperone molecule, which leads to a change in the position of the lid relative to the SBD and its «closure». This process ensures reliable interaction with the substrate and prevents its premature dissociation. In contrast, replacement of ADP with ATP in the NBD leads to release of the substrate protein (Fig. 2).

ATP hydrolysis during substrate binding and substrate release during nucleotide replacement are regulated by Hsp70 cofactors, J-proteins (Hsp40)

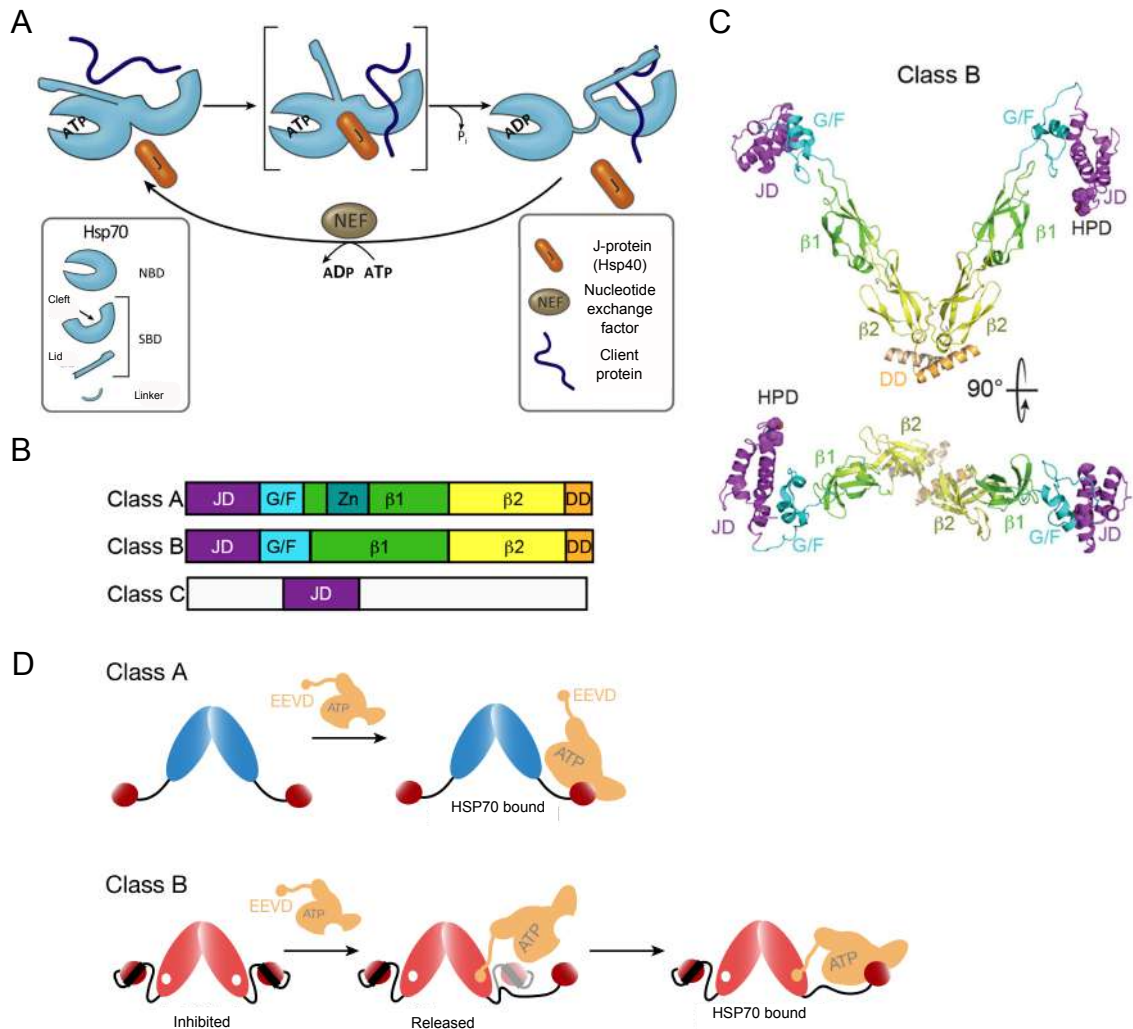


**Figure 2. The structure of the Hsp70 chaperone.** Shown are the spatial structure (top) and a schematic representation (bottom) of the Hsp70 molecule in the ATP-bound (right) or ADP-bound (left) state (Modified from Saibil, 2013).

and nucleotide exchange factors (NEF). Hsp40 stimulate the ATPase activity of Hsp70 when interacting with the client protein, thereby making the client capture process more efficient (Fig. 3A). Hsp40 group proteins (also called J-domain proteins or J-proteins from the name of the first characterized representative of the Hsp40 group, the bacterial protein DnaJ) play a crucial role in determining the substrate specificity of Hsp70 group chaperones (by Craig, Marszalek, 2017; Kampinga, Craig, 2010). Not surprisingly, the number of genes encoding Hsp40 in prokaryotic and eukaryotic genomes is much higher than the number of Hsp70 genes (e.g., humans have 41 such genes and rice has 125 (Powers, Balch, 2013)).

The main domains present in the structure of Hsp40 are the aforementioned J-domain and substrate-binding domain. The J-domain is responsible for interaction with Hsp70 and ATPase activation (Greene *et al.*, 1998); three highly conserved residues in the J-domain sequence that form the HPD motif play a critical role in this process (Tsai, Douglas, 1996). During the stimulation of ATPase activity, the HPD motif interacts with the linker within Hsp70, and the

J-domain itself also interacts with NBD and SBD $\beta$  (Kityk *et al.*, 2018). In most cases, the J-domain is located at the N-terminus of the protein and the substrate-binding domain is located at the C-terminus, and is often referred to as the CTD



**Figure 3. The structure and function of the Hsp40 group cochaperones (J-proteins).** **A.** Schematic illustration of the Hsp70 activity cycle and the involvement of J-proteins in it (adapted from Craig, Marszalek, 2017). **B.** Domain structure of J-proteins of the three major classes (A, B, C). JD is the J domain, G/F is the glycine- and phenylalanine-enriched domain,  $\beta_1$  and  $\beta_2$  are client-binding domains (CTDI and CTDII), and DD is the dimerization domain. **C.** Model of the three-dimensional structure of a class B J-protein. HPD is a motif containing amino acid residues of histidine, proline, and asparagic acid. The motif is critical for J domain activity. (B, C) are adapted from Mayer, Gierasch, 2019. **D.** Scheme of the interaction between Hsp70 and Hsp40 proteins of class A (top) and class B (bottom). J-domain release from G/F inhibition is shown for class B (by Faust *et al.*, 2020).

(C-terminal domain). Due to the wide variety of J-proteins, they are divided into several groups. According to one popular classification, J-proteins can be divided into three classes (Fig. 3B). Class A and B proteins contain (from the N- to the C-terminus) a J domain, a glycine and phenylalanine-rich domain (G/F domain), two consecutive client-binding domains (CTDI and CTDII, or  $\beta_1$  and  $\beta_2$ ), and a dimerization domain (CTD). Class A proteins differ from class B in the presence of a  $Zn^{2+}$ -binding region in CTDI, as well as a relatively shorter length of the G/F domain. Representatives of the third class of J-proteins (class C) have a rather diverse structure, and the J-domain in this structure may be located in different regions of the protein rather than at the N-terminus (Mayer, Gierasch, 2019).

An important functional distinction of some class B proteins is the presence of a special regulatory mechanism called G/F-inhibition (Faust *et al.*, 2020). When interacting with the client, the J-domain of such proteins remains unable to activate the Hsp70 ATPase due to the fact that its interaction with NBD Hsp70 is inhibited by the G/F-domain. To release this inhibition, the CTD of the J-protein must interact with the EEVD motif of Hsp70 (Fig. 3D). Only after this interaction occurs, the J-domain is able to bind to Hsp70 and activate the ATPase. It is worth noting that the process of G/F inhibition is important for both protein refolding and amyloid disaggregation (Faust *et al.*, 2020). This is consistent with evidence that the EEVD motif of Hsp70, which is responsible for G/F-inhibition release, is highly conserved, and its alteration negatively affects the ATPase activity of Hsp70, its binding to the client, and the ability of the Hsp40/Hsp70 system to refold (Freeman *et al.*, 1995). The presence of the G/F-inhibition mechanism may play an important role in the specificity of J-proteins, particularly in their preferential interaction with amyloid aggregates in higher eukaryotes (an example of class B specificity is shown in Scior *et al.*, 2018).

Some researchers point out the shortcomings of this classification of J-proteins (Craig, Marszalek, 2017). For example, many unrelated J-proteins with very different sequences end up in the same class. In particular, this is characteristic of the third class (C), which combines all proteins that do not

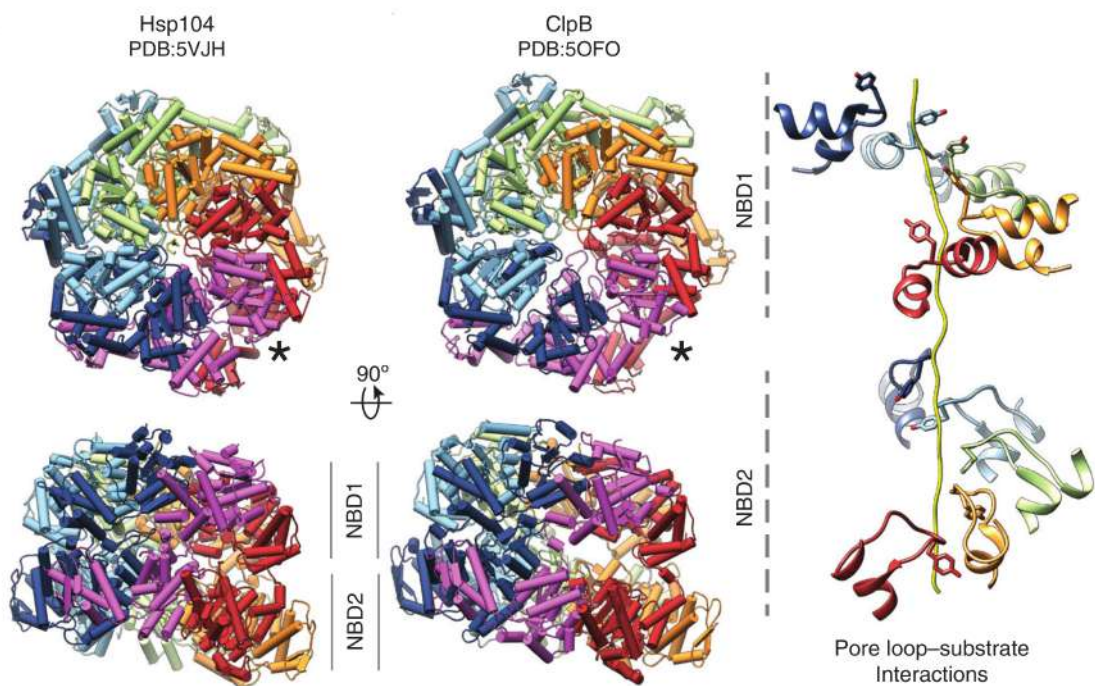
carry the N-terminal J domain and the adjacent G/F-rich domain. Due to such inaccuracies, there is a need to develop a different classification of J-proteins. For example, the presence of characteristic structural elements, such as a client-binding domain with a  $\beta$ -bottom structure (an example of the structure of such a protein belonging to class B according to the traditional classification is presented in Fig. 3B). In addition to structure, client-specificity can be used to divide J-proteins into groups. For example, J-proteins can be subdivided into ones with low substrate specificity and ones that interact with a particular protein or group of proteins (Kampinga, Craig, 2010; Craig, Marszalek, 2017). An example of a J-protein with a specific client is auxilin (Swa2 in yeast), which is involved in the removal of clathrin molecules from the surface of vesicles (Krantz *et al.*, 2013; Rosenzweig *et al.*, 2019).

Nucleotide exchange factors also contribute to the Hsp70 chaperone cycle (see review Rosenzweig *et al.*, 2019). These proteins stimulate the release of ADP, followed by the binding of a new ATP molecule and dissociation of the client. NEFs can be divided into four main families characterized by different structures and origins. In prokaryotes, NEF functions are performed by proteins homologous to GrpE of *E. coli*; in eukaryotes, NEFs are represented by three families: HSP110, Bag, and Armadillo. Interestingly, the proteins of the Hsp110 group (Sse1 in yeast) are homologues of the Hsp70 chaperones and have a similar spatial structure (Liu, Hendrickson, 2007). Nucleotide substitution in the interaction of Hsp110 and Hsp70 is mediated by the direct interaction of their NBDs (Schuermann *et al.*, 2008).

**The Hsp100 family and its role in disaggregation.** Hsp100 family proteins, unlike chaperones of other families, are specialized in unfolding protein molecules and take part in ATP-dependent proteolysis (see Saibil, 2013 for a review). In contrast to the Hsp40/Hsp70 system, the genes encoding Hsp100 are not universally present in all species and are usually represented by individual gene copies (Powers, Balch, 2013). Hsp100 belong to the AAA+ superfamily (ATPases associated with cellular activities), which includes a large number



of proteins present in all organisms (Snider *et al.*, 2008). Such representatives of the Hsp100 group as ClpA, ClpB, HslUV and Hsp104 are well studied. An example of Hsp100 proteins involved in proteolytic protein degradation is HslU of *E. coli*, as well as ClpA, ClpC and ClpX chaperones that work in complex with the protease ClpP (Duran *et al.*, 2017). The HslUV complex, which carries out ATP-dependent proteolysis, consists of two rings, an ATP-ase ring formed by the chaperone HslU and a protease ring composed of HslV molecules (Wang *et al.*, 2001). The HslV ring is responsible for the unfolding of protein molecules before their interaction with the protease. Each of the rings is a hexamer; this shape is characteristic of AAA+ superfamily proteins (Snider *et al.*, 2008). In the middle of the ring there is a central channel (pore) lined with chaperone loop domains involved in interaction with the substrate.



**Figure 4. Spatial structure of Hsp104 and ClpB disaggregases.** Models of the structure of Hsp104 (left) and ClpB (center) are shown. A top view and a side view are shown. NBD1, NBD2 — nucleotide-binding domains 1 and 2. Spatial structure of NBD1 and NBD2 Hsp104 interaction with the substrate in the central channel cavity is shown on the right (modified from Shorter, Southworth, 2019).



Unlike other Hsp100 group proteins involved in ATP-dependent proteolysis, the Hsp104 proteins of yeast *S. cerevisiae* and ClpB of the bacteria *E. coli* are characterized by a unique ability to dissolve protein aggregates (for review, see Shorter, Southworth, 2019). Like other members of the family, ClpB and Hsp104 form ring hexamers, whose monomers form the central pore of the chaperone (Duran *et al.*, 2017) (Fig. 4). The yeast Hsp104 monomer consists of several main domains: the N-terminal domain (NTD), the first nucleotide-binding domain (NBD1), the middle domain (MD), the second nucleotide-binding domain (NBD2), and the C-terminal domain (CTD). NBD1 and NBD2 contain the highly conserved Walker A and B motifs and a number of other structures required for ATP hydrolysis (Sweeny, Shorter, 2016). NBD1 and NBD2 also form the main Hsp104 channel (Fig. 4, right). During disaggregation, the Hsp104 hexamer moves along the protein chain due to coordinated movements of individual protomers. Movement of one of the protomers down the substrate axis is accompanied by activation of the neighboring protomer and its movement up the substrate axis. Similar movements are then performed by the next pair of protomers in the hexamer (this mechanism has been termed a «ratchet» mechanism (Gates *et al.*, 2017)). The movements are ATP-dependent and are mediated by NBD1 activity. The N-terminal domain of Hsp100 family proteins most likely acts as a regulatory element («cap») capable of blocking access to the main chaperone channel after substrate binding (such blocking is shown for ClpB (Deville *et al.*, 2017)). In addition, NTDs are also involved in the interaction of Hsp104 and ClpB with chaperones from other groups, particularly Hsp70 (Lee *et al.*, 2017). This indicates a role for NTDs in the overall control of chaperone-substrate interaction. The regulatory function is also characteristic of NTDs of other members of the Hsp100 family — for example, ClpA (Cranz-Mileva *et al.*, 2008).

**Other groups of chaperones.** Speaking about molecular chaperones and their role in protein quality control, we cannot ignore the representatives of two

important families - Hsp60 and Hsp90. Proteins of the Hsp60 group, also called chaperonins, are divided into two groups, with the first one including bacterial GroE proteins, and the second one comprising eukaryotic CCT chaperonins (for review, see Saibil, 2013). Chaperonins play an important role both in *de novo* protein folding and assembly of protein complexes and in the refolding of damaged proteins (Hemmingsen *et al.*, 1988; Goloubinoff *et al.*, 1989).

Hsp60, like Hsp100, form complexes with ring shape, and each ring is represented by seven or more monomers. The bacterial Hsp60, GroEL, forms a double ring with a molecular weight of over 800 kDa, which binds the substrate in the center of the ring. Another subunit of the chaperonin complex, GroES, binds to GroEL, forming a «cover» (lid) isolating the inner space and substrate (Martin *et al.*, 1993). Thus, chaperonin forms an isolating space («Anfinsen's cage») that allows the spontaneous protein folding process to proceed normally in the chaperonin chamber.

In contrast to Hsp60 chaperonins, the main function of Hsp90 group proteins seems to be not to provide *de novo* folding or refolding, but to regulate intracellular processes by stabilizing protein structures and enhancing maturation of client proteins (reviewed in Taipale *et al.*, 2010; Saibil, 2013). The number of genes encoding Hsp90 family proteins is significantly lower in different organisms than for Hsp70 (Powers, Balch, 2013). Hsp90 is involved in the regulation of signal transduction by steroid hormones through interaction with the corresponding receptors. The function of Hsp90 in stabilizing the folding of proteins with an altered sequence, thereby compensating for the negative effects of mutations, has also been noted. The most surprising example of such «buffering» is shown in studies of eye loss in cavefish (Rohner *et al.*, 2013).

The Hsp90 activity cycle also involves ATP hydrolysis. ATP hydrolysis and nucleotide replacement are accompanied by significant conformational changes in the chaperone molecule. A major role in Hsp90's functions is played by coshaperones, which contribute to client binding and interact with the chaperone at different sites (Taipale *et al.*, 2010).

## 1.2. Prions in yeast *Saccharomyces cerevisiae*

### 1.2.1 Prions and amyloids

Prions were discovered as infectious agents of protein nature, representing self-replicating conformational variants of native proteins. The hypothesis that protein molecules may have infectious properties was proposed by Prusiner to explain the mechanisms of certain human and animal diseases grouped under the name of transmissible spongiform encephalopathies or TSE (Prusiner, 1982). By 1982, sufficient data had accumulated to show that the infectious agent causing such diseases was incredibly small, resistant to boiling, nuclease treatment, and ultrafiltration, and therefore was neither a bacterium, virus, nor any other pathogen known at the time, nor did it contain nucleic acids. To explain the observed picture, Prusiner proposed the hypothesis that the substance causing such diseases as Kreutzfeld-Jakob disease, kuru or scrapie is a protein molecule (prion) capable of reproducing its own structure by changing the conformation of the same protein molecules in the infected organism.

Later it was found that all the described diseases are associated with changes in the conformation of a single protein - PrP, and the specific symptoms of each disease is determined by the conformation that PrP takes. It was shown that specific fibrillar structures formed by the PrP protein (Merz *et al.*, 1984) accumulate in the brains of affected organisms. Later, similar structures formed by other proteins were found in such human neurodegenerative diseases as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Huntington's disease. These diseases are not infectious, but are also characterized by the accumulation of protein plaques in the brain (by Uversky, 2010).

The aggregates found in the brains of patients with prion diseases are amyloid in nature. Amyloids are characterized by a highly ordered structure in which neighboring protein monomers in the aggregate are connected to each other by intermolecular hydrogen bonds (for details, see reviews Wickner *et al.*, 2013; Iadanza *et al.*, 2018; Matiiv *et al.*, 2022). The monomers within a typical amyloid fibril form a «steric zipper» — a tight contact surface formed by the

side radicals of amino acid residues. Due to this tight contact of monomers, amyloids also acquire a number of characteristic properties, such as resistance to treatment with detergents and proteases. Amyloid aggregates also bind to a number of amyloid-specific dyes, such as congo red and thioflavin T (see review Matiiv *et al.*, 2020).

Since both prion diseases and the aforementioned non-infectious neurodegenerative diseases are accompanied by the formation of amyloid aggregates, all these diseases are collectively termed amyloidoses. The corresponding aggregates are therefore called pathological amyloid group (see review Matiiv *et al.*, 2020). At the same time, a large number of proteins that form amyloid aggregates under normal conditions have been characterized in recent years; for some of the proteins, the functional importance of such amyloid aggregates has been shown (see review Sergeeva, Galkin, 2020). One example is the Fxr1 protein, which forms amyloids in the brain of the rat *Rattus norvegicus*. These aggregates are thought to regulate RNA stability (Sopova *et al.*, 2019).

Currently, there are no effective treatments for human and animal amyloidoses. In addition, the properties that distinguish pathological amyloid aggregates from functional ones are unknown. To address this problem, as well as to create approaches to amyloidosis therapy, prions and amyloids are being actively studied in model biological systems, including yeast *S. cerevisiae*. As in higher eukaryotes, both prions and non-infectious functional amyloids have been found in yeast (for details, see Ryzhova *et al.*, 2018).

### **1.2.2 Yeast prions: diversity and properties**

Baker's yeast prions were discovered as early as the middle of the 20th century. In contrast to human and other mammalian prions, yeast prion-like determinants have been described as cytoplasmic hereditary factors of unknown nature characterized by dominant non-Mendelian inheritance (for details, see Liebman, Chernoff, 2012; Crow, Li, 2011). The first such factor was  $\Psi$  ( $[PSI^+]$ ), discovered by Cox in 1965. This factor was characterized by an omnipotent

nonsense-suppressor phenotype, i.e., the ability to suppress the phenotypic manifestation of nonsense mutations (Cox, 1965). At that time, the nature of this factor could not be established. The second yeast prion discovered was the [URE3] factor described by Lacroute in 1971 (Lacroute, 1971). Cells carrying [URE3] could assimilate poor sources of nitrogen, such as ureidosuccinate, in the presence of richer ones, such as ammonium ions ( $\text{NH}_4^+$ ).

In 1994, Wickner used the Prusiner's hypothesis to explain the nature of the  $\Psi$  and [URE3] factors (Wickner, 1994). Wickner formulated the basic genetic criteria necessary to prove the prion nature of the factor: 1) the phenotypic expression of the factor coincides with the phenotype of its structural gene deletion or mutation; 2) the factor is reversibly curable, that is, the cell that lost the prion factor can acquire it again without external interference; and 3) temporary overexpression of the structural gene of the prion increases its induction rate (Wickner, 2012).

Proteins that are structural determinants of [PSI<sup>+</sup>] and [URE3] prions have long been established. The [PSI<sup>+</sup>] prion is an alternative conformational variant of the yeast eRF3 translation termination factor, Sup35. The nonsense suppression observed when Sup35 is converted into the prion form occurs as follows: when Sup35 is prionized, the concentration of its normal form decreases, resulting in no effective stimulation of the activity of another termination factor, eRF1 (Sup45). As a consequence, the efficiency of translation termination decreases, which leads to an increase in the frequency of readthrough of premature stop codons. As a result, the rate of synthesis of the full-length functional gene product containing the nonsense mutation increases, which leads to suppression of its phenotypic manifestation (reviewed in Lieberman, Chernoff, 2012). Meanwhile, the combination of the [PSI<sup>+</sup>] prion with certain missense and nonsense *sup45* mutations leads to too strong translation termination defects causing synthetic lethality (Kiktev *et al.*, 2007).

The structural gene of [URE3] is the *URE2* gene encoding a catabolic repression factor. Normally, in the presence of rich nitrogen sources in the environment, Ure2 inhibits the activity of the transcription factor Gln3, which

activates the ureidosuccinate assimilation genes. When Ure2 is converted to the prion form, it is unable to interfere with Gln3 activity, resulting in activation of the ureidosuccinate assimilation genes and its consumption from the medium even in the presence of more efficient nitrogen sources (Wickner, 1994).

Like the corresponding proteins of higher eukaryotes, the prion proteins of yeast form long unbranched fibrils with an amyloid structure and a set of characteristic properties. The presence of such protein aggregates can be established by semidenaturing electrophoresis in agarose gel (SDD-AGE) (Kryndushkin *et al.*, 2003) as well as by an increase in the protein fraction in the pellet fraction during differential centrifugation of cell lysates (Patino *et al.*, 1996; Kushnirov *et al.*, 2006). Clusters of aggregated protein can also be observed by fluorescence microscopy (Patino *et al.*, 1996). Importantly, the presence of the full-length structural protein of the prion determinant is most often not required for aggregate formation. The part of the protein that is necessary for prion formation and propagation is called the prion domain (Ross *et al.*, 2005). In the Sup35 protein, this domain, called the N-domain, is located at the N-terminus of the polypeptide chain (Ter-Avanesyan *et al.*, 1993; Ter-Avanesyan *et al.*, 1994; Paushkin *et al.*, 1996). In addition to the N-domain, the Sup35 structure also contains two other domains, the charged M-domain (middle domain) and the C-domain (C-terminal domain). The M-domain is a linker and does not take part in the direct formation of the amyloid fibril backbone. The physiological function of the M-domain appears to be to regulate the formation of reversible liquid Sup35 droplets when the pH or salt composition of the cytoplasm changes (Franzmann *et al.*, 2018). The C-domain is the only essential part of Sup35. It is the C-domain that is responsible for Sup35 functioning as a translation termination factor (Zhouravleva *et al.*, 1995; Stansfield *et al.*, 1995). Sup35 N-domain overexpression alone is sufficient for the induction of [*PSI*<sup>+</sup>] (Derkatch *et al.*, 1996). Similarly, overexpression of the *URE2* gene fragment corresponding to the prion domain of the Ure2 protein leads to an increased frequency of [*URE3*] formation (Masison, Wickner, 1995). An interesting structural feature of most known prion domains of yeast proteins

is their enrichment with asparagine (N) and glutamine (Q) residues (Alberti *et al.*, 2009). The critical role of these residues in the formation of prion aggregates was discovered as early as 1998 (DePace *et al.*, 1998). This amino acid composition contributes to the formation of the intermolecular hydrogen bonds necessary for the formation of the parallel superpleated  $\beta$  structure of amyloid fibrils (see Mativ *et al.*, 2022 for a review). Note, however, that mutations affecting the maintenance of yeast prions described in the literature are located both within the prion domains of the corresponding proteins and well beyond them (e.g., Kumar *et al.*, 2020).

The third most studied prion is [*PIN*<sup>+</sup>] (Derkatch *et al.*, 1997), formed by the amyloid form of the Rnq1 protein (Sondheimer, Lindquist, 2000, Derkatch *et al.*, 2001). The only phenotypic manifestation of [*PIN*<sup>+</sup>] is its ability to induce [*PSI*<sup>+</sup>]: the presence of [*PIN*<sup>+</sup>] in the yeast cell increases the frequency of *de novo* [*PSI*<sup>+</sup>] appearance (Derkatch *et al.*, 1997). In contrast to the prion factors described above, the physiological function of the Rnq1 protein is unknown, and mutation or deletion of the *RNQ1* gene does not increase the frequency of [*PSI*<sup>+</sup>] induction (Derkatch *et al.*, 2001). Another known yeast prion is [*SWI*<sup>+</sup>], a prion form of the SWI/SNF chromatin remodeling complex subunit, Swi1 (Du *et al.*, 2008). Phenotypically, the presence of prion [*SWI*<sup>+</sup>] is characterized by a reduced ability of yeast to grow on media with sugars other than glucose (e.g., with raffinose), but in combination with the [*PIN*<sup>+</sup>] prion, [*SWI*<sup>+</sup>] can, as well as [*PSI*<sup>+</sup>], lead to an increase in nonsuppression on a certain genetic background (Nizhnikov *et al.*, 2016). An interesting feature of the [*SWI*<sup>+</sup>] prion is its direct influence on the conformation of transcription factors interacting with it, which, in turn, regulates gene expression depending on [*SWI*<sup>+</sup>]-status of the cell. For example, genes responsible for flocculation and invasive yeast colony growth (Du *et al.*, 2015) are subject to such prion-dependent regulation. The appearance of prion [*SWI*<sup>+</sup>] leads to global changes in the transcriptome (Malovichko *et al.*, 2019). In addition to those described above, other yeast prions and prion-like factors with no less interesting properties have also been discovered. One interesting example is the [*GAR*<sup>+</sup>] factor, which has no amyloid structure (by

Crow, Li, 2011). The appearance of [*GAR*<sup>+</sup>] is caused by an increase in the lactate concentration in the medium, which occurs, for example, in the co-culture of yeast and bacteria cells (Garcia *et al.*, 2016).

An important property of yeast prions is the existence of so-called strains, or variants of the prion (see review by Kushnirov *et al.*, 2022). The presence of variants is not a unique feature of yeast prions — variants have been characterized, for example, for the mammalian PrP protein (see Ghaemmaghami, 2017 for a review). Different prion variants are characterized by different phenotypic strength, which is related to the specific conformation of the protein within the amyloid fibrils, as well as different kinetics of their formation and fragmentation (Derkatch *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 2004). Differences in the structure of aggregates of prion variants can also be observed in the analysis of protease-resistant core of fibrils by mass spectrometry (Kushnirov *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2021). More than 20 different variants are known for the [*PSI*<sup>+</sup>] prion (Huang, King, 2020). The most commonly used are the so-called «strong» and «weak» variants, denoted as [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>S</sup> and [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>W</sup>, respectively (Derkatch *et al.*, 1996). The stronger manifestation of the [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>S</sup> was found to be associated with enhanced conversion of the soluble protein to the prion isoform and its incorporation into aggregates. This is due, among other factors, to a larger number of amyloid fibrils in the cell and their smaller size. In contrast, the weak variant [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>W</sup> has a larger average length of aggregates in combination with a smaller number of them. As a consequence, the fraction of protein in the soluble fraction in [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>W</sup> cells is markedly higher and reaches 20%, compared to 3-5% in the case of [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>S</sup> (Derdowski *et al.*, 2010). It has been suggested that yeast prions exist as a dynamic «cloud of variants», i.e. a number of aggregates of different structures are simultaneously present in the cell, although this concept is not universally accepted (Bateman, Wickner, 2013).



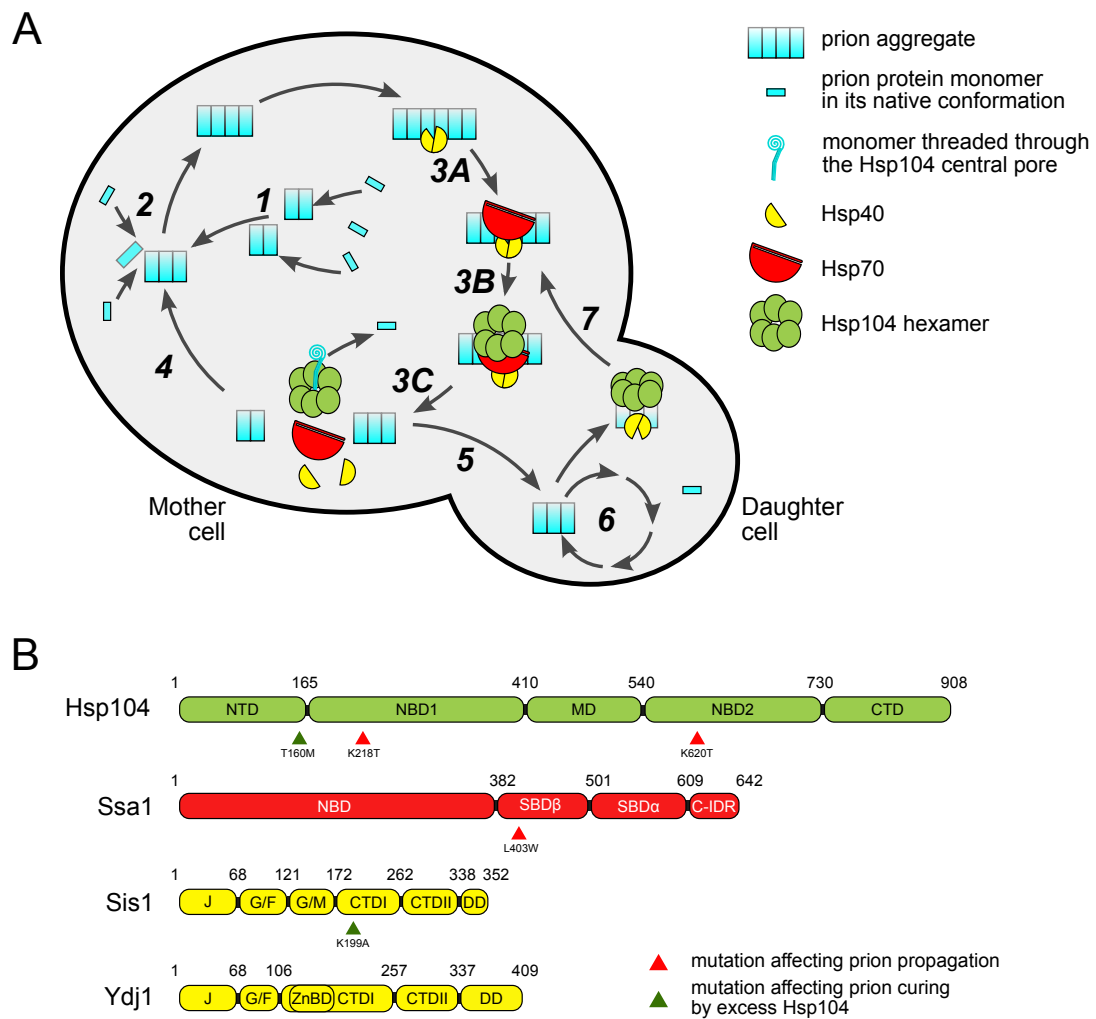
### 1.3. The protein quality control system and yeast prions

The maintenance and propagation of yeast prions is impossible without several key processes: constant conversion of new monomers and their incorporation into existing aggregates, fragmentation of aggregates to form new prion «seeds» (propagons), and transmission of prion seeds to daughter cells (Kushnirov, Ter-Avanesyan, 1998; Inoue, 2009; Chernova *et al.*, 2014; Barbi-toff *et al.*, 2022) The combination of these processes forms the prion life cycle (Fig. 5A). All of the processes that make up the prion life cycle are mediated to some extent by the interaction of the prion with the molecular chaperone system or other components of the PQC system. Both *in vivo* and *in vitro* data suggest a role for chaperones in both prion aggregate formation and prion conversion as well as in amyloid fibril fragmentation (Chernoff *et al.*, 1999; Kushnirov *et al.*, 2000; Shorter, Lindquist, 2004; Krzewska, Melki, 2006; Shorter, Lindquist, 2006; Savistchenko *et al.*, 2008; Shorter, Lindquist, 2008; Kiktev *et al.*, 2015). Next, we will consider in detail the role of major chaperones in the maintenance of yeast prions.

#### 1.3.1 Hsp104 — a key regulator of yeast prion propagation

The main element of the molecular chaperone system necessary for the maintenance of yeast prions is Hsp104, which catalyzes the fragmentation of prion aggregates. The role of Hsp104 in the process of propagation of yeast prion [*PSI*<sup>+</sup>] was demonstrated by Chernoff *et al.* in 1995 (Chernoff *et al.*, 1995). Deletion of Hsp104, expression of the dominant negative allele Hsp104KT, and inhibition of the ATPase activity of Hsp104 by guanidine hydrochloride, results in loss of all amyloid yeast prions (Chernoff *et al.*, 1995; Moriyama *et al.*, 2000; Sondheimer, Lindquist, 2000; Wegrzyn *et al.*, 2001). Overexpression of Hsp104 also results in the elimination of prions, but this elimination is only effective enough for [*PSI*<sup>+</sup>] (Chernoff *et al.*, 1995; Sharma, Masison, 2008a; Matveenko *et al.*, 2018).

The mechanism of prion curing by overexpression of *HSP104* has been the



**Figure 5. The yeast prion life cycle and its control by the molecular chaperone system** **A.** Schematic representation of the processes that form the prion life cycle. 1— Formation of a prion aggregate *de novo*, 2—conversion of new monomers and their incorporation into existing prion aggregates, 3—chaperone-mediated fragmentation of aggregates, 4—continuation of cycle in the mother cell, 5—transfer of prion seeds to daughter cells, 6—repetition of cycle in the daughter cell, 7—retrograde transport of propagons or their retention in mother cell. **B.** Schematic representation of the major chaperones involved in the control of prion maintenance and their domain structure. Red arrows indicate mutations that disrupt prion maintenance, green arrows indicate mutations that prevent prion curing by by *HSP104* overexpression (adapted from Barbitoff *et al.*, 2022).

subject of a large number of studies. Deletion of the N-domain of *HSP104* has been shown to prevent prion elimination during overexpression of this

chaperone, but does not prevent prion maintenance at normal levels of Hsp104 (Hung, Masison, 2006; Winkler *et al.*, 2012b). In addition, a T160M mutation located in the N-domain of *HSP104* (Fig. 5B) leads to similar effects; moreover, [*PSI*<sup>+</sup>] prion variants obtained *de novo* in the presence of this mutation are cured even with normal Hsp104 levels (Gorkovskiy *et al.*, 2017). Three basic models of prion curing by overexpression of *HSP104* have been proposed. The first model suggests that overproduction of Hsp104 distorts the ratio of concentrations of chaperones of different groups in the cytosol, which leads to an incorrect interaction of Hsp104 with the prion aggregate (Winkler *et al.*, 2012a). An alternative model suggests that Hsp104 has the ability to trim monomers from the end of the fibril, which manifests itself during its overproduction and leads to enhanced dissolution of prion aggregates (Paushkin *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2014). Finally, a third model suggests that overproduction of Hsp104 leads to disruption of propagon segregation between the mother and daughter cells (Ness *et al.*, 2017; Cox, Tuite, 2018). There is, however, evidence for a potential mechanistic commonality in the processes of aggregate fragmentation and prion curing by excess of Hsp104. In particular, the aforementioned T160M mutation can destabilize certain [*PSI*<sup>+</sup>] variants and disrupt prion aggregate fragmentation (Huang *et al.*, 2021). Along with this, deletion of the Hsp104 binding site in the Sup35 M-domain (129—148 a.a. region) results in both loss of sensitivity of [*PSI*<sup>+</sup>] to excess Hsp104 and its destabilization (Helsen, Glover, 2012).

It is also interesting to note the effects of replacing Hsp104 with chimeric proteins containing some Hsp104 and ClpB domains. Some such proteins effectively support yeast prions, but the presence of the M-domain of Hsp104 is required for this (Reidy *et al.*, 2012). Of particular interest is the 444B chimeric protein containing NBD2 of ClpB instead of the analogous Hsp104 domain. This variant supports the maintenance of most prions, but can cure only some of their variants when overexpressed (Zhao *et al.*, 2017).

### 1.3.2 The role of Hsp70 in the life cycle of yeast prions

Chaperones of the Hsp70 group also play an important role in the maintenance of yeast prions (Newnam *et al.*, 1999). In yeast, Hsp70 is represented by several gene families; the most active proteins are members of the SSA and SSB groups (Boorstein *et al.*, 1994; Kominek *et al.*, 2013; Lotz *et al.*, 2019). SSA proteins play the greatest role in the prion life cycle (Winkler *et al.*, 2012b). In yeast, there are four homologous genes encoding chaperones of this group: *SSA1*, *SSA2*, *SSA3*, and *SSA4*. All of these genes are interchangeable, and their specificity to different cellular processes is poorly understood (Sharma *et al.*, 2009). The major chaperone of the SSA group in yeast is the Ssa2 protein (Boorstein *et al.*, 1994).

Ssa1, like other Ssa proteins, increases the frequency of  $[PSI^+]$  *de novo* appearance upon overproduction and prevents curing of  $[PSI^+]$  by excess Hsp104 (Newnam *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2005). A dominant negative mutation of *SSA1*, *SSA1-21* promotes the  $[PSI^+]$  prion elimination (Jones, Masison, 2003) but does not affect overall Ssa1 function (Needham, Masison, 2008). The *SSA1-21* mutation is located in the SBD $\beta$  (Fig. 5B) and probably affects the ability of Hsp70 to bind to the client. The effects of this mutation on the prion, however, are variant-specific, since expression of this allele does not result in phenotype changes in some  $[PSI^+]$  strains (Barbitoff *et al.*, 2022). At the same time, overproduction of Ssa1, but not Ssa2, has been found to contribute to  $[URE3]$  prion expulsion (Kushnirov *et al.*, 2000; Schwimmer, Masison, 2002). In our laboratory, however, overexpression of *SSA2*, but not *SSA1*, weakened the  $[URE3]$  phenotype (Matveenko *et al.*, 2018).

In addition to Ssa, other Hsp70s, such as Ssb1/2 and Ssz1, also play a role in the yeast prion life cycle. Both Ssb1 and Ssz1 are actively involved in protein folding during translation and are associated with the ribosome. Ssz1 is part of the ribosome-associated chaperone complex (RAC). Overexpression of *SSB1* leads to increased destabilization of  $[PSI^+]$ ; this effect has been shown to be due to competition between Ssb and Ssa for binding prion aggregates (Chernoff,

Kiktev, 2016). An imbalance in the amount of Hsp70 and Hsp104 in the early stages of short-term heat shock leads to destabilization of  $[PSI^+]$  (Newnam *et al.*, 2011). The *SSB1* deletion reduces the efficiency of prion destabilization in heat shock, whereas the *SSZ1* deletion increases it (Howie *et al.*, 2019).

It has been suggested that the opposite and variable effects of chaperones of SSA, SSB, and SSZ groups are related to their different roles in the processes of folding of the synthesized chain during translation as well as in the fragmentation of aggregates. According to one model, SSB proteins are unable to participate effectively in the fragmentation of prion aggregates, and deletion of RAC components simultaneously leads to increased prion conversion and disruption of the fragmentation of prion aggregates (Kiktev *et al.*, 2015).

### 1.3.3 Differential effects of Hsp40 on prions

Twenty two different J-proteins have been characterized in yeast, each of which has a specific localization in the cell and performs certain functions (Walsh *et al.*, 2004). The most studied are the major cytosolic chaperones of this group, Sis1 and Ydj1. Ydj1 belongs to the first (A) class of J proteins, while Sis1 is a member of the second class (class B) (Fig. 5B). Both Ydj1 and Sis1 are involved in the maintenance of yeast prions; in addition, several other J-proteins — Apj1, Swa2, and Zuo1 — have been shown to affect various prions.

**Sis1.** The *SIS1* gene is essential for yeast, and its product is involved in many processes related to protein synthesis and quality control. The Sis1 protein has a characteristic domain structure of the class II J-protein. It contains an N-terminal J domain, a glycine-rich domain (subdivided into G/F-rich and G/M-rich regions); two C-terminal domains (CTD1/2); and a dimerization domain (DD) (Fig. 5B) (Cheetham, Caplan, 1998). Different prions have different requirements for Sis1 abundance and functionality. For example, the  $[PSI^+]$  prion is very resistant to changes in the amount of Sis1 or its mutations, although a severe decrease in the amount of Sis1 in the cell still leads to loss of the prion after a large number of generations (Higurashi *et al.*, 2008). In contrast, the

other prion, [*URE3*], is very sensitive to changes in Sis1 levels, and is rapidly lost when the expression of the corresponding gene is reduced (Higurashi *et al.*, 2008). The [*PIN*<sup>+</sup>] prion has an intermediate dependence on Sis1 (Aron *et al.*, 2007; Higurashi *et al.*, 2008), although different variants of this prion are characterized by different requirements for its activity (Stein, True, 2014). The yeast [*SWI*<sup>+</sup>] prion is the most sensitive to changes in the amount or activity of Sis1 and is eliminated even when Sis1 levels fluctuate slightly (Hines *et al.*, 2011). Sensitivity to levels of Sis1 activity also differs between prion variants, for example, the expression of different Sis1 variants can affect the competition of prion variants (Yu, King, 2019).

In addition to the overall level of Sis1, the maintenance of the prion depends on the functionality of individual domains of this protein. The G/F region is critical for the maintenance of [*URE3*] and many [*PIN*<sup>+</sup>] variants (Sondheimer *et al.*, 2001; Reidy *et al.*, 2014; Stein, True, 2014). Strong [*PSI*<sup>+</sup>] variants, however, can be maintained even in the absence of the G/F domain of Sis1 (Kirkland *et al.*, 2011; Reidy *et al.*, 2014; Harris *et al.*, 2014). Sis1 overexpression enhances [*PSI*<sup>+</sup>] curing during Hsp104 overproduction (Kryndushkin *et al.*, 2011), which may indicate a role for Sis1 in stimulating Hsp104 function responsible for preventing the transport of prion aggregates into the daughter cell. This suggestion is supported by the fact that deletion of the dimerization domain of Sis1 prevents [*PSI*<sup>+</sup>] elimination during *HSP104* overexpression, but does not result in prion loss at normal Hsp104 levels (Kirkland *et al.*, 2011; Harris *et al.*, 2014). Moreover, deletion of the *SIS1* dimerization domain leads to prion stabilization in the presence of the *SSA1-21* mutation (Kirkland *et al.*, 2011). Similar but less pronounced effects are observed when the lysine residue at the 199 position of Sis1 is replaced with alanine. This K199A mutation is located in one of the substrate-binding regions of Sis1 and directly affects its interaction with the client (Lee *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006).

Sis1 has been shown to reduce the toxicity of [*PIN*<sup>+</sup>] as well as toxicity associated with overproduction of poly-Q region of the mutant huntingtin

protein, and toxicity of the  $[PSI^+]$  prion upon overexpression of the *SFP1* and *SUP35* genes (Gokhale *et al.*, 2005; Douglas *et al.*, 2008; Matveenko *et al.*, 2016). Recently, it has also been demonstrated that the toxicity observed when the normal *SIS1* allele is replaced by a variant containing only the J- and G/F-domains in cells carrying the  $[PSI^+]$  prion is caused by excess Sup35 aggregation and compensated for by Sis1 alone with an intact CTD and dimerization domain (Kumar *et al.*, 2021).

In addition to its direct involvement in prion maintenance, Sis1 is involved in many other processes in the cell. It is the main cochaperone that stimulates the solubilization of proteins that are part of the P-bodies and stress granules in yeast (Kroschwald *et al.*, 2015). In addition, Sis1 transports certain substrates inside the nucleus to degrade them at intranuclear proteasomes (Park *et al.*, 2013). Sis1 is also able to bind oligomeric forms of aggregation-prone proteins, making their aggregates more soluble (Klaips *et al.*, 2020). Thus, Sis1 is an essential element of the PQC system, which is also necessary for the maintenance of prions.

**Ydj1 and other Hsp40.** The most abundant Hsp40 in yeast, however, is another protein, Ydj1. It belongs to the first class of Hsp40 (class A) and, unlike Sis1, is not essential. Ydj1 is also involved in the maintenance of yeast prions. However, overexpression of *YDJ1* cures  $[URE3]$  and enhances  $[PSI^+]$  (Moriyama *et al.*, 2000; Barbitoff *et al.*, 2017). In this case, its J-domain alone is sufficient to exert the specific effect of Ydj1. It is likely that the interaction with the Ydj1 J-domain is sufficient to determine the specificity of the Hsp70 and Hsp90 chaperones, which in turn may affect the functionality of Hsp104 and the efficiency of the latter as a disaggregase (Harris *et al.*, 2014; Reidy *et al.*, 2014).

In addition to the main cytosolic Hsp40, three other representatives of the J-protein family are involved in prion maintenance: Apj1, Swa2, and Zuo1. Zuo1 is a component of the previously mentioned RAC, and its effect on prions is similar to that of Hsp70-Ssz1. Deletion of the *ZUO1* gene increases the rate of  $[PSI^+]$  induction and promotes prion curing in heat shock (Amor *et al.*, 2015;

Kiktev *et al.*, 2015; Howie *et al.*, 2019). Apj1 promotes [*PSI*<sup>+</sup>] elimination during *HSP104* overexpression, and its deletion prevents this process, but only in the case of a strong [*PSI*<sup>+</sup>] variant (Astor *et al.*, 2018). Apj1 contains a special QS domain in its structure, characterized by intrinsic disorder. It is this domain, but not the Apj1 CTD, that is required for prion curing by excess Hsp104 (Berger *et al.*, 2020). Swa2, the yeast homologue of auxilin, is required to maintain the prion [*URE3*], which is destabilized by deletion of the corresponding gene (Higurashi *et al.*, 2008; Troisi *et al.*, 2015).

**Hsp40 and protein sorting.** In addition to their main role in regulating the activity and substrate specificity of Hsp70, J-proteins are also involved in the processes of protein sorting in eukaryotic cells. Sorting processes involve the distribution of aggregates into various subcellular PQC compartments. There are several such compartments in the eukaryotic cell, but their specific role and number are still the subject of research. Three compartments are considered to be the main accumulation sites of misfolded proteins: the intranuclear quality control deposit (INQ, previously considered to be juxtannuclear (JUNQ)), and two cytosolic ones: the peripheral insoluble protein deposit (IPOD), and the more labile cytoplasmic inclusions called Q-bodies or CytoQ (Kaganovich *et al.*, 2008; Escusa-Toret *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2015a; Miller *et al.*, 2015b).

IPOD is considered to be a site of accumulation of proteins that are irreversibly misfolded — in particular, aggregates of yeast prionogenic proteins are observed in IPOD, especially when they are overproduced (Kaganovich *et al.*, 2008). In contrast, INQ and CytoQ are sites of accumulation of amorphous, unstructured protein aggregates and serve the function of temporarily isolating misfolded proteins. According to this model, INQ and CytoQ form primarily under stress conditions (Miller *et al.*, 2015b). In recent years, the accumulation of proteins in CytoQ, INQ, and IPOD has come to be regarded as one of the main scenarios of the PQC system, helping the cell to cope with an excess of misfolded proteins. Consistent with this hypothesis, protein isolation in CytoQ/INQ has been shown to maintain the functionality of the Hsp70



system under stress (Ho *et al.*, 2019). Sorting into each of the compartments is accomplished by various chaperones and protein sorting factors, the main ones of which — Btn2 and Hsp42 — are also referred to as aggregases. Btn2 protein controls aggregate transport in JUNQ/INQ and Sis1 (Malinovska *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2015a) is actively involved in this process; Hsp42 controls protein transport into cytoplasmic compartments — IPOD and CytoQ (Specht *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2015a).

Overexpression of Hsp42 and Btn2 is known to eliminate [URE3] (Kryndushkin *et al.*, 2008; Wickner *et al.*, 2014), and overexpression of *BTN2* can also cure artificial [NRPIC<sup>+</sup>] prion formed by a chimeric protein consisting of the prion domain of Nrp1 and the C-terminal domain of Sup35 (Malinovska *et al.*, 2012). In addition, overproduction of Hsp42 leads to enhancement of the prion phenotype of [PSI<sup>+</sup>], although the molecular mechanisms of this effect remain poorly understood (Barbitoff *et al.*, 2017).

The *CURI* gene (from Curing of [URE3]) is a paralog of the *BTN2* gene that arose from a whole-genome duplication in yeast evolution (Byrne, Wolfe, 2005). In 2008, the ability of *CURI* to cure yeast prion [URE3] when overexpressed was first demonstrated (Kryndushkin *et al.*, 2008). A similar effect was observed for [NRPIC<sup>+</sup>] (Malinovska *et al.*, 2012) and [PSI<sup>+</sup>] (Zhao *et al.*, 2018). Overexpression of *CURI* leads to a change in the intracellular localization of Sis1 (Malinovska *et al.*, 2012); and such an anti-prion effect of the change in Sis1 localization is expected given the dependence of all prions on the level of this Hsp40 (see above). More recently, Cur1 and Btn2 have been shown to cure some [URE3] variants even without artificial overexpression (Wickner *et al.*, 2014).

In our laboratory, the *CURI* gene was identified in a yeast genomic library screening as a gene that enhances synthetic lethality of *sup45* mutations with [PSI<sup>+</sup>] (Kiktev *et al.*, 2011). It was further shown that overexpression of *CURI* specifically enhances the [PSI<sup>+</sup>] phenotype. Thus, *CURI* overexpression affects different yeast prions in opposite ways. However, in both [PSI<sup>+</sup>] and [URE3] strains the intracellular localization of Sis1 is altered upon Cur1

overproduction (Barbitoff *et al.*, 2017). This observation suggests that changes in the intracellular balance of Sis1 and reduction in its cytosolic concentration may have a positive effect on the maintenance and propagation of some prions (e.g., [PSI<sup>+</sup>]). This hypothesis, however, requires further testing.

#### 1.4. Conclusion

Since the discovery of molecular chaperones, various classes of these proteins have been described. Advances in structural biology have made it possible to decipher in detail the functional cycle of such complex molecular machines as the Hsp104 and ClpB disaggregases. At the same time, the increasing amount of information about the various chaperones and other elements of the PQC system led to the birth of a «chaperone network» or «proteostasis network» concept — a complex system with large number of components working together to maintain proteostasis (Balch *et al.*, 2008).

Given the overall complexity of chaperone networks, it is not surprising that molecular chaperones of different groups have a significant effect on yeast prions, both supporting their maintenance and inhibiting it. At the same time, the mechanisms underlying the differential effects of chaperones on prions are poorly characterized. As indicated above, such differential effects have been convincingly shown for Ydj1 and the protein sorting factor Cur1, whose effects are mediated by Sis1. Taking into account the central role of J-proteins in the substrate specificity of Hsp70, we can assume that the observed differential effects reflect the role of J-proteins in determining the fate of protein aggregates in eukaryotic cells. Thus, investigation of the mechanisms of the observed effects will help to understand the principles of interaction between chaperone networks and amyloid aggregates. This may in turn aid the development of new approaches to the therapy amyloidoses in higher eukaryotes.

## Chapter 2. Materials and methods

### 2.1. Yeast and bacteria strains

A list of the *E. coli* strains used in this work is presented in Table 1. The DH5 $\alpha$  strain was used for plasmid production; BL21 (DE3), NiCo21 (DE3), Rosetta (DE3), and Zeta strains were used for yeast protein production and purification. The Zeta strain (provided by V.E. Tworogova) is derived from Rosetta (DE3) and exhibits different growth and protein production characteristics from the original strain.

A list of the yeast strains used in this work is presented in Table 2. The yeast strain 2-prb1 $\Delta$ 0-P-74-D694 was used for the production and purification of proteins. This strain is a derivative of the commonly used 74-D694 strain. The strain carries a deletion of the *PRB1* gene encoding vacuolar protease B (Moehle *et al.*, 1987). The U-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 strain was obtained by replacing the pRS315-SIS1 plasmid in the T-P<sup>T</sup>-YAL2171 strain (Barbitoff *et al.*, 2022) with the YCplac33-SIS1 plasmid. L-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 and L $\Delta$ -T-P<sup>T</sup>-YAL2171 strains were obtained by replacing the YCplac33-SIS1 plasmid in U-T-P<sup>T</sup>-

**Table 1.** *E. coli* strains used in the study

Strain name	Genotype	Origin
DH5 $\alpha$	<i>supE44 <math>\Delta</math>lacUI69 (<math>\phi</math>80 lacZ<math>\Delta</math>M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA</i>	Hanahan, 1983
BL21 (DE3)	<i>F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) <math>\lambda</math>(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5])</i>	Studier, Moffatt, 1986
NiCo21 (DE3)	<i>ompT gal [dcm] [lon] <math>\Delta</math>hsdS glmS6Ala arnA::CBD slyD::CBD can::CBD fhuA2 (<math>\lambda</math> DE3) <math>\lambda</math> DE3 = <math>\lambda</math> sBamHIo <math>\Delta</math>EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 <math>\Delta</math>nin5</i>	NEB #C2529H
Rosetta (DE3)	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdSB(RB- mB-) gal dcm<math>\lambda</math>(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5]) pRARE (CamR)</i>	Novagen #70954 (provided by K. Volkov)
Zeta	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdSB(RB- mB-) gal dcm<math>\lambda</math>(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5]) pRARE (CamR)</i>	provided by V. Tworogova

**Table 2.** *S. cerevisiae* strains used in the study

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

YAL2171 with the YCplac111-SIS1 or YCplac111-SIS1ΔDD, respectively.

## 2.2. Plasmids

The plasmids used in this work are shown in Table 3. The primer sequences used to construct the plasmids are shown in Table 4. To construct the pPROEX-HTb-RNQ1 and pPROEX-HTb-HSP104 plasmids (Fig. 6A-B), we cloned

**Table 3.** Plasmids used in the study

Plasmid name	Description	Origin
pPROEX-HTb-RNQ1	AmpR, <i>HTb-RNQ1</i>	This work
pID129	AmpR, <i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P<sub>RNQ1</sub>-RNQ1</i>	Kadnar <i>et al.</i> , 2010
pET-20b-SUP35NM	AmpR, <i>SUP35NM-His<sub>6</sub></i>	Allen <i>et al.</i> , 2005
pET-20b-SUP35NM-M1	AmpR, <i>SUP35NM-M1-His<sub>6</sub></i>	Bondarev, 2014
pET-20b-SUP35NM-M2	AmpR, <i>SUP35NM-M2-His<sub>6</sub></i>	Bondarev, 2014
pET-20b-SUP35NM-M4	AmpR, <i>SUP35NM-M4-His<sub>6</sub></i>	Bondarev, 2014
pET-20b-SUP35NM-M5	AmpR, <i>SUP35NM-M5-His<sub>6</sub></i>	Bondarev, 2014
pET-20b-SUP35NM $\Delta$ BS	AmpR, <i>SUP35NM<math>\Delta</math>BS-His<sub>6</sub></i>	This work
pPROEX-HTb-Sis1	AmpR, <i>HTb-SIS1</i>	Shorter, Lindquist, 2004
pPROEX-HTb-Sis1 $\Delta$ DD	AmpR, <i>HTb-sis1<math>\Delta</math>DD</i>	This work
pPROEX-HTb-HSP104	AmpR, <i>HTb-HSP104</i>	This work
pGPD-HSP104	AmpR, $2\mu$ , <i>URA3</i> , <i>P<sub>TDH3</sub>-HSP104</i>	A. Rubel, unpublished
pPROEX-HTb-HSP104 $\Delta$ N	AmpR, <i>HTb-HSP104<math>\Delta</math>N</i>	This work
pTEF-SSA1	AmpR, <i>CEN</i> , <i>URA3</i> , <i>P<sub>TEF1</sub>-His<sub>6</sub>-Xpress-SSA1</i>	James <i>et al.</i> , 1997
pTEF-SSA1-21	AmpR, <i>CEN</i> , <i>URA3</i> , <i>P<sub>TEF1</sub>-His<sub>6</sub>-Xpress-SSA1-21</i>	This work
pRS426	$2\mu$ , <i>URA3</i>	Christianson <i>et al.</i> , 1992
pRS426-CUR1	$2\mu$ , <i>URA3</i> , <i>P<sub>CUR1</sub>-CUR1</i>	Barbitoff <i>et al.</i> , 2017
pRS426-cur1 $\Delta$ 3-22	$2\mu$ , <i>URA3</i> , <i>P<sub>CUR1</sub>-cur1<math>\Delta</math>3-22</i>	Barbitoff <i>et al.</i> , 2017
pRS315	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i>	Sikorski, Hieter, 1989
YCplac111	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i>	Gietz, Sugino, 1988
pRS315-SIS1	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P<sub>SIS1</sub>-SIS1</i>	Gokhale <i>et al.</i> , 2005
YCplac111-SIS1	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P<sub>SIS1</sub>-SIS1</i>	This work
YCplac111-SIS1 $\Delta$ DD	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P<sub>SIS1</sub>-sis1<math>\Delta</math>DD</i>	This work
pAG415ADH1-Sis1-EGFP	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P<sub>ADH1</sub>-SIS1-EGFP</i>	Malinovska <i>et al.</i> , 2012
pAG415ADH1-NLS-Sis1-EGFP	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P<sub>ADH1</sub>-NLS-SIS1-EGFP</i>	Malinovska <i>et al.</i> , 2012
pAG415ADH1-NES-Sis1-EGFP	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P<sub>ADH1</sub>-NES-SIS1-EGFP</i>	Malinovska <i>et al.</i> , 2012
pAG415ADH1-Sis1 $\Delta$ DD-EGFP	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P<sub>ADH1</sub>-sis1<math>\Delta</math>DD-EGFP</i>	Malinovska <i>et al.</i> , 2012
pR16CUP-SUP35NM-yTagRFP-T	<i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>P<sub>CUP1</sub>-SUP35NM-yTagRFP-T</i>	A. Matveenکو, unpublished

fragments of pID129 (Kadnar *et al.*, 2010) and pGPD-HSP104 (A. Rubel, unpublished) plasmids obtained by treatment with BamHI and SacI restriction enzymes into the pPROEX-HTb-Sis1 (Shorter, Lindquist, 2004) plasmid backbone treated with the same enzymes. To create a construct carrying a mutant variant of Sis1 without a dimerization domain (Sis1 $\Delta$ DD) (Fig. 6C), we amplified the corresponding *SIS1* gene fragment from the pPROEX-HTb-Sis1 construct using M13rev(-48)20-mer and Sis1-deltaDD-SacI-End-R primers. The resulting amplified fragment was treated with BamHI and SacI restriction enzymes and ligated into the pPROEX-HTb-Sis1 plasmid backbone treated accordingly (Barbitoff *et al.*, 2020). The resulting plasmids were verified by restriction analysis using BamHI and SacI.

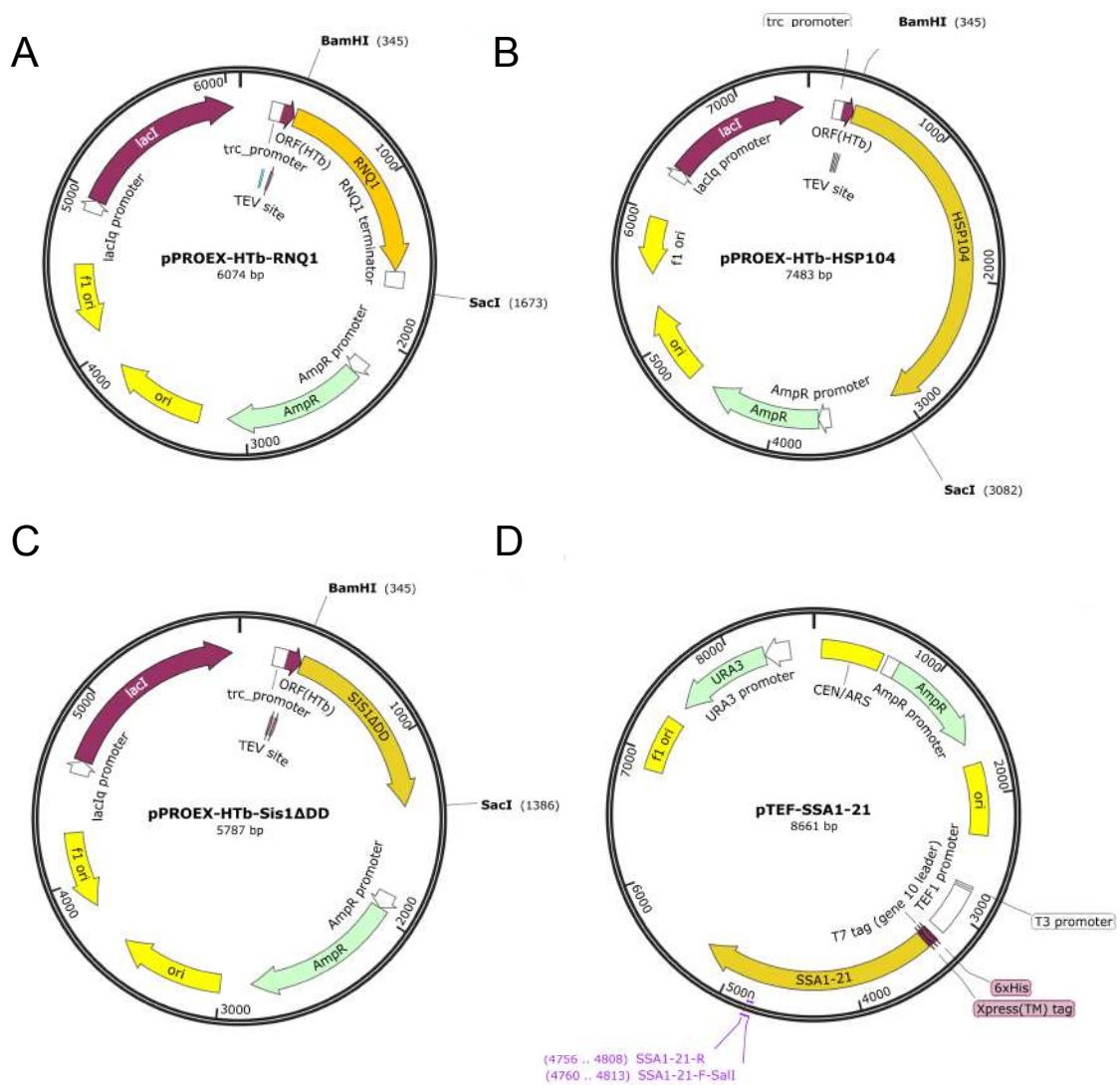
The pPROEX-HTb-HSP104 $\Delta$ N construct was obtained by amplifying a sequence fragment of the *HSP104* gene, which does not contain the NTD, using the Hsp104-delN147-BamHI and Hsp104CloneRS primers followed by treatment of the resulting PCR product with BamHI and SacI enzymes and ligation into the initial plasmid backbone treated with the same enzymes.

The YCplac111-SIS1 plasmid was obtained by cloning a fragment of pRS315-SIS1 plasmid obtained by digesting it with BamHI and SalI into the YCplac111 vector backbone treated with the same enzymes. To obtain the YCplac111-SIS1 $\Delta$ DD construct, we replaced a fragment of the YCplac111-SIS1 plasmid containing the 3' region of the *SIS1* gene with the corresponding

**Table 4.** PCR primers used in the study

Primer	Sequence (5' $\rightarrow$ 3')
M13rev(-48)20-mer	agcggataacaatttcacac
Sis1-deltaDD-SacI-End-R	cgtcGAGCTCTCA $\Delta$ tattggatagtcacttt
Hsp104-delN147-BamHI	agctGGATCCatgcgtggaactagaattgact
Hsp104CloneRS	gactcgagctcttaacttaggtcatcaatttc
supa1_R	ggaactggagacaagcttcaaagtctttgctttgaaagtcgtca
supa2_F	atgtctttgaacgactttcaaaagcaaaagactttgaagcttgctcca
SSA1-21-F-SalI	tttcgatgtcgactctaacggattttGgaatgtttccgccgtc $\Delta$ aaaagggtac
SSA1-21-R	cttttcgacggcggaacattcCaaataccgtagagtcgacatcgaagtga

Restriction sites (in the Hsp104-delN147-BamHI and Sis1-deltaDD-SacI-End-R primers) and stop codon (in case of Sis1-deltaD-SacI-End-R) are highlighted in capital letters.



**Figure 6. Some plasmid constructs obtained during this work** Plasmid maps of pPROEX-HTb-RNQ1 (A), pPROEX-HTb-HSP104 (B), pPROEX-HTb-Sis1ΔDD (C) and pTEF-SSA1-21 (D). The restriction sites and primers used for construction are marked on the maps.

region from the pPROEX-HTb-Sis1ΔDD plasmid using XhoI and SacI.

Construction of pET-20b-SUP35NM $\Delta$ BS (A. Mikhailichenko, unpublished) and pTEF-SSA1-21 (Fig. 6D) (Barbitoff *et al.*, 2022) was performed using the site-directed mutagenesis technique. For this purpose, we amplified the corresponding plasmid (pET-20b-SUP35NM or pTEF-SSA1) using the AccuPrime<sup>TM</sup> Pfx high-fidelity polymerase (Invitrogen, #12344-024) using the corresponding primer pair (supa1\_R and supa2\_F for pET-20b-SUP35NM $\Delta$ BS or SSA1-21-F-SalI and SSA1-21-R in the case of pTEF-SSA1-21).

All obtained plasmid constructs were verified by Sanger sequencing at the Research Center for Development of Molecular and Cellular Technologies of SPbU.

### 2.3. Media and growth conditions

Bacteria were cultured in Petri dishes at 37° C on standard LB bacterial medium (20 g agar, 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl per 1 l of medium) with the addition of ampicillin at a concentration of 100  $\mu$ g/ml if necessary.

Liquid LB and 2TY (16 g tryptone, 10 g yeast extract, 10 g NaCl per 1 l of medium) media (Sambrook *et al.*, 1989) were used to obtain suspension cultures of bacteria, with ampicillin at a concentration of 100  $\mu$ g/ml added if needed. 2TY medium with the addition of ampicillin was used to cultivate bacteria producing heterologous proteins.

Yeast was cultured on standard yeast media: YEPD (Kaiser *et al.*, 1994), 1/2 YEPD (Brachmann *et al.*, 2005), 1/4 YEPD (Eaglestone *et al.*, 2000) and SC (Kaiser *et al.*, 1994). Yeast was incubated at 30° C or at elevated temperatures (34° C for some experiments) to increase molecular chaperone levels.

Yeast carrying plasmids for purification of the target proteins was cultured at 30° C in standard yeast SC medium (Kaiser *et al.*, 1994) overnight without the addition of uracil, after which the culture was diluted with fresh medium to a final OD<sub>600</sub> = 0.1. The cells were grown to OD<sub>600</sub> = 2.0, then harvested by centrifugation.



## **2.4. Genetic methods**

### **2.4.1 Transformation of yeast and bacteria**

Yeast cells were transformed using a standard technique using lithium acetate and single-stranded DNA (Gietz *et al.*, 1992).

Cells of *E. coli* BL21 (DE3), NiCo21 (DE3), Rosetta (DE3), and Zeta strains were transformed with plasmids for heterologous protein production using a standard protocol with calcium chloride (Sambrook, Russell, 2006). Competent cells of DH5 $\alpha$  used in the production and construction of plasmids were transformed according to the standard procedure (Sambrook *et al.*, 1989) for competent cells.

### **2.4.2 [URE3] prion loss rate estimation**

The previously described method (Kryndushkin *et al.*, 2008) was used to calculate the [URE3] loss rate. The OT520 strain was transformed with plasmids for overexpression of the studied genes. The obtained transformants were inoculated into YEPD medium after 5 days following transformation. The culture was grown to optical density OD<sub>600</sub> = 0.75 and plated on solid 1/2 YEPD medium. The loss rate was assessed by counting the number of red and white colonies using ImageJ. At least 4 independent transformants were analyzed for each construct.

## **2.5. Fluorescence microscopy**

For fluorescence microscopy, cells were grown in appropriate selective liquid medium to OD<sub>600</sub> = 0.7. Cells were precipitated by centrifugation, then diluted in a small amount of medium, and 5  $\mu$ l of cell suspension was transferred onto a slide. Cell suspension was then mixed with 5  $\mu$ l of 50% glycerol. The obtained samples were analyzed using a Zeiss Axioscope A1 wide-field fluorescence microscope. A ZEISS Axiocam 506 color camera and the manufacturer's ZEN software were used to obtain images. The images were processed using ImageJ and GIMP v. 2.10.18.

## **2.6. Methods of molecular biology**

### **2.6.1 Polymerase chain reaction**

Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a volume of 10  $\mu$ l using a T100 amplifier (BIO-RAD) according to the protocol recommended by the manufacturer of DNA polymerase. The primers used for PCR in this study are shown in Table 4. Phusion DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, F530S) was used to amplify target fragments during cloning. AccuPrime<sup>TM</sup> Pfx polymerase (Invitrogen, #12344-024) was used for site-directed mutagenesis.

### **2.6.2 Restriction**

Restriction of plasmid DNA or PCR fragments was performed in a volume of 10  $\mu$ l per reaction. BamHI, Sall, and SacI restriction enzymes (Thermo Fisher Scientific) were used for restriction. Reaction conditions were chosen according to the protocol recommended by the enzyme manufacturer.

### **2.6.3 DNA fragment ligation**

Ligation of DNA fragments at the sticky ends was performed using phage T4 ligase (Thermo Fisher Scientific). DNA fragments were mixed in a molar ratio of 1:5 (plasmid backbone:embedded fragment). Ligation was performed overnight at room temperature, after which the enzyme was inactivated by incubating the mixture at 70° C for 5 minutes.

### **2.6.4 Plasmid DNA extraction from bacteria**

Plasmid DNA was isolated from bacteria using the GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the instructions provided with the kit. The concentration and purity of isolated DNA were assessed using the NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

### 2.6.5 DNA electrophoresis

Agarose gel (1% agarose (w/v) in 0.5x TBE) was used for electrophoretic separation of DNA fragments. Electrophoresis was performed in a horizontal electrophoresis chamber (BIO-RAD) at 90 V for 45 min. DNA staining was performed by incubation in ethidium bromide solution for 15 min. 1kb ladder (SibEnzyme #M12) was used as a marker of DNA molecular weight.

### 2.6.6 Protein extraction and electrophoresis

To analyze protein levels in yeast cells using denaturing electrophoresis in polyacrylamide gel (SDS-PAGE), protein isolation from yeast cells was performed using the alkaline lysis method (Kushnirov *et al.*, 2000, Zhang *et al.*, 2011). To prepare the lysate, we used 1.5 ml of culture with optical density  $OD_{600} = 0.75$ .

To analyze protein production levels in the bacterial cells using SDS-PAGE, 100  $\mu$ l of standard sample buffer (Sambrook *et al.*, 1989) was added to the bacterial cells obtained from 1 ml of suspension culture and boiled for 5 minutes. After boiling, the lysate was centrifuged for 5 minutes at 13200 rpm to remove cell debris.

SDS-PAGE was performed according to the standard technique (Laemmli, 1970). PageRuler+ Prestained Protein Ladder (BIORAD) or Spectra BR Prestained Protein Ladder (BIO-RAD) was used as a molecular weight marker. After electrophoresis, the gel was subjected to Coomassie staining or semi-dry protein transfer to a PVDF membrane (GE Healthcare) using a BIO-RAD TransBlot Turbo instrument according to the standard protocol (voltage used: 25 V, transfer time: 30 min).

For Western blotting, the membrane was incubated for 15 min in a 1% (w/v) blocking agent solution (GE Healthcare) in TTBS buffer (9 g NaCl, 15 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 ml Tween 20 per 1 l). After incubation of the membrane with the appropriate primary antibodies (Table 5) and secondary antibodies (GE Healthcare), the results were detected using the GeneGnome

instrument (SynGene) and ECL Select Western Blot Detection Reagent kit (GE Healthcare).

### 2.6.7 Semi-denaturing agarose gel electrophoresis (SDD-AGE)

SDD-AGE (Kryndushkin *et al.*, 2003) was performed as described (Halfmann, Lindquist, 2008; Drozdova *et al.*, 2020). Yeast cell lysis for SDD-AGE was performed according to the protocol using glass beads (Drozdova *et al.*, 2020). Electrophoresis was performed at 30 V on ice. Proteins were transferred to the PVDF membrane (GE Healthcare) using the capillary transfer technique described in Halfmann, Lindquist, 2008. In some cases, a 1kb DNA ladder (SibEnzyme #M12) was used to estimate the size of amyloid aggregates using the AGECalibratoR technique (Drozdova *et al.*, 2020).

## 2.7. Preparation of yeast chaperone and amyloid fibril samples *in vitro*

### 2.7.1 Optimization of protein production conditions

Optimal conditions for protein production were selected by analyzing the amount of protein in cell lysates of different strains at different cultivation temperatures. Bacteria transformed with constructed plasmids were grown overnight, then the culture was diluted 100-fold and the expression of the target protein was induced by adding IPTG to a final concentration of 1 mM. Samples collected from cultures at the beginning of the experiment and 2 and 5 hours after addition of IPTG were analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie R250 staining or Western blot hybridization. Optimal production levels were observed in the following strains: BL21 (DE3) for Rnq1 and Sis1 $\Delta$ DD, NiCo21

**Table 5.** Primary antibodies used in the study

Antibody name	Antigen(s)	Dilution	Origin
anti-Hsp104	Hsp104	1:1000	Abcam, #ab69549
SE4290	Sup35, Sup35NM	1:1000	Chabelskaya <i>et al.</i> , 2004
SS2	Sis1	1:750	Barbitoff <i>et al.</i> , 2017
anti-His <sub>6</sub>	His <sub>6</sub>	1:4000	GE Healthcare, #27-4710-01

(DE3) for Sup35NM and its variants, and Rosetta (DE3) for Sis1.

### 2.7.2 Protein purification

To purify yeast prionogenic proteins, we transformed cells of the corresponding *E. coli* strain with a plasmid to produce the target protein. The resulting transformants were grown in 2TY medium supplemented with ampicillin to  $OD_{600} = 0.3$ , then IPTG was added to a final concentration of 1 mM and incubated under optimal conditions for the specific target protein. For chromatographic purification of the protein under denaturing conditions, lysis buffer A containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 8 M urea was added to the precipitated cells at a volume of 3 ml of buffer per 1 g of cells and incubated at room temperature for 1 hour. The resulting lysate was then clarified by centrifugation at 30,000 g for 20 minutes. The supernatant fraction was used for purification.

When molecular chaperones were purified under non-denaturing conditions, lysis buffer B (buffer composition: 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 20 mM imidazole) (Krzewska, Melki, 2006) (3 ml per 1 g of cells) and lysozyme (800  $\mu$ g per 1 g cells) were added to cells pellet. The suspension was incubated on ice for 30 minutes. After that, sodium deoxycholate was added to the suspension at the concentration of 4 mg per 1 g of cells, and the mixture was incubated for another 30 minutes on ice. The treated cells were lysed by ultrasound treatment (8 cycles of 15 seconds at 80% power). The lysate was clarified by the same procedure as described above for amyloidogenic proteins.

To purify proteins from *S. cerevisiae* cells transformed with the plasmid to produce the corresponding protein were grown at 30° C in SC medium (Kaiser *et al.*, 1994) and precipitated by centrifugation. For protein isolation, lysis buffer B with protease inhibitors (Sigma) (20  $\mu$ l per 1 ml of buffer) was added to the cell precipitate. The buffer was added to a final volume of 1 ml per 1 g of cells. Lysis was performed using glass beads and a homogenizer according to the standard procedure (Drozdova *et al.*, 2020).

A 5-mL Ni-NTA agarose column (GE Healthcare) and an NGC

chromatography system (BIO-RAD) were used for purification of the proteins. Purification was performed at a current rate of 5 ml/min. Washing of the column after cell lysate application was performed using an appropriate lysis buffer (the volume of wash buffer was equal to 10 column volumes). Elution was performed using a similar buffer with a linear gradient of imidazole concentration (from 20 to 250 mM); the eluate volume was equal to 10 column volumes. Fractions were collected using an automated fraction collector (BIO-RAD). Initial estimation of the amount of protein in the fractions was made by the change in absorbance of ultraviolet light with wavelength  $\lambda = 280$  nm. Selected fractions were further analyzed by SDS-PAGE.

Peak eluate fractions containing yeast amyloidogenic proteins were combined and 4 volumes of 100 % methanol were added. The resulting solution was incubated overnight at 4 ° C, after which it was centrifuged for 30 minutes at 7000 g to precipitate the denatured protein. The precipitated protein was collected in microtubes, 200  $\mu$ l of pure methanol was added, and centrifuged again for 30 minutes at 14,000 g. The protein preparation was stored at -80° C.

After purification of proteins under native conditions, proteins were concentrated and buffer was replaced on AmiCon Ultra-15 centrifuge concentrators with a 3 kDa molecular weight cutoff (Merck (Millipore)). The following buffers were used to store the purified chaperone samples: for Sis1 and Sis1 $\Delta$ DD, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM KCl, 5 mM BME, 10% glycerol; for Ssa1, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM KCl, 5 mM BME, 10% glycerol; for Hsp104, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 5 mM BME, 0.01% Triton X-100, 5 % glycerol. Concentrated proteins in the appropriate buffer were snap-frozen with liquid nitrogen and then stored at -80° C.

### **2.7.3 Amyloid fibril generation**

For amyloid fibril generation the amyloidogenic proteins were precipitated by centrifugation, and then the precipitate was dried using a vacuum concentrator (20 min at 2000 rpm). The resulting dry precipitate was dissolved in a small volume (5-20  $\mu$ l) of buffer containing 6 M GuHCl, 20 mM Tris-

HCl, pH 8.0, and 150 mM NaCl. Protein concentration was measured based on the ultraviolet absorption spectrum using the NanoDrop 2000 instrument (ThermoFisher). The protein was then diluted with fibril buffer to the desired final concentration. The composition of the solution to obtain the fibrils was as follows: 150 mM NaCl, 5 mM KPO<sub>4</sub> (pH = 7.4). For Rnq1 fibrilization, the buffer also contained 4 M urea. To verify the presence of detergent-resistant aggregates in solution, SDS-PAGE analysis was performed with samples before and after boiling in the presence of SDS.

To further verify the obtained SDS-resistant aggregates, the binding of the aggregates to the amyloid-specific dye thioflavin T was assessed. For this analysis, 100  $\mu$ l of protein sample was mixed with 5  $\mu$ l of thioflavin T solution (2.5 mM in 5 mM KPO<sub>4</sub> pH = 7.4). The fluorescence spectrum was detected using the CLARIOstar plus system (BMG Labtech).

#### **2.7.4 Analysis of chaperone activity *in vitro***

To evaluate the activity of purified yeast chaperones, we used a technique based on reactivation of denatured firefly luciferase (Glover, Lindquist, 1998). Recombinant firefly luciferase (abcam, #ab100961) was dissolved in reaction buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM KCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 8 mM dithiotreitol (DTT), 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.25% Triton X-100) (modified from (Schumacher *et al.*, 1996) and diluted with urea to a final luciferase concentration of 10  $\mu$ M and a final urea concentration of 4 M. The denatured enzyme was diluted 100-fold with reaction buffer containing an appropriate combination of purified yeast chaperones (chaperone concentrations used were 1  $\mu$ M Hsp40 and 1  $\mu$ M Hsp70). The mixture of luciferase aggregates and chaperones was incubated for 60 minutes at 26 ° C. Luciferase activity was measured using the Luciferase Assay System reagent kit (Promega, #E1500) and the CLARIOstar Plus system (BMG Labtech). The luminescence intensity was measured in 3 independent technical replicates.

## 2.8. Electron microscopy

To prepare samples for transmission electron microscopy (TEM), 5  $\mu\text{l}$  of the fibril solution was applied to a copper grid with a formvar film (Ted Pella, Inc.) (with additional carbon coating in case of high concentrations of detergents in the buffer solution). After drying, the sample was stained with uranyl acetate solution at a concentration of 1% (w/v) for 30 seconds or 10 minutes (for negative and positive contrast, respectively). The dye was removed, the obtained sample was washed with water and dried. Electron microscopy was performed in the the RC "Development of Molecular and Cellular Technologies" of SPBU.

The images were analyzed manually using the ImageJ software package. The distance along the fibril axis from the visible point of the beginning to the visible point of the end was taken as the fibril length.

## 2.9. Chaperone binding assay

Analysis of the interaction between chaperones and fibrils was performed according to our developed method (Barbitoff *et al.*, 2020). In the first step, the solution containing the obtained amyloid fibrils of the corresponding protein was centrifuged for 30 minutes at 14,000 g, after which the buffer was removed and the precipitate was dissolved in 50-100  $\mu\text{l}$  of reaction buffer (20 mM Tris-HCl (pH = 8.0), 200 mM NaCl, 5% glycerol, 5 mM BME, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) (Krzewska, Melki, 2006). The resulting high concentration fibril sample was then mixed with purified chaperones in a volume of 50  $\mu\text{l}$ ; the final concentration of fibrils was 4 to 40  $\mu\text{M}$ , the concentration of chaperones was 1 to 4  $\mu\text{M}$ , depending on the experiment (see Chapter 3). For experiments with Hsp70 and Hsp104, 5 mM ATP or 5 mM of a non-hydrolysable ATP analogue, AMP-FNP, was also added to the mixture. In certain experiments, 5 mM GTP and ATP-regenerating system (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  creatine phosphokinase (Sigma), 10 mM creatine phosphate) were also used. The mixture of chaperones and fibrils in the reaction buffer was incubated for 1 hour with stirring at room temperature, after which the mixture was fractionated by centrifugation at 14,000 rpm for 20



minutes. The supernatant fraction was transferred into a separate microtube, and the remaining pellet was resuspended in a similar volume of reaction buffer. The distribution of proteins between the fractions was analyzed using SDS-PAGE. Each experiment was performed in at least 3 technical replicates.

To estimate the binding constants of Hsp40 and Hsp70 to amyloid fibrils, the amount of target protein in the pellet and supernatant fractions was estimated by analyzing images of stained gels after SDS-PAGE using the ImageJ software package, then the proportion of target protein in the pellet fraction ( $f_p$ ) was calculated.

The dissociation constant was then estimated using a modification of the standard regression model for binding analysis:

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

where  $[F]$  is the concentration of protein in the fibrils, and  $K_D$  is the estimated dissociation constant (Motulsky, Neubig, 2010),  $a$  is a correction factor reflecting the error of the method (background level of target protein in the pellet). Protein concentration in the fibrils ( $[F]$ ) was estimated by the ratio of protein in the supernatant and pellet fractions during centrifugation of the initial fibril sample.

The reliability of the calculated  $K_D$  value was assessed using the  $t$ -criterion. If the  $p$ -value exceeded the significance threshold ( $\alpha = 0.05$ ), the interaction of chaperone with fibrils was considered ineffective.

## 2.10. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the R programming language (R Core Team, 2014), and the ‘ggplot2’ package (Wickham, 2016) was used to visualize the data. Quantitative measures were compared using the Wilcoxon-Mann-Whitney test. Statistical comparison of dissociation constants was performed using the  $t$ -criterion (for definition of statistics for comparison of regression models, see Clogg *et al.*, 1995). Correction for multiple comparisons

was performed using the Benjamini-Hochberg method. The scripts used to analyze the data can be found at: [https://github.com/mrbarbitoff/phd\\_2022](https://github.com/mrbarbitoff/phd_2022).

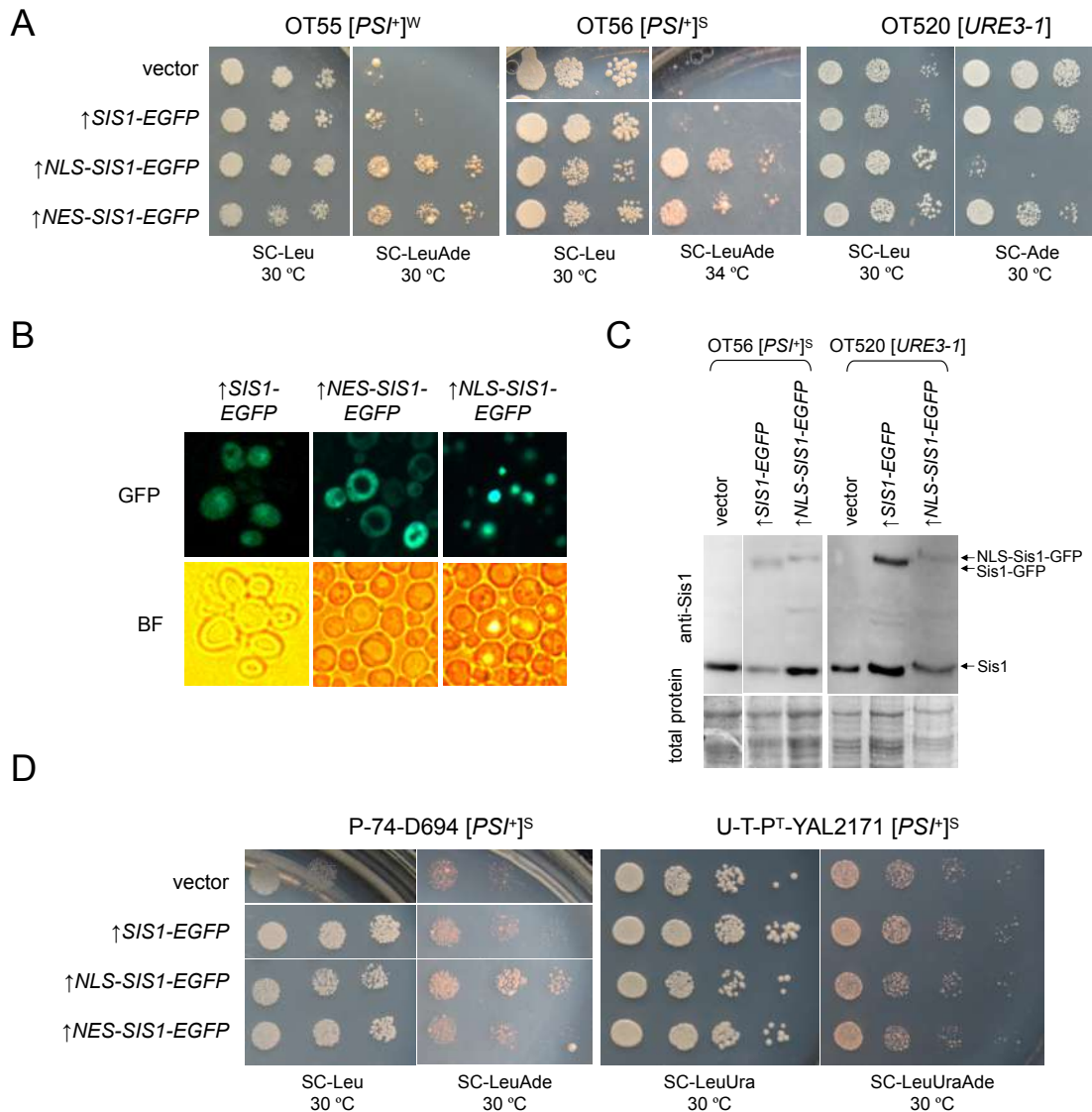
## Chapter 3. Results

### 3.1. Characterization of the differential effects of Sis1 on yeast prions

#### 3.1.1 Changes in Sis1 intracellular localization differentially affect yeast prions

In previous studies by our research group, differential effects of the *CURI* factor overexpression on yeast prions (Barbitoff *et al.*, 2017) were found. Overexpression of the *CURI* gene is accompanied by a marked change in the intracellular localization of Sis1 from cytoplasmic to intranuclear. These observations allowed us to formulate a hypothesis according to which it is the change in Sis1 localization and decrease of its cytosolic concentration that leads to the observed effects — enhancement of  $[PSI^+]$  phenotype and curing of  $[URE3]$ . This hypothesis contradicts the published data, according to which reduction of Sis1 concentration leads to loss of both  $[PSI^+]$  and  $[URE3]$  (Higurashi *et al.*, 2008). Therefore, our first step was to obtain a rigorous proof that Sis1 relocation can have a differential effect on yeast prions.

In order to obtain such a proof, we tested the effects of Cur1-independent changes in Sis1 localization on  $[PSI^+]$  and  $[URE3]$  prions. To this end, we used Sis1 variants fused with nuclear export signal (NES) or nuclear localization signal (NLS). Overproduction of such chimeric proteins should have a dominant manifestation due to Sis1 dimerization. We transformed cells of OT520, OT56, and OT55 strains with plasmids to overproduce Sis1, NLS-Sis1, and NES-Sis1. Consistent with our expectations, NLS-Sis1 overexpression resulted in  $[PSI^+]$  enhancement and  $[URE3]$  elimination (Fig. 7A), with the effect on the prion phenotype of  $[PSI^+]^S$  being stronger under elevated temperature conditions.



**Figure 7. Changes in the intracellular localization of Sis1 differentially affect yeast prions and their variants.** **A.** Ten-fold serial dilutions of representative clones of OT55 [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>W</sup>, OT56 [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>S</sup> or OT520 [*URE3-1*] strains transformed with pRS315CG, pAG415ADH1-Sis1-EGFP, pAG415ADH1-NLS-Sis1-EGFP, and pAG415ADH1-NES-Sis1-EGFP. **B.** Characteristic distribution pattern of Sis1-EGFP, NES-Sis1-EGFP, and NLS-Sis1-EGFP in OT56 cells observed by fluorescence microscopy. **C.** Comparison of Sis1-GFP and NLS-Sis1-GFP protein levels in OT56 [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>S</sup> and OT520 [*URE3-1*] strains by Western blot hybridization. Coomassie R250 total protein staining was used as a loading control. Plasmids for expression were similar to those listed in (A). Detection of the target protein was performed with SS2 antibodies. **D.** Ten-fold dilutions of representative clones of the P-74-D694 and U-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 strains transfected with vector (pRS315) and plasmids pAG415ADH1-Sis1-EGFP, pAG415ADH1-NLS-Sis1-EGFP and pAG415ADH1-NES-Sis1-EGFP.

However, we also found that NES-Sis1 overproduction acts in the same direction as NLS-Sis1: it cures  $[URE3]$  and enhances  $[PSI^+]$  (Fig. 7A). Interestingly, despite the relatively subtle effect of NES-Sis1 overproduction on the  $[URE3]$  phenotype observed in serial dilutions (Fig. 7A), the  $[URE3]$  loss rate was high upon both NLS-Sis1-EGFP and NES-Sis1-EGFP overproduction (proportion of  $[ure-0]$  colonies — 98.8% and 88.6%, respectively).

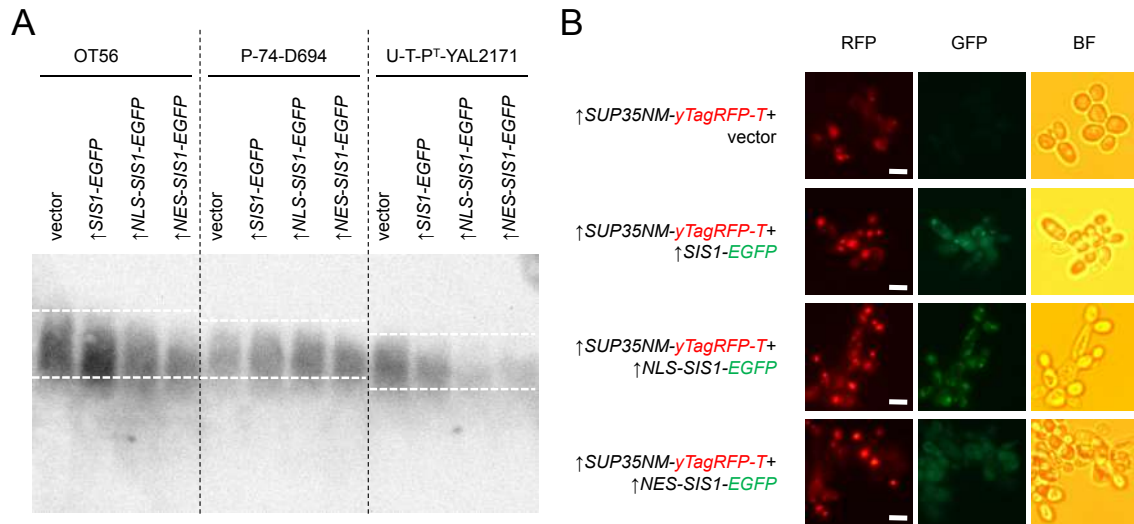
To prove that the observed effects are related to a change in Sis1 localization, we checked the localization of NLS-Sis1-EGFP and NES-Sis1-EGFP proteins in the yeast cell and found no deviations from the previously described character of their distribution (Fig. 7C). Moreover, we tested the levels of various Sis1 protein variants in cells overexpressing *SIS1-EGFP* or *NLS-SIS1-EGFP*. The amount of Sis1-EGFP and NLS-Sis1-EGFP protein was not different (Figure 9D), indicating that the effects of the *NLS-SIS1* chimeric construct are not associated with increased protein production.

Next, we tested whether the observed effects of NLS-Sis1 and NES-Sis1 were reproduced in strains with a different genetic background and  $[PSI^+]$  variants. For this purpose, we used the P-74-D694 strain containing another strong prion variant of  $[PSI^+]$  and belonging to the Peterhof Genetic Lineages, and the U-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 strain carrying the *SIS1* gene on the centromeric plasmid and derived from the widely used W303 strain. We found that NLS-Sis1 maintained its effect on the  $[PSI^+]$  phenotype in P-74-D694 but not U-T-P<sup>T</sup>-YAL2171, whereas NES-Sis1 has no effect on  $[PSI^+]$  in either strain (Fig. 7D). Notably, however, that the effect of NLS-Sis1 may be masked by high toxicity of this protein variant when it is overproduced.

Thus we have shown that relocalization of Sis1 into nucleus due to overproduction of NLS-Sis1 leads to opposite effects on various yeast prions and the strength of these effects on prions is strain-specific.

### 3.1.2 Changes in Sis1 localization do not affect aggregate size

The observed effects of Sis1 relocalization on yeast prions can be explained by changes in the activity of either of the two most important processes —



**Figure 8. NLS-Sis1 and NES-Sis1 overproduction does not affect the size and morphology of Sup35 aggregates** **A.** Results of  $[PSI^+]$  aggregate size analysis in cells of OT56, P-74-D694, and U-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 strains transformed with vector or constructs to overexpress *SIS1-EGFP*, *NLS-SIS1-EGFP* and *NES-SIS1-EGFP* using SDD-AGE. Detection was performed using SE4290 antibodies. The white dotted lines correspond to the region where Sup35 aggregates are located in cells carrying the empty vector. **B.** Fluorescence microscopy of P-74-D694 cells producing the Sup35NM-TagRFP-T chimeric protein and different variants of Sis1 (*Sis1-EGFP*, *NLS-Sis1-EGFP*, *NES-Sis1-EGFP*). Representative groups of cells are shown. The scale bar corresponds to 5  $\mu\text{m}$ .

aggregate fragmentation or inheritance of prion seeds. To assess the efficiency of fragmentation, in the next step of our work we analyzed the size and morphology of aggregates in cells of different  $[PSI^+]$  strains overproducing different Sis1 variants. For this purpose, we analyzed the size of Sup35 aggregates in cells of OT56, P-74-D694, and U-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 strains overproducing *Sis1-EGFP*, *NLS-Sis1-EGFP*, or *NES-Sis1-EGFP*. Analysis of aggregate size using SDD-AGE showed that additional expression of *Sis1-EGFP* leads to a subtle decrease in aggregate size in all strains studied. At the same time, the size of aggregates in cells overproducing *NLS-Sis1-EGFP* and *NES-Sis1-EGFP* did not differ from cells overproducing *Sis1-EGFP* without additional intracellular localization signals (Fig. 8A).

The lack of differences in aggregate size in cells with different intracellular

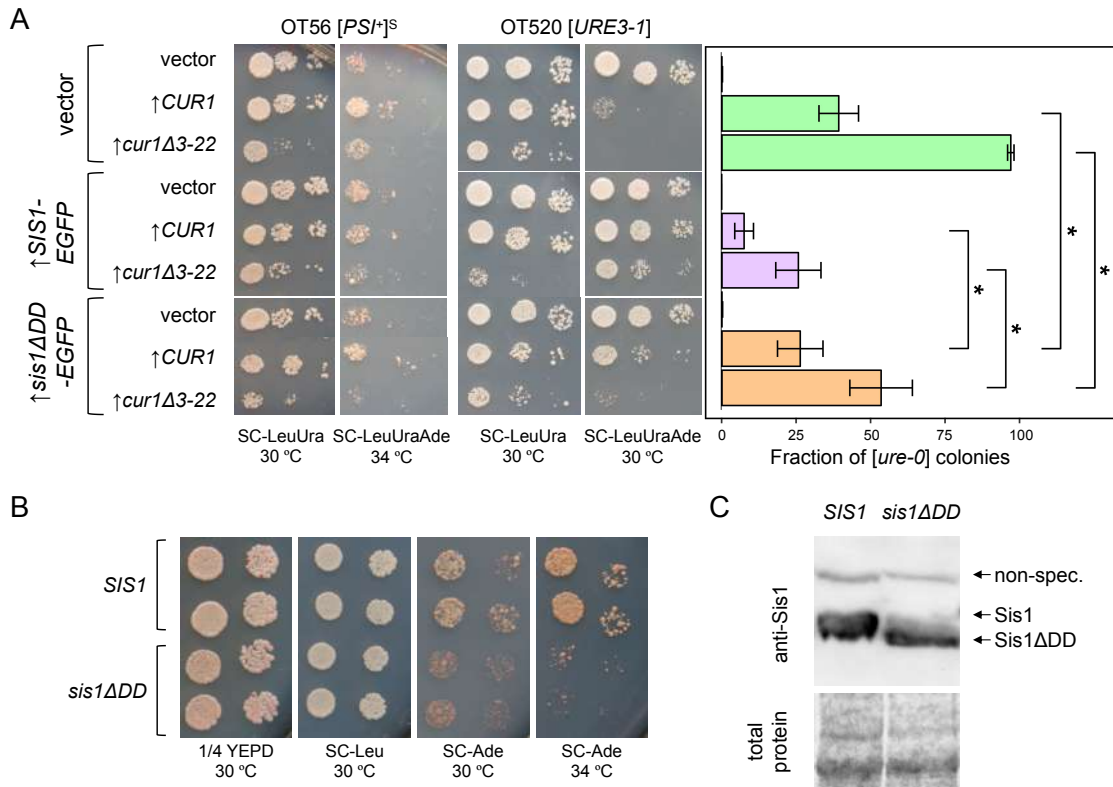
localization of Sis1 suggests that the effect of Sis1 relocation on prions is most likely not due to changes in aggregate fragmentation kinetics. In the next step, we also tested whether the change in Sis1 localization affects the morphology of the aggregates observed by fluorescence microscopy. To perform this test, we transformed cells of OT56 and P-74-D694 strains with plasmids to overexpress different variants of *SIS1* together with a plasmid for controlled overproduction of a Sup35 protein fragment containing a prion N domain and a charged M domain (Sup35NM) fused to the fluorescent protein TagRFP-T. In cells producing the Sup35NM-TagRFP-T protein, one or several large foci of this protein were observed (Fig. 8B) regardless of the overproduced Sis1-EGFP variant.

Thus, we can conclude that the change in intracellular localization of Sis1 due to NLS-Sis1 or NES-Sis1 overproduction does not result in an apparent change in the size or morphology of prion aggregates. This result, in turn, suggests that the observed effects on the prion phenotype are most likely not related to changes in aggregate fragmentation.

### 3.1.3 Deletion of the Sis1 dimerization domain weakens [*PSI*<sup>+</sup>]

The effect of Sis1 relocation on yeast prions observed during overproduction of the Cur1 factor or NLS-Sis1 chimeric protein depends on Sis1 dimerization (Malinovska *et al.*, 2012). According to these data, additional expression of the Sis1 variant without the dimerization domain should effectively compensate for the effect of Sis1 localization changes.

To test this hypothesis, we analyzed the phenotype of OT56 [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>S</sup> and OT520 [*URE3*] strains expressing *CUR1* together with a normal *SIS1* variant (*SIS1-EGFP*) and the one with a C-terminal dimerization domain deletion (*sis1*Δ*DD-EGFP*). Contrary to expectation, additional expression of *sis1*Δ*DD-EGFP* less effectively compensated for the effects of Cur1 overproduction on both [*PSI*<sup>+</sup>] and [*URE3*] (Fig. 9A). Additional expression of the full-length *SIS1-EGFP* variant reduced the frequency of [*URE3*] loss in cells overproducing the proteolytically stable Cur1Δ3-22 variant from 97.2% to 25.7%. At the same



**Figure 9. Deletion of the Sis1 dimerization domain attenuates the manifestation of [PSI<sup>+</sup>].** **A.** Left, Ten-fold serial dilutions of representative OT56 and OT520 clones transformed with pRS426, pRS426-CUR1 or pRS426-cur1Δ3-22 in combination with vector, pAG415ADH-SIS1-EGFP or pAG415ADH-Sis1ΔDD-EGFP. Right, quantitative analysis of [URE3] loss upon overexpression of CUR1 variants and SIS1 or sis1ΔD. Mean values and 95 % confidence intervals for the means are shown. \*, p < 0.05 according to the U Wilcoxon-Mann-Whitney test. **B.** Twenty-fold serial dilutions of representative clones of the L-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 (*SIS1*) and LΔ-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 (*sis1ΔDD*) strains. **C.** Comparison of wild-type Sis1 and Sis1ΔDD protein levels in L-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 and LΔ-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 strains, respectively, by Western blot hybridization. Coomassie R250 total protein staining was used as a loading control. Detection of the target protein was performed with SS2 antibodies. «non-spec.» is non-specific antibody binding.

time, additional overproduction of *sis1ΔDD-EGFP* led to a less pronounced compensation of the effect of Cur1Δ3-22 (the [URE3] loss rate was 53.5%).

The lesser ability of Sis1ΔDD to compensate for the effects of Sis1 relocalization on prions may be explained by the fact that this variant is less effective in promoting fragmentation of prion aggregates in the cell. According to this hypothesis, deletion of the dimerization domain destabilizes [URE3]



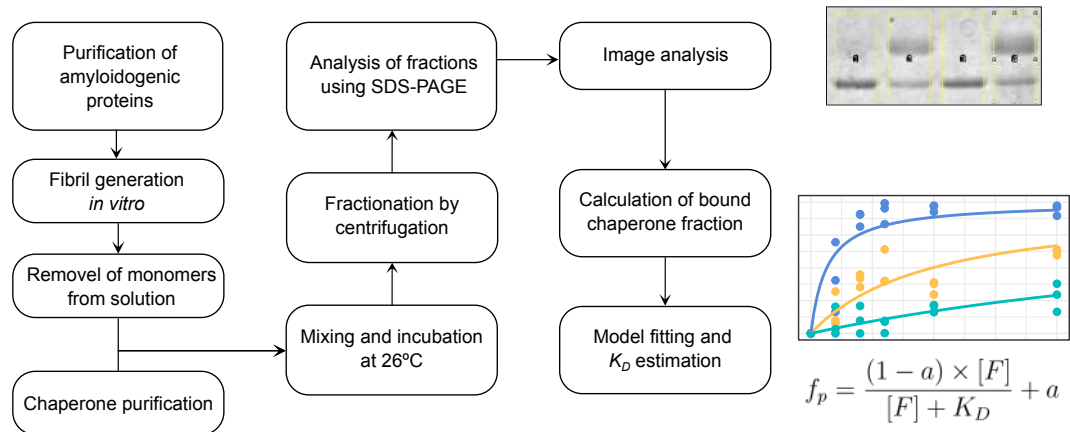
(Reidy *et al.*, 2014). At the same time, the negative effect of dimerization domain deletion on  $[PSI^+]$  has not previously been demonstrated. To test whether deletion of the Sis1 dimerization domain could weaken the  $[PSI^+]$  phenotype, we constructed a strain carrying *sis1* $\Delta DD$  on a plasmid as the sole endogenous source of Sis1 (L $\Delta$ -T-P<sup>T</sup>-YAL2171). Comparison of the nonsense suppression efficiency in this strain with the L-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 strain carrying the full-length *SIS1* variant confirmed a marked weakening of the  $[PSI^+]$  phenotypic manifestation (Fig. 9B). Differences in the efficacy of suppression were significantly more evident when yeast was cultured under conditions of elevated temperature. It is important to note that differences in the strength of  $[PSI^+]$  phenotype in L-T-P<sup>T</sup>-YAL2171 and L $\Delta$ -T-P<sup>T</sup>-YAL2171 were not associated with different levels of protein production (Fig. 9C).

Thus, the monomeric Sis1 form is unable to fully compensate for the effects of changes in intracellular localization of Sis1 on yeast prions. This phenomenon is most likely due to the fact that this form has a reduced activity in the maintenance of yeast prions.

### 3.2. Analysis of Hsp40 binding to amyloid fibrils

The results presented in the previous subsections suggest that Sis1 is not only required for prion maintenance, but can also both weaken and enhance prion manifestation when it changes its localization. It remains unclear, however, what determines the direction and strength of the effect of Sis1 relocation on the prion. Given that Sis1 is required for both amyloid fibril fragmentation (Tipton *et al.*, 2008; Shorter, Lindquist, 2008) and prion curing by *HSP104* overexpression (Kirkland *et al.*, 2011), we can assume that the direction of the effects is determined by the balance of these two Sis1 activities. In turn, this can be explained by the specificity of the interaction of Sis1 with various amyloid aggregates.

To test this hypothesis, we developed a method to quantify the efficiency of chaperone binding to amyloid fibrils (Fig. 10). Our proposed method is based on fractionation of a mixture of purified molecular chaperones with fibrils in



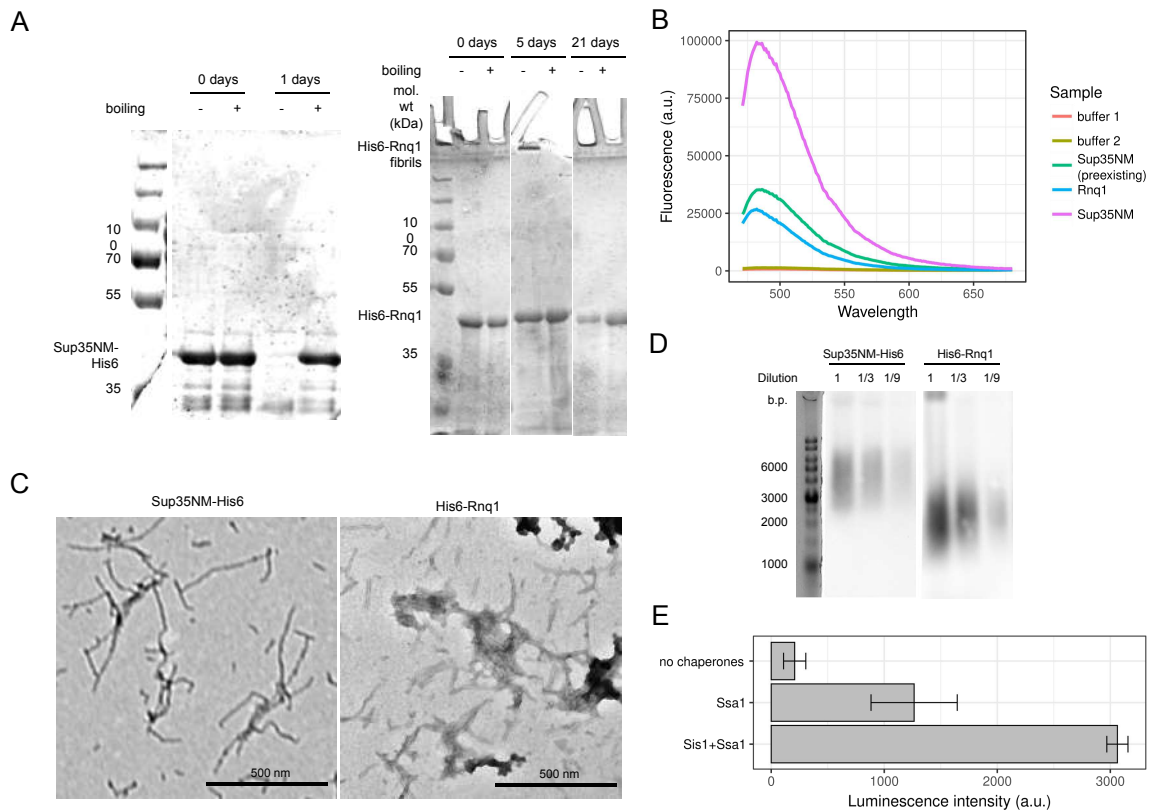
**Figure 10. Quantification of Hsp40 binding constants to amyloid fibrils**  
A flowchart of an experiment to analyze efficiency of chaperone binding to amyloid aggregates is shown.

an *in vitro* system using centrifugation. During centrifugation, amyloid fibrils together with bound molecular chaperones are localized in the pellet fraction, which allows the fraction of bound chaperone molecules to be calculated when analyzing the pellet and supernatant fractions using SDS-PAGE.

### 3.2.1 Preparation of purified chaperones and amyloid fibrils

To study the parameters of chaperone interaction with amyloid fibrils, we obtained the necessary set of purified yeast chaperones and fibrils of yeast prionogenic proteins. Because of the difficulty in obtaining Ure2 amyloid fibrils, we focused on working with fibrils of two proteins — Sup35NM and Rnq1, a structural determinant of the  $[PIN^+]$  prion. The  $[PIN^+]$  prion is characterized by a significantly more pronounced dependence on intracellular Sis1 levels compared to  $[PSI^+]$  (Higurashi *et al.*, 2008).

We obtained amyloid fibrils of purified Sup35NM-His<sub>6</sub> and His<sub>6</sub>-Rnq1 proteins. Sup35NM was characterized by significantly more efficient aggregate formation after only one day of incubation (Fig. 11A), whereas amyloid Rnq1 took significantly longer to form. To verify that the obtained aggregates were characterized by the expected amyloid structural features, we tested the binding of the aggregates to the amyloid-specific dye, thioflavin T. This analysis



**Figure 11. The obtained samples of yeast chaperones and amyloid fibrils have a characteristic set of properties** **A.** SDS-PAGE analysis of protein samples incubated in buffer to form fibrils of appropriate composition for the indicated number of days. Fibril formation is indicated by a decrease in monomeric protein levels in samples not subjected to boiling with SDS. **B.** Staining of the obtained fibrils with the amyloid-specific dye thioflavin T. The curves on the graph correspond to the fluorescence spectra of two buffer solutions (similar to those used to obtain Sup35NM and Rnq1 fibrils, respectively), the pre-existing Sup35NM fibrils, and the Sup35NM and Rnq1 fibrils obtained in the course of work. **C.** Electron micrographs of samples of Sup35NM and Rnq1 amyloid fibrils. **D.** SDD-AGE analysis of amyloid fibrils from (C). A DNA molecular weight marker is given to estimate the mass of the aggregates. **E.** Luminescence intensity of denatured firefly luciferase after incubation with the indicated combinations of molecular chaperones. Mean values and standard deviations for three technical repetitions of the experiment are shown.

confirmed that both Sup35NM and Rnq1 aggregates interacted with thioflavin T, which could be observed by a characteristic change in the fluorescence spectrum (Fig. 11B). Next, we analyzed the morphology of the obtained aggregates using TEM with negative contrast. Electron micrographs showed

characteristic fibrillar structures with a median length of 347 nm in the case of Sup35NM and 146 nm in the case of Rnq1 (Fig. 11C). SDD-AGE analysis of the obtained fibril samples also showed similar differences in the molecular weight of the aggregates (Fig. 11D), and the estimated molecular weight of the fibrils from SDD-AGE data corresponded well to the estimates from TEM data (Drozdova *et al.*, 2020). Based on our results, we concluded that the Sup35NM and Rnq1 aggregates we obtained have a characteristic set of amyloid properties.

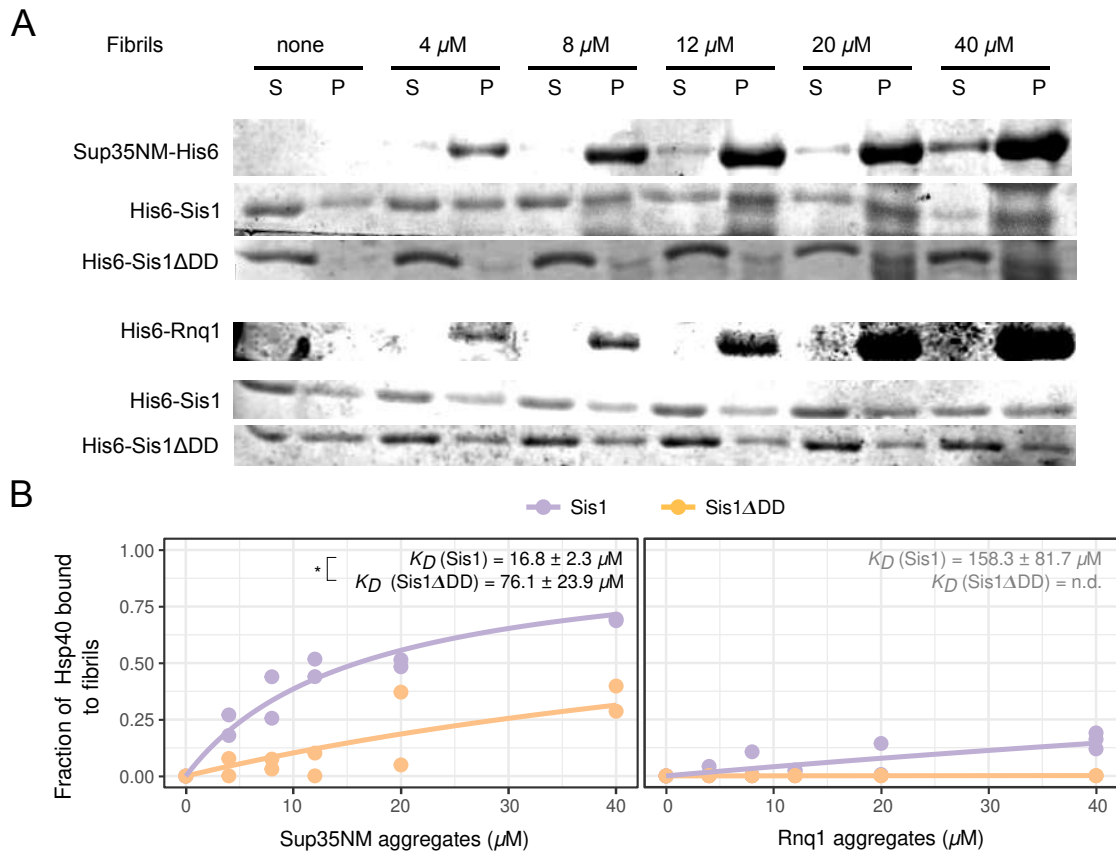
To test the activity of the obtained purified yeast chaperones, we used a method based on the recovery of luciferase activity (see «Materials and Methods», Glover, Lindquist, 1998). The experimental results showed that purified Hsp70-Ssa1 promotes the recovery of denatured luciferase, with its activity increasing significantly when Hsp40-Sis1 is added (Fig. 11E). Thus, the obtained samples of purified yeast chaperones retain their characteristic functionality.

### 3.2.2 Sis1 efficiently interacts with Sup35NM, but not Rnq1 fibrils

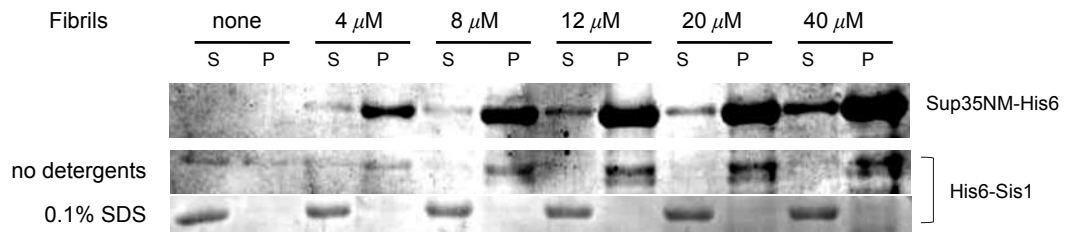
In the first step of work with the obtained samples of amyloid fibrils and yeast chaperones, we analyzed the binding efficiency of Sis1 to Sup35NM and Rnq1 amyloid fibrils. To perform this analysis, we mixed purified full-length Sis1 or Sis1 $\Delta$ DD at a concentration of 4  $\mu$ M with the fibrils, varying their concentration (per monomeric protein in the aggregates) from 4 to 40  $\mu$ M.

We found that Sis1 binds effectively to Sup35NM fibrils — the amount of Sis1 in the pellet fraction exceeded 50% at a fibril concentration of 20  $\mu$ M ( $K_D = 16.8 \pm 2.3 \mu$ M,  $p < 0.001$  according to  $t$ -criterion). In contrast, the interaction with Rnq1 fibrils was extremely weak, and most of the chaperone molecules remained in the supernatant fraction even at a fibril concentration of 40  $\mu$ M (Fig. 12) ( $K_D = 158.3 \pm 81.7 \mu$ M,  $p > 0.05$ ). Moreover, deletion of the dimerization domain of Sis1 led to weakening of its interaction with Sup35NM amyloid aggregates ( $K_D = 76.1 \pm 23.9 \mu$ M,  $p$ -value when compared with the full-length protein  $< 0.05$ ). The interaction of the Sis1 $\Delta$ DD variant with Rnq1 fibrils was not observed in our experiments (Fig. 12).

The high binding efficiency of Sis1 to Sup35NM fibrils may indicate the formation of detergent-resistant chaperone complexes with the fibril. Evidence of such a detergent-resistant interaction was previously observed in experiments on proteomic screening of amylogenic yeast proteins (Nizhnikov *et al.*, 2014; 2016). To test whether the complexes we observed were resistant to detergent treatment, we incubated a mixture of Sis1 and Sup35NM fibrils with detergents



**Figure 12. Sis1 interacts effectively with Sup35NM fibrils, but not Rnq1, and deletion of the dimerization domain reduces the affinity of Sis1 for fibrils.** **A.** Distribution of Hsp40 between the supernatant and pellet fractions when the corresponding protein is added to the amyloid fibril mixture at the indicated concentration. One representative technical replicate for each protein combination is given. The results of the SDS-PAGE analysis with Coomassie R250 gel staining are shown. Above, Sup35NM; below, Rnq1. **B.** Results of the quantitative analysis of the experiments presented in (A). Fractions of bound Hsp40 after correction for pelleting level without addition of fibrils are represented. Each point corresponds to one repetition of the experiment with the indicated protein concentrations. The curves correspond to the optimal regression models for each repetition. \* -  $p < 0.05$  according to  $t$ -test



**Figure 13. Sis1 complexes with Sup35NM fibrils are not resistant to detergent treatment** Distribution of proteins in the supernatant and sedimentary fractions when Sis1 mixture with Sup35NM fibrils is centrifuged without prior addition of detergents or with the addition of 0.1% SDS. S, supernatant; P, pellet fraction. Coomassie R250 polyacrylamide gel staining

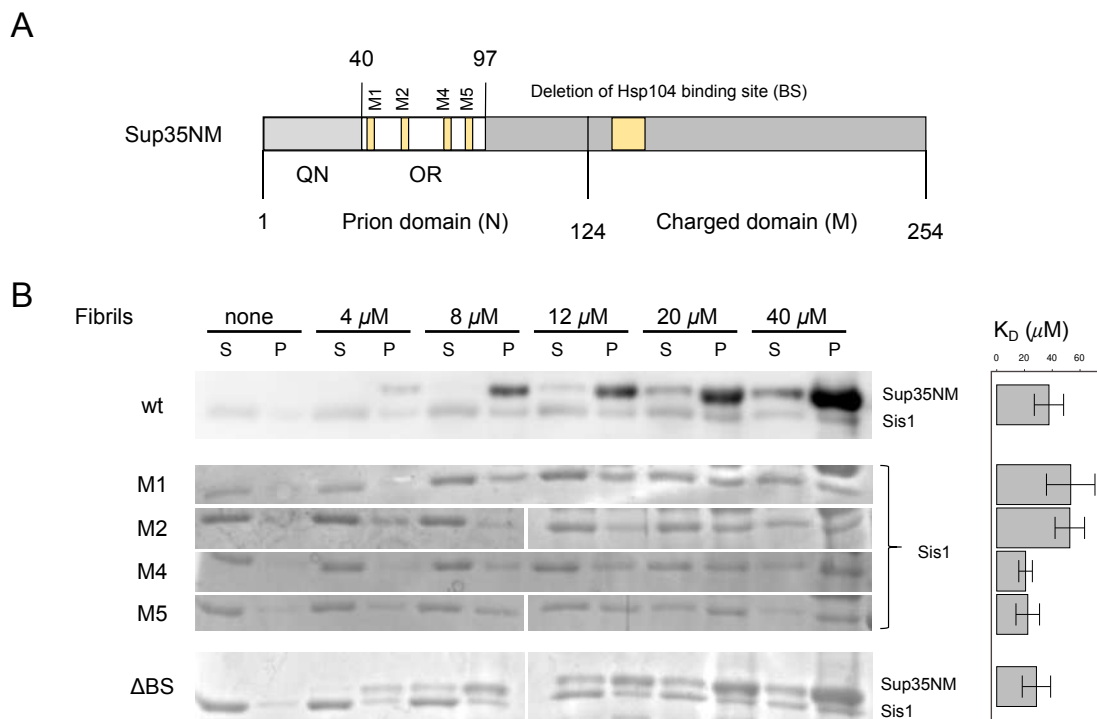
(0.1% SDS or 0.3% sodium sarcosylate) and analyzed the proportion of chaperone in complex with aggregates after such treatment. The experimental results showed that Sis1 complexes with fibrils completely dissociated after the addition of detergents (Fig. 13). This result indicates that the presence of Sis1 in the detergent-resistant fraction in proteomic experiments is not explained by the strength of its interaction with the fibril.

### 3.2.3 Mutations in oligopeptide repeats in Sup35 do not affect Sis1 binding

In the next stage of our work, we analyzed the effect of mutations in the N- and M-domains of Sup35 on the interaction of Sis1 with Sup35NM fibrils. We used 5 mutations for the study (Fig. 14A). Four of the mutations used are localized in oligopeptide repeats in the Sup35 N-domain (*sup35-M1*, *sup35-M2*, *sup35-M4*, *sup35-M5*) (Bondarev *et al.*, 2013). These mutations represent substitutions of polar residues with charged residues in the 1st, 2nd, 4th, and 5th oligopeptide repeats, respectively. Replacement of the wild-type *SUP35* allele in yeast with the mutant *sup35-M1* and *sup35-M2* alleles results in loss of the  $[PSI^+]$  prion, whereas the *sup35-M4* and *sup35-M5* mutations are able to maintain a pre-existing prion variant (Bondarev *et al.*, 2013). All 4 mutations, by their nature, should significantly alter the monomer folding within the fibril.

We also obtained amyloid fibrils of the Sup35NM variant with a 131—140 a.a. deletion in the M-domain corresponding to the Hsp104 binding site (Helsen, Glover, 2012). A similar deletion affecting the 129—148 a.a. region prevents [*PSI*<sup>+</sup>] curing by *HSP104* overexpression.

We analyzed the binding of Sis1 to fibrils formed by the aforementioned Sup35NM variants using a method similar to that used to evaluate  $K_D$  of Sis1 to wild-type Sup35NM fibrils. We found that the interaction efficiency of Sis1 with the fibrils was similar for all studied mutant Sup35NM variants (Fig. 14B), and the  $K_D$  values estimated using our method showed no significant differences



**Figure 14. Mutations in the oligopeptide repeats of the Sup35 N-domain and deletion of the Hsp104 binding site do not affect interaction with Sis1** **A.** Schematic representation of the location of the studied mutations in the Sup35NM structure. QN is the N-domain region rich in asparagine and glutamine. OR is the N-domain region containing oligopeptide repeats. **B.** Distribution of Sis1 between the supernatant (S) and pellet (P) fractions when the indicated Sup35NM variants were added to the mixture at the indicated concentration. One representative technical replicate for each protein combination is given. The results of SDS-PAGE analysis with Coomassie R250 gel staining are shown. Shown on the right are the results of estimation of the  $K_D$  value for complexes of Sis1 with fibrils of the indicated Sup35NM variants.

**Table 6.**  $K_D$  values of Sis1 complexes with different Sup35NM variants

Variant	$K_D$	p-value <sup>†</sup>
Sup35NM	$37.1 \pm 8.8$	
Sup35NM-M1	$40.8 \pm 13.9$	0.22
Sup35NM-M2	$57.3 \pm 9.8$	0.07
Sup35NM-M4	$24.1 \pm 4.2$	0.10
Sup35NM-M5	$26.1 \pm 7.3$	0.17
Sup35NM $\Delta$ BS	$32.1 \pm 9.1$	0.35

<sup>†</sup> - p-value according to *t*-criterion when comparing  $K_D$  for mutant variant fibrils and wild-type protein fibrils.

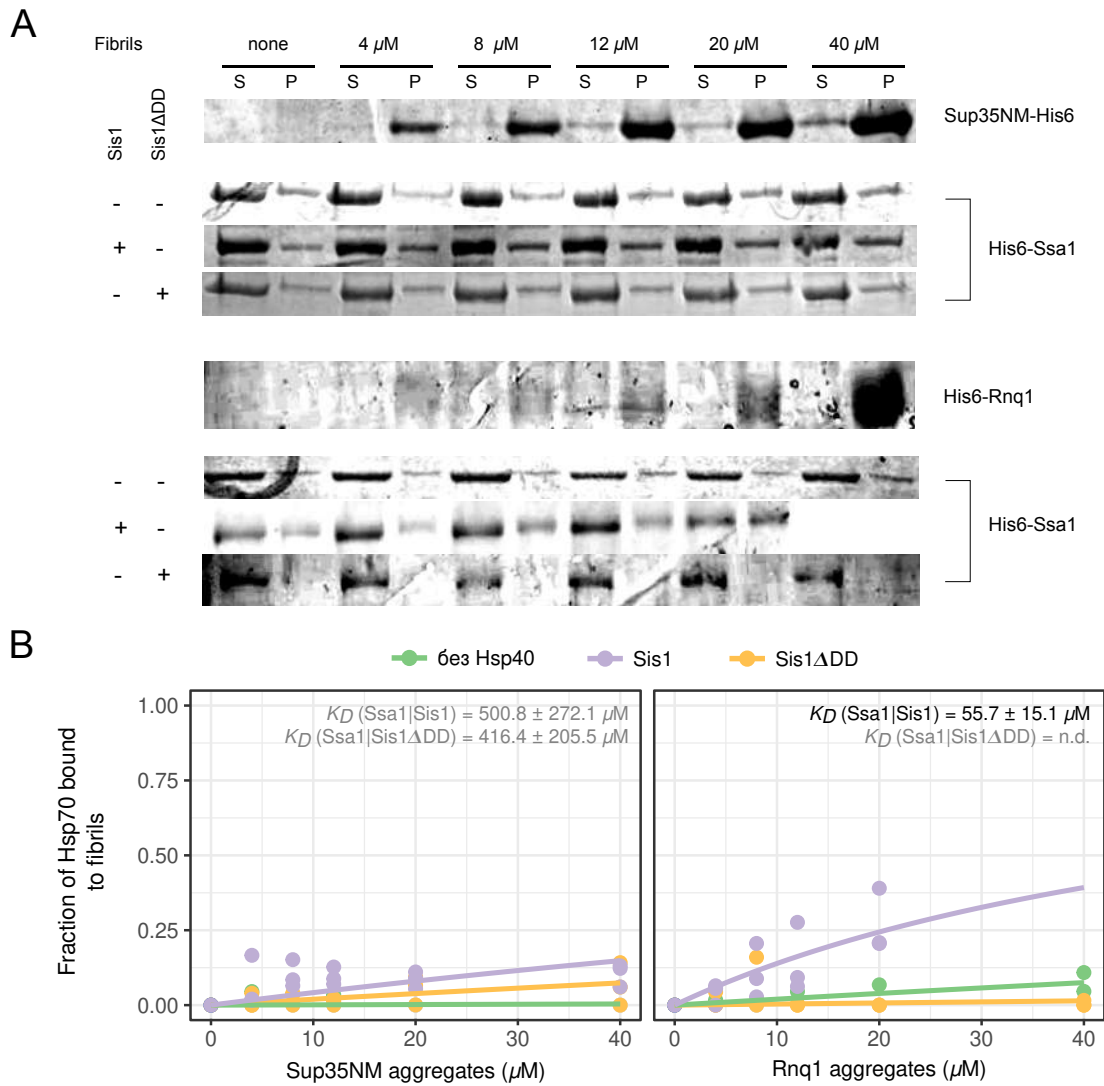
( $K_D$  values are shown in Table 6).

### 3.3. Relationship between Hsp40 binding and recruitment of other chaperones to fibrils

#### 3.3.1 Hsp40 binding efficiency does not affect Hsp70 recruitment

Next, we studied the effect of the observed differences in the binding of Hsp40 to amyloid fibrils on the efficiency of recruitment of molecular chaperones of other groups (Hsp70 and Hsp104) to the fibrils. We first studied the formation of Hsp70-Ssa1 complexes with Sup35NM and Rnq1 fibrils without addition of Hsp40 and in the presence of Sis1 or Sis1 $\Delta$ DD. For this purpose, we mixed Ssa1 and Hsp40 at a concentration of 4  $\mu$ M with the fibrils, varying their concentration from 4 to 40  $\mu$ M. The assay was performed in the presence of 5 mM ATP and an ATP-regenerating system (100  $\mu$ g/mL creatine phosphokinase and 10 mM creatine phosphate) to maintain ATP levels in the sample. Analysis of the fraction of bound Ssa1 showed that effective interaction was observed only with Rnq1 fibrils in the presence of the full-length Sis1 variant (Fig. 15), ( $K_D = 55.7 \pm 15.1 \mu$ M,  $p < 0.001$ ). Deletion of the Sis1 dimerization domain resulted in a complete loss of the ability to attract Ssa1 to Rnq1 fibrils (Fig. 15A). When we analyzed Ssa1 recruitment to Sup35NM fibrils, we observed no significant binding in either case ( $p > 0.05$ ) despite a slight increase in the amount of Ssa1 in the sedimentary fraction at high fibril concentration (Fig. 15).



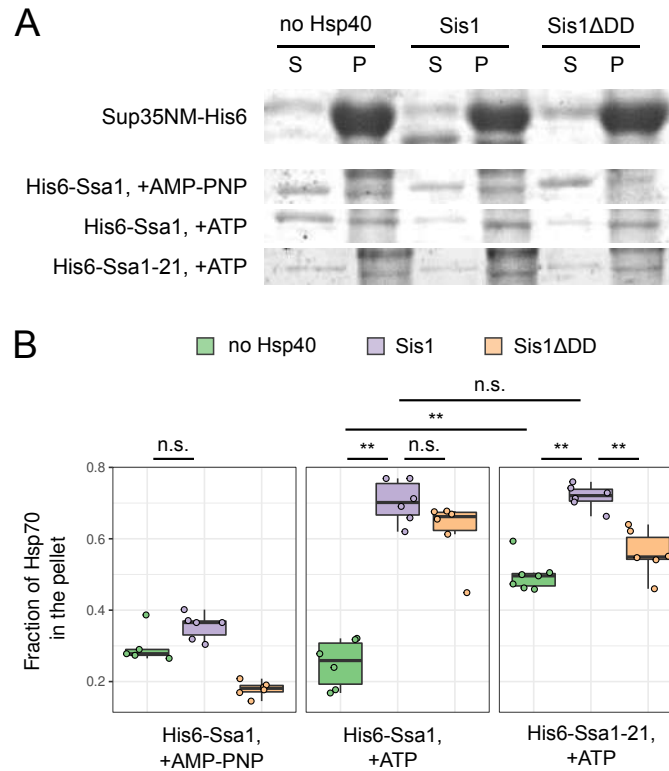


**Figure 15. Effective binding of Ssa1 is only observed to Rnq1 fibrils in the presence of full-length Sis1.** **A.** Distribution of Hsp70-Ssa1 between the supernatant (S) and pellet (P) fractions when the target protein is added to the amyloid fibril mixture at the indicated concentration in the presence or absence of Hsp40 as shown on the left. One representative technical replicate for each protein combination is given. The results of the SDS-PAGE assay with Coomassie R250 gel staining are shown. Above, Sup35NM; below, Rnq1. **B.** Results of the quantitative analysis of the experiments presented in (A). Fractions of bound Hsp70-Ssa1 after correction for pelleting level without addition of fibrils are given. Each point corresponds to one repetition of the experiment with the indicated protein concentrations. The curves correspond to the optimal regression models for each sample.  $K_D$  values are given for Ssa1 complexes with fibrils in the presence of Sis1 or Sis1 $\Delta$ DD. Combinations for which the obtained  $K_D$  values are not significant ( $p > 0.05$ ) are marked in gray font.

To confirm that Ssa1 can also be recruited to Sup35NM fibrils in our system, we analyzed the interaction of Ssa1 with fibrils at a greater excess of the latter. For this purpose, we reduced the concentration of Ssa1 used to 1  $\mu$ M and studied its binding to fibrils at a concentration of 40  $\mu$ M. We also avoided the use of an ATP-regenerating system in these experiments. We found that Ssa1 does interact with Sup35NM fibrils, and this interaction is much stronger in the presence of Hsp40 in the mixture (Fig. 16A). Quantification of the fraction of Ssa1 in the pellet fraction confirmed a significant increase in the fraction of bound Ssa1 when Sis1 was added to the mixture (Fig. 16B). Note that the Sis1 variant devoid of the dimerization domain also contributed significantly to the recruitment of Ssa1 to the aggregates. The median fraction of Ssa1 in the pellet fraction was slightly reduced compared to full-length Sis1, but the observed differences were not statistically significant ( $p = 0.11$  in the Wilcoxon-Mann-Whitney test). We also proved that the interaction of Ssa1 with aggregates depends on its ATPase activity. For this purpose, we analyzed the fraction of Ssa1 in the pellet when a non-hydrolyzable ATP analogue, AMP-PNP, was added to the mixture. In this experiment, addition of Hsp40 had no effect on Ssa1 binding to fibrils, and the fraction of Ssa1 in the pellet remained at the background level (Fig. 16)

We also investigated the recruitment of Hsp70 to Sup35NM aggregates using the Ssa1 mutant variant, Ssa1-21. The *SSA1-21* mutation is characterized by a dominant negative effect on the maintenance of some [*PSI*<sup>+</sup>] prion variants (Jung *et al.*, 2000; Jones, Masison, 2003; Barbitoff *et al.*, 2022). The mutant Ssa1-21 protein also bound to Sup35NM fibrils; moreover, the proportion of Ssa1-21 in the pellet reached 49.7% even without the addition of Hsp40 (this value was significantly lower, 27.8% ( $p < 0.01$ ), in the case of the wild-type protein). Moreover, the binding efficiency of Ssa1-21 to fibrils when Sis1 was added was comparable to that of wild-type Ssa1 (Fig. 16B,  $p = 0.69$ ). Interestingly, the efficiency of Ssa1-21 binding to Sup35NM aggregates in the presence of Sis1 $\Delta$ DD in the mixture was significantly lower than when full-length Sis1 was added ( $p < 0.01$ ).

Thus, our results indicate that there is no direct relationship between Hsp40

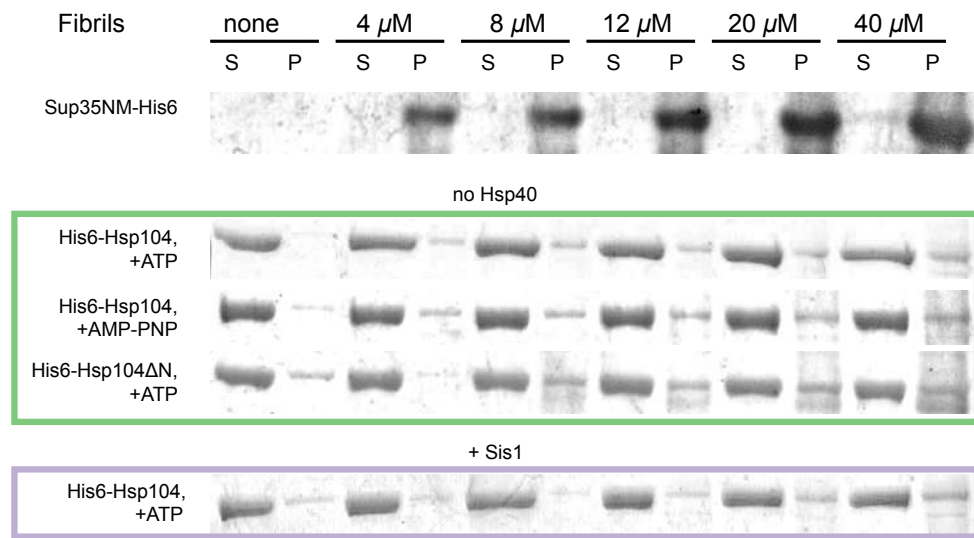


**Figure 16. The recruitment of Ssa1 to Sup35NM amyloid aggregates depends on Sis1 and the ATPase activity of Ssa1.** **A.** SDS-PAGE analysis of the distribution of Hsp70 (Ssa1 or Ssa1-21) between the supernatant (S) and pellet (P) fractions after incubation with 40-fold excess Sup35NM fibrils and indicated Hsp40. A single representative replicate of the experiment is shown. Coomassie R250 gel staining. **B.** Proportion of Hsp70 in the pellet in the presence the indicated combinations of Hsp40 and ATP or AMP-PNP. \*\* -  $p < 0.01$ , n.s. -  $p > 0.05$  in the Wilcoxon-Mann-Whitney test

binding to the fibrils and Hsp70 recruitment to them. Sis1 efficiently forms complexes with Sup35NM and is characterized by lower efficiency of Hsp70 recruitment to Sup35NM aggregates compared to Rnq1 aggregates, despite significantly lower affinity for the latter. At the same time, deletion of the dimerization domain of Sis1 weakens its interaction with Sup35NM fibrils, but does not affect the recruitment of Hsp70.

### 3.3.2 Sis1 does not stimulate direct Hsp104 binding to fibrils

The positive effect of Sis1 on  $[PSI^+]$  curing upon overexpression of *HSP104* suggests that the formation of robust Sis1 complexes with Sup35 amyloid fibrils



**Figure 17. Hsp104 does not form stable complexes with Sup35NM aggregates either in the presence or absence of Sis1.** Distribution of Hsp104 or Hsp104 $\Delta$ N over the supernatant (S) and pellet (P) fractions when Sup35NM fibrils at the indicated concentration, ATP or AMP-FNP, and Sis1 (bottom) are added to the mixture. One representative technical replicate for each protein combination is given. The results of the SDS-PAGE assay with Coomassie R250 gel staining are shown.

may stimulate Hsp104 interaction with aggregates independently of Hsp70. To test this hypothesis, we also analyzed the formation of Hsp104 complexes at a concentration of 2  $\mu$ M with Sup35NM amyloid aggregates, varying their concentration from 4 to 40  $\mu$ M. We observed a slight increase in the amount of Hsp104 in the pellet fraction in case of a large excess of Sup35NM fibrils (Fig. 17), and this increase was observed both in the presence of ATP and in the presence of AMP-FNP. A similar pattern, however, was observed for the Hsp104 $\Delta$ N variant, which is unable to cure [*PSI*<sup>+</sup>] upon overexpression (Hung, Masison, 2006). Quantitative analysis of the data obtained, however, revealed no significant binding in any of the cases ( $p > 0.05$ ). Adding Sis1 to the mixture also had no effect on the interaction of Hsp104 with the aggregates (Fig. 17). The results indicate that Hsp104 does not form stable complexes with Sup35NM fibrils neither in the presence nor in the absence of Sis1, most likely

requiring other cofactors for efficient binding. It should be noted, however, that the obtained data can be explained by the reduced functional activity of recombinant Hsp104 due to the presence of N-terminal His<sub>6</sub>-tag. Thus, this question requires further investigation.

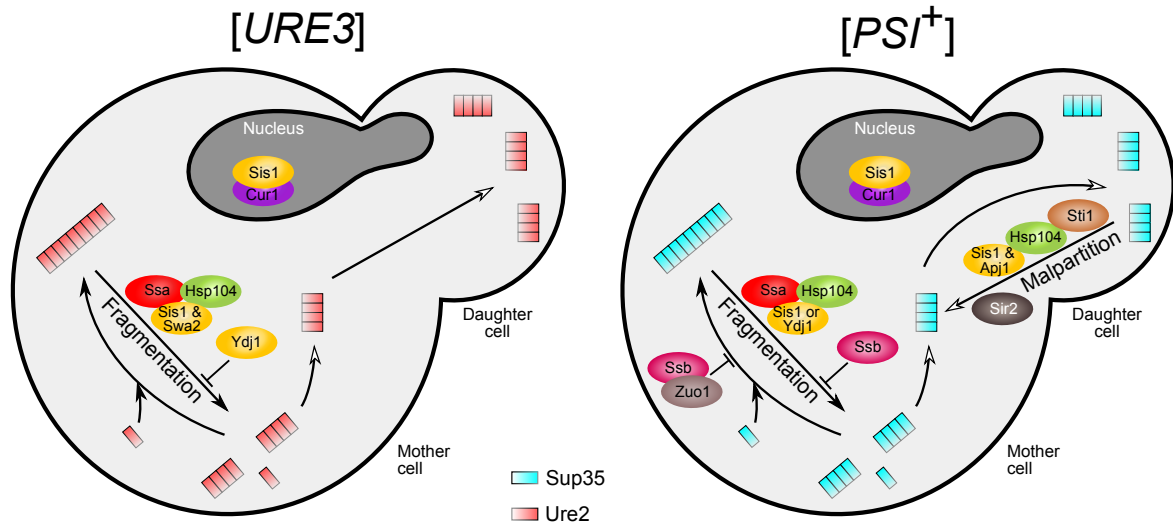
## Chapter 4. Discussion

### 4.1. The role of Hsp40 in the yeast prion life cycle

As was mentioned earlier, proteins of the Hsp40 group play a crucial role in the regulation of the activity and substrate specificity of Hsp70 chaperones (reviewed in Craig, Marszalek, 2017). Yeast prions are no exception, and their maintenance is also largely regulated by the balance of various Hsp40s.

A number of works have demonstrated the central role of Sis1 in the maintenance of the most studied yeast prions (Sondheimer *et al.*, 2001; Tipton *et al.*, 2008; Higurashi *et al.*, 2008; Kirkland *et al.*, 2011; Hines *et al.*, 2011; Reidy *et al.*, 2014; Stein, True, 2014). Yeast prions [*PSI*<sup>+</sup>], [*URE3*], [*PIN*<sup>+</sup>] and [*SWI*<sup>+</sup>] are lost when Sis1 levels in the cell are reduced. although different numbers of generations are required for prion loss (Higurashi *et al.*, 2008). The differential effects on yeast prions we observed upon Sis1 relocalization (Fig. 7, 8; Barbitoff *et al.*, 2017; Matveenko *et al.*, 2018) indicate that in some cases a decrease in cytosolic Sis1 concentration may have a positive effect on prion maintenance, particularly [*PSI*<sup>+</sup>]. Considering that overproduction of NLS-Sis1 does not cause visible changes in the size and morphology of aggregates (Fig. 8), we can assume that a slight decrease in cytosolic concentration of Sis1 affects the distribution of prion aggregates in cell divisions rather than their fragmentation. This assumption is consistent with the increase in the number of prion seeds observed during overproduction of the Cur1 factor (Son, Wickner, 2022). Changes in the pattern of distribution of prion seeds in the divisions may be explained by changes in the activity of Hsp104-mediated prion seed retention in the mother cell.

Together with the previously described opposite effects of Hsp40-Ydj1 and the Cur1 factor on [*PSI*<sup>+</sup>] and [*URE3*] prions, as well as existing reports of the effects of other chaperones on yeast prions, our data allow us to formulate a refined model of the maintenance of various yeast prions (Fig. 18). The maintenance of the [*URE3*] prion strictly depends on high levels of Sis1 as well as on the activity of the cochaperone Swa2. These proteins are critical for



**Figure 18. A model explaining the differential effects of Hsp40 on  $[PSI^+]$  and  $[URE3]$  (model of differential interaction of Hsp40 with yeast prions).** Arrows correspond to cellular processes affecting prion maintenance. Arrows with a white tip denote processes related to prion seed transfer. (Adapted from Matveenko *et al.*, 2018; Barbitoff *et al.*, 2022).

Ure2 fibril fragmentation and prion seed formation. Ydj1, on the other hand, prevents the fragmentation of  $[URE3]$  aggregates, whereby its overexpression leads to the elimination of this prion (Moriyama *et al.*, 2000; Sharma, Masi-son, 2008b). In contrast, for the  $[PSI^+]$  prion, both Sis1 and Ydj1 most likely contribute to aggregate fragmentation; this assumption is supported by both our *in vivo* data (Barbitoff *et al.*, 2017) and the results of *in vitro* experiments (Shorter, Lindquist, 2008). In contrast to  $[URE3]$ , however, the maintenance of  $[PSI^+]$  depends on a second Hsp104-mediated process, the retention of prion seeds in the mother cell. This process promotes prion curing during Hsp104 overproduction. Sis1 overproduction is known to contribute to this process (Kryndushkin *et al.*, 2011). In addition to Sis1, other cofactors such as Hsp40-Apj1, Sti1 and Sir2 also play an important role in this process (Astor *et al.*, 2018; Gorkovskiy *et al.*, 2017; Howie *et al.*, 2019). Thus, a change in the intracellular localization of Sis1 and a drop in its cytosolic concentration may have a greater effect on seed malpartition due to the fact that Sis1 is required for this process, and Ydj1 is not capable of performing this function. On the contrary, aggregate

fragmentation may be less dependent on Sis1 localization due to its function being performed by other proteins of the Hsp40 group.

It is worth noting that our proposed model is based on the presence of an independent mechanism of malpartition. This mechanism, as mentioned above, is most active upon overexpression of *HSP104*, but also works at its normal levels (Gorkovskiy *et al.*, 2017). At the same time, a number of researchers question the existence of such a process. For example, a recent study by Huang *et al.* showed that mutant variants of *HSP104* that cannot cure  $[PSI^+]$  at overexpression (*HSP104* $\Delta N$  and *HSP104*<sup>T160M</sup>) also may have reduced activity in aggregate fragmentation (Huang *et al.*, 2021). As a consequence, prion variants induced in the presence of the normal *HSP104* allele are unable to be maintained by the mutant variant. Based on these data, the authors concluded that the curing process of  $[PSI^+]$  by *HSP104* overexpression is of the same nature as normal aggregate fragmentation. Our results on weakening of the  $[PSI^+]$  prion phenotype upon deletion of the *SIS1* dimerization domain (Fig. 9) can be seen as further evidence in favor of this hypothesis. At the same time, this hypothesis is inconsistent with the results of analysis of the ion phenotype during overproduction of NLS-Sis1, in which we observed enhancement of the prion independent of fragmentation efficiency (Fig. 7, 8)

#### **4.2. Molecular mechanisms of amyloid disaggregation**

The model described in the previous section explains the observed differential effects of Sis1 and other chaperones on yeast prions, but also requires an explanation in terms of the molecular mechanisms of the prion-chaperone interactions in question.

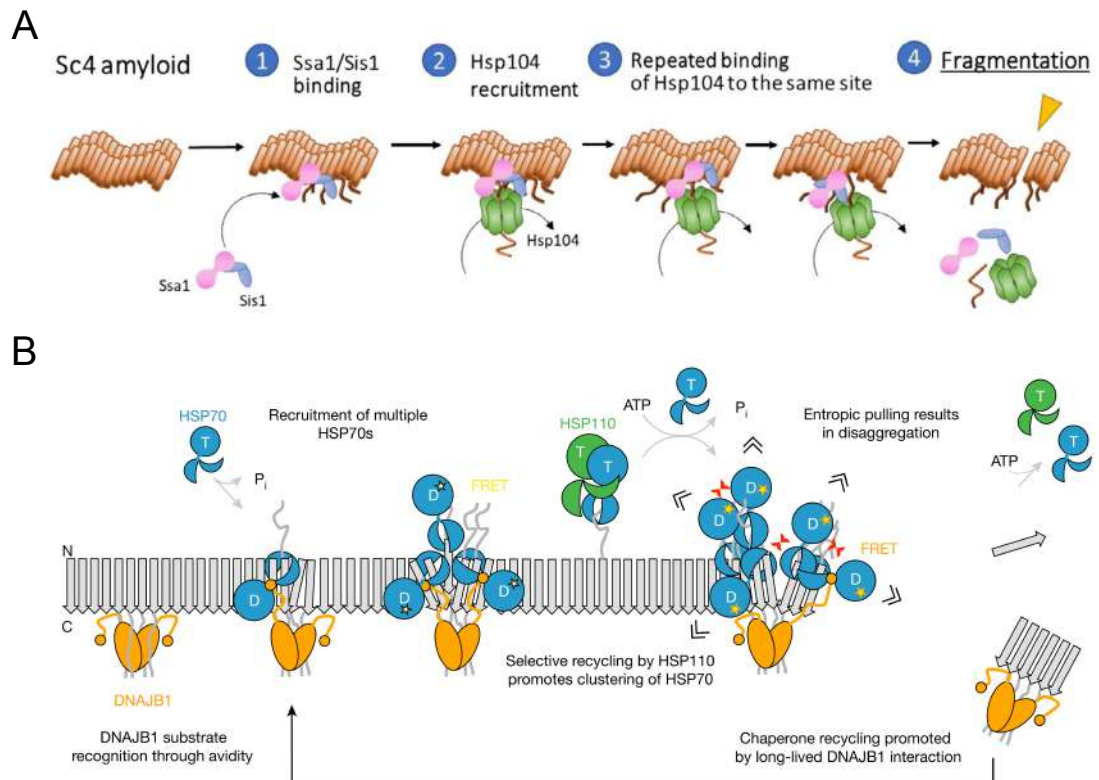
As mentioned in previous chapters, the role of the Hsp40/Hsp70/Hsp104 system in aggregate disassembly was demonstrated as early as 1998 (Glover, Lindquist, 1998; Kushnirov, Ter-Avanesyan, 1998). Over the past two decades, significant efforts have been made in various laboratories to decipher the exact sequence of molecular interactions occurring during the normal disaggregation cycle (reviewed in Kushnirov *et al.*, 2021).



In 2006, in experiments to analyze the aggregation dynamics of full-length Sup35, it was shown that chaperones of Hsp40 and Hsp70 groups preferentially interact with monomeric forms of Sup35 or short oligomers, but not with high molecular weight amyloid fibrils (Krzewska, Melki, 2006). Moreover, Ydj1 showed a more pronounced interaction with Sup35 oligomers compared to Sis1 in these experiments, whose binding to high molecular-weight forms of Sup35 was observed only when interacting with Ssa1. These results are in good agreement with recent work published in 2022 by the Tanaka laboratory (Nakagawa *et al.*, 2022). In that study, super-resolution microscopy was used to monitor chaperone-fibril interactions in real time. The analysis in this paper showed that Sis1 did not interact with Sup35NM fibrils obtained by incubation in cold (at 4° C) («Sc4» amyloid). In contrast, the authors observed efficient chaperone binding to fibrils in the presence of both Sis1 and Ssa1 in solution. Based on these data, the authors proposed a disaggregation model according to which the first step of the aggregate fragmentation cycle is the joint binding of the Sis1/Ssa1 complex to the fibril followed by multiple events of Hsp104 binding to the same fibril site (Fig. 19A).

The data we obtained in our study contradict the results from the above-mentioned works. Thus, we observed effective interaction of Sis1 with Sup35NM amyloid fibrils without any cofactors (Fig. 12, 14, Barbitoff *et al.*, 2020). The discrepancy between our results and the literature data may be due to two main reasons: first, Krzewska, Melki, 2006 used aggregates of the full-length Sup35 protein rather than its Sup35NM fragment. In Nakagawa *et al.*, 2022 exactly Sup35NM was used, but Sc4 fibrils were obtained under different temperature conditions compared to our experiments. At the same time, the authors do not provide data on the interaction of Sis1 with another type of Sup35NM fibrils used in their study - Sc37.

An interaction of Sis1 with Sup35NM aggregates similar to that observed in our experiments was noted in the work of Lindquist lab (Shorter, Lindquist, 2008). In this study, Sis1 demonstrated the ability to interact with both oligomeric and fibrillar forms of Sup35NM. The primary interaction of Hsp40



**Figure 19. Models for disaggregation of amyloid aggregates.** Adapted for the disaggregation of Sup35NM (Sc4) amyloid fibrils (Nakagawa *et al.*, 2022) (A) and  $\alpha$ -synuclein (Wentink *et al.*, 2020) (B) are shown.

with aggregate in the normal amyloid disaggregation cycle has also been shown for the  $\alpha$ -synuclein aggregate disaggregation system (Wentink *et al.*, 2020). This study proposed a model of amyloid fibril disaggregation in mammalian cells mediated solely by the Hsp40/Hsp70 system (Fig. 18B). According to this model, clustering of Hsp70 molecules in a single site of the amyloid fibril plays a key role in fibril fragmentation. The process of disaggregation itself, according to the authors, is caused by the mechanism of "entropic pulling—multiple movements of clustered Hsp70 molecules in various directions. Nucleotide exchange factor, Hsp110, also plays an important role in cluster formation. Among other things, this model suggests that long-term binding of Hsp40-DNAJB1 to the fibril may contribute to chaperone recycling.

Thus, the combination of the results obtained in our experiments as well as

those described in the scientific literature suggests that amyloid disaggregation can follow several alternative pathways, and the specific sequence of chaperone-fibril interactions can vary depending on the conformation of the protein within the fibrils. In spite of this, the results of our analysis of the effect of mutations in the Sup35 prion domain on the interaction of Sis1 with fibrils (Fig. 14) indicate that the observed differences may be related not so much to the conformation of monomers in the fibrils, as to experimental conditions and specific features of organization of protofilaments in the aggregate.

### 4.3. The functional impact of Hsp40 binding to aggregates

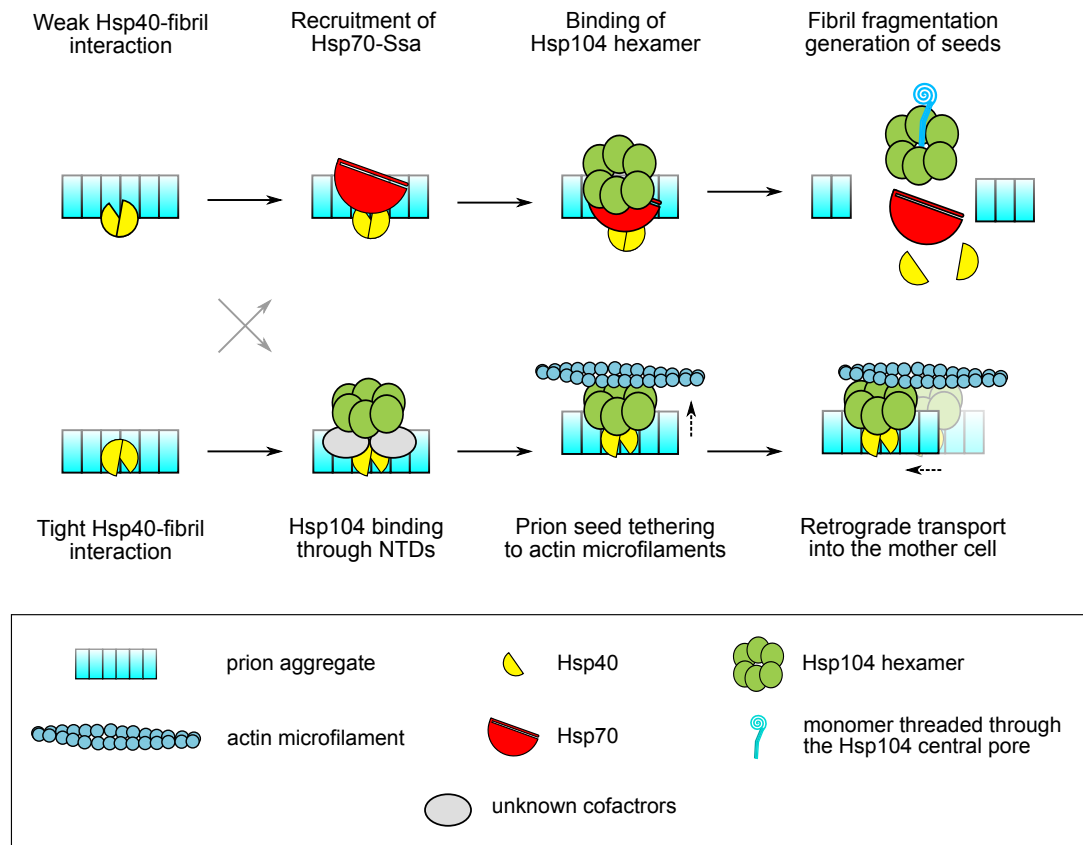
Despite the features described above, we observed consistent and reproducible differences in the efficiency of Sis1 binding to the fibrils of different proteins and in the efficiency of Hsp70 attraction to them (Figures 12, 15, 16, Barbitoff *et al.*, 2020). As noted earlier, we did not observe a clear relationship between the binding of Hsp40 to the fibrils and the efficiency of Ssa1 recruitment to them (Fig. 20). These results may suggest that the process of amyloid fibril fragmentation in yeast cells can start both with the primary binding of Hsp40 to the fibril and with the joint binding of the Hsp40/Hsp70

Hsp40	Prion/protein	Fibril binding	Curing by ↑ <i>HSP104</i>	Ssa1 recruitment	Prion maintenance
Sis1	[ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ]/Sup35NM				
Sis1ΔDD	[ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ]/Sup35NM		**	*	**
Sis1	[ <i>RNQ</i> <sup>+</sup> ]/Rnq1				
Sis1ΔDD	[ <i>RNQ</i> <sup>+</sup> ]/Rnq1				**

**Figure 20. Differential interaction of Sis1 with yeast prions and amyloid fibrils.** Table summarizes the effects of Sis1 and Sis1ΔDD on prion maintenance and curing by *HSP104* overexpression, and shows Sis1 binding to amyloid fibrils (Fig. 12, Barbitoff *et al.*, 2020) and Ssa1 recruitment to them (Fig. 15, 16). Green indicates cases where a given Sis1 variant effectively participates in or contributes to a particular process. Yellow indicates insufficient activity of Sis1 in a given process. Orange and red indicate cases in which Sis1 is unable to participate in a given process. \* - observed effects are of low confidence, \*\* - observed effects are strain-specific.

complex to it. Note that the efficiency of Ssa1 recruitment to fibrils in our experiments corresponded relatively closely to the observed effects on prion maintenance — deletion of the Sis1 dimerization domain reduced the efficiency of Ssa1 recruitment (Figs. 15, 16), which is consistent with the weakening of the [*PSI*<sup>+</sup>] and some [*PIN*<sup>+</sup>] strains (Stein, True, 2014). At the same time, the differences we observed in the efficiency of Sis1 binding to the fibril correlate well with the ability of the corresponding prion to be cured by *HSP104* overexpression (Fig. 20). Two alternative explanations for this phenomenon can be proposed: first, we can assume that the stable interaction of Hsp40 with the aggregate promotes intracellular sorting of the Hsp40-fibril complex; second, high-affinity binding of Sis1 to the fibril may modify the activity of other chaperone system components and alter the course of the disaggregation cycle.

Regardless of whether any of the hypotheses proposed above is valid, the data obtained allow us to formulate a model of how Hsp40 determines the course of Hsp104-mediated processes (Fig. 21, Barbitoff *et al.*, 2020; 2022). Based on our results (Fig. 12, 15) and the literature on the role of Sis1 in prion maintenance (Kryndushkin *et al.*, 2002; Kirkland *et al.*, 2011), we suggest that weak Sis1 binding to the fibril (or binding of the pre-existing Sis1/Ssa1 complex) leads to proper assembly of the Hsp70/Hsp104 complex and subsequent amyloid fibril fragmentation. In contrast, the strong binding of Hsp40 to the fibril promotes the functionally distinct interaction of Hsp104 with the fibril mediated by the N-domain of Hsp104. It is important to note that according to our data (Fig. 17) this interaction is most likely stimulated by a number of additional cofactors and cannot occur solely through Sis1. It is very likely that Hsp70 can also act as such a cofactor in the case of its incorrect coordination relative to the fibril. Such an assumption could explain both some of the literature data (in particular, the role of Ssa1 in the alternative amyloid fragmentation pathway of Sc37 (Nakagawa *et al.*, 2022)) and the results of our analysis of the binding of the mutant Ssa1 variant, Ssa1-21, to fibrils (Fig. 16). In light of the fact that we do not observe a clear relationship between Hsp40 binding and Hsp70 recruitment to fibrils (Figs. 15, 20) we can assume that the strength of Hsp40 binding does not predetermine



**Figure 21. A refined model of differential interaction of chaperones with fibrils.** The dotted lines correspond to the movements of the molecules and the formation of complexes. Gray arrows correspond to side processes. Adapted from Barbitoff *et al.*, 2022.

the fate of a particular amyloid aggregate, but predisposes the process to go through one of the pathways.

Literature data suggest that actin cytoskeleton can play an important role in Hsp104-mediated malpartition of prion seeds. Deletions of genes encoding the actin-binding protein Lsb2 and the Sir2 deacetylase markedly affect  $[PSI^+]$  destabilization during heat shock (Howie *et al.*, 2019). It is also known that the interaction between Hsp104 and the actin cytoskeleton is actively involved in the control of asymmetric segregation of protein aggregates (Tessarz *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010). Thus, the process of prion seed malpartition may also involve the attachment of aggregates in complex with Hsp104 to the actin

cytoskeleton and polarisome-mediated transport into the mother cell.

A number of assumptions can be made to explain the need for two independent processes in the cell mediated by the Hsp40/Hsp70/Hsp104 system. Such a system can be used by the cell for differential distribution and sorting of pathological and functional protein aggregates. For example, the retention of aggregates in the cell during cell division can prevent the spread of pathological protein aggregates, reducing their negative impact on the cell population or the organism. In recent years, a number of proteins have been discovered in humans that may serve as candidates for the role of Hsp104-like disaggregase (e.g., Ruvbl1/2 (Zaarur *et al.*, 2015) and Torsin A (Adam *et al.*, 2017)). Further studies in this area will allow us to understand whether Hsp104-mediated protein aggregate fate determination models extend to the processes accompanying human and mammalian amyloidoses.

## Chapter 5. Conclusions

The results of our work allow us to draw the following conclusions:

1. Changes in the intracellular localization of Sis1 from cytoplasmic to intranuclear affects yeast prions in different ways, enhancing the manifestation of some [*PSI*<sup>+</sup>] variants and stimulating the loss of [*URE3*].
2. Sis1 forms complexes with Sup35NM amyloid fibrils significantly more efficiently than with Rnq1 fibrils in the *in vitro* system.
3. Deletion of the dimerization domain of Sis1 weakens its interaction with amyloid fibrils in the *in vitro* system.
4. The strength of Hsp40 binding to amyloid aggregates has no direct effect on the efficiency of Hsp70-Ssa1 recruitment to fibrils.

## Reference

1. Adam I., Jossé L., Tuite M. F. Human TorsinA can function in the yeast cytosol as a molecular chaperone // *Biochemical Journal*. 2017. Vol. 474, no. 20. P. 3439–3454.
2. Agaphonov M., Alexandrov A. Self-excising integrative yeast plasmid vectors containing an intronated recombinase gene // *FEMS Yeast Research*. 2014. Vol. 14, no. 7. P. 1048–1054.
3. Alberti S., Halfmann R., King O., Kapila A., Lindquist S. A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins // *Cell*. 2009. Vol. 137. P. 146–158.
4. Allen K. D., Wegrzyn R. D., Chernova T. A., Müller S., Newnam G. P., Winslett P. A., Wittich K. B., Wilkinson K. D., Chernoff Y. O. Hsp70 chaperones as modulators of prion life cycle: Novel effects of Ssa and Ssb on the *Saccharomyces cerevisiae* prion [PSI<sup>+</sup>] // *Genetics*. 2005. Vol. 169, no. 3. P. 1227–1242.
5. Amor A. J., Castanzo D. T., Delany S. P., Selechnik D. M., Ooy A. van, Cameron D. M. The ribosome-associated complex antagonizes prion formation in yeast // *Prion*. 2015. Vol. 9, no. 2. P. 144–164.
6. Anfinsen C. B., Haber E., Sela M., White Jr F. H. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1961. Sept. Vol. 47, no. 9. P. 1309–1314.
7. Aron R., Higurashi T., Sahi C., Craig E. A. J-protein co-chaperone Sis1 required for generation of [RNQ<sup>+</sup>] seeds necessary for prion propagation // *EMBO Journal*. 2007. Vol. 26, no. 16. P. 3794–3803.
8. Astor M. T., Kamiya E., Sporn Z. A., Berger S. E., Hines J. K. Variant-specific and reciprocal Hsp40 functions in Hsp104-mediated prion elimination // *Molecular Microbiology*. 2018. Vol. 109. P. 41–62.
9. Balch W. E., Morimoto R. I., Dillin A., Kelly J. W. Adapting proteostasis for disease intervention // *Science*. 2008. Vol. 319, no. 5865. P. 916–919.



10. Barbitoff Y. A., Matveenko A. G., Moskalenko S. E., Zemlyanko O. M., Newnam G. P., Patel A. X., Chernova T. A., Chernoff Y. O., Zhouravleva G. A. To CURE or not to CURE? Differential effects of the chaperone sorting factor Cur1 on yeast prions are mediated by the chaperone Sis1 // *Molecular Microbiology*. 2017. Vol. 105, no. 2. P. 242–257.
11. Barbitoff Y. A., Matveenko A. G., Bondarev S. A., Maksiutenko E. M., Kulikova A. V., Zhouravleva G. A. Quantitative assessment of chaperone binding to amyloid aggregates identifies specificity of Hsp40 interaction with yeast prion fibrils // *FEMS Yeast Research*. 2020. Vol. 20, no. 4. foaa025.
12. Barbitoff Y. A., Matveenko A. G., Zhouravleva G. A. Differential interactions of molecular chaperones and yeast prions // *Journal of Fungi*. 2022. Vol. 8, no. 2. P. 1–18.
13. Bateman D. A., Wickner R. B. The  $[PSI^+]$  Prion Exists as a Dynamic Cloud of Variants // *PLoS Genetics*. 2013. Vol. 9, no. 1. P. 1–13.
14. Berger S. E., Nolte A. M., Kamiya E., Hines J. K. Three J-proteins impact Hsp104-mediated variant-specific prion elimination: a new critical role for a low-complexity domain // *Current Genetics*. 2020. Feb. Vol. 66, no. 1. P. 51–58.
15. Bertelsen E. B., Zhou H., Lowry D. F., Flynn G. C., Dahlquist F. W. Topology and dynamics of the 10 kDa C-terminal domain of DnaK in solution // *Protein Science*. 2008. Dec. Vol. 8, no. 2. P. 343–354.
16. Bondarev S. A., Shchepachev V. V., Kajava A. V., Zhouravleva G. A. Effect of charged residues in the N-domain of Sup35 protein on prion  $[PSI^+]$  stability and propagation // *Journal of Biological Chemistry*. 2013. Vol. 288, no. 40. P. 28503–28513.
17. Bondarev S. A. Effect of mutations in the Sup35 prionizing domain on the prion  $[PSI^+]$  properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* [In Russian] : Thesis for a Candidate degree in biological sciences. SPBU, 2014. P. 119.

18. Boorstein W. R., Ziegelhoffer T., Craig E. A. Molecular evolution of the *HSP70* multigene family. // *Journal of Molecular Evolution*. 1994. Vol. 38, no. 1. P. 1–17.
19. Brachmann A., Baxa U., Wickner R. B. Prion generation in vitro: amyloid of Ure2p is infectious. // *EMBO Journal*. 2005. Vol. 24, no. 17. P. 3082–3092.
20. Byrne K. P., Wolfe K. H. The Yeast Gene Order Browser: Combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species // *Genome Research*. 2005. Vol. 15. P. 1456–1461.
21. Chabelskaya S., Kiktev D., Inge-Vechtomov S., Philippe M., Zhouravleva G. Nonsense mutations in the essential gene *SUP35* of *Saccharomyces cerevisiae* are non-lethal. // *Molecular Genetics and Genomics*. 2004. Vol. 272, no. 3. P. 297–307.
22. Cheetham M. E., Caplan A. J. Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. // *Cell Stress & Chaperones*. 1998. Vol. 3, no. 1. P. 28–36.
23. Chernoff Y. O., Lindquist S. L., Ono B., Inge-Vechtomov S. G., Liebman S. W. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [*PSI*<sup>+</sup>]. // *Science*. 1995. Vol. 268, no. 5212. P. 880–884.
24. Chernoff Y. O., Newnam G. P., Kumar J., Allen K., Zink A. D. Evidence for a protein mutator in yeast: role of the Hsp70-related chaperone *ssb* in formation, stability, and toxicity of the [*PSI*] prion. // *Molecular and Cellular Biology*. 1999. Vol. 19, no. 12. P. 8103–12.
25. Chernoff Y. O., Kiktev D. A. Dual role of ribosome-associated chaperones in prion formation and propagation // *Current Genetics*. 2016. Vol. 62, no. 4. P. 677–685.
26. Chernova T. A., Wilkinson K. D., Chernoff Y. O. Physiological and environmental control of yeast prions. // *FEMS Microbiology reviews*. 2014. Vol. 38, no. 2. P. 326–44.

27. Christianson T. W., Sikorski R. S., Dante M., Shero J. H., Hieter P. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. // *Gene*. 1992. Vol. 110, no. 1. P. 119–122.
28. Clogg C. C., Petkova E., Haritou A. Statistical methods for comparing regression coefficients between models. // *American Journal of Sociology*. US, 1995. Vol. 100, no. 5. P. 1261–1293.
29. Cox B. S.  $\Psi$ , A cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast // *Heredity*. 1965. Vol. 20, no. 4. P. 505–521.
30. Cox B., Tuite M. The life of [PSI] // *Current Genetics*. 2018. Vol. 64, no. 1. P. 1–8.
31. Craig E. A., Marszalek J. How do J-proteins get Hsp70 to do so many different things? // *Trends in Biochemical Sciences*. 2017. Vol. 42, no. 5. P. 355–368.
32. Cranz-Mileva S., Imkamp F., Kolygo K., Maglica Ž., Kress W., Weber-Ban E. The Flexible Attachment of the N-Domains to the ClpA Ring Body Allows their Use On Demand // *Journal of Molecular Biology*. 2008. Vol. 378, no. 2. P. 412–424.
33. Crow E. T., Li L. Newly identified prions in budding yeast, and their possible functions // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2011. Vol. 22, no. 5. P. 452–459.
34. DePace A. H., Santoso A., Hillner P., Weissman J. S. A critical role for amino-terminal glutamine/asparagine repeats in the formation and propagation of a yeast prion // *Cell*. 1998. Vol. 93, no. 7. P. 1241–1252.
35. Derdowski A., Sindi S. S., Klaips C. L. A size threshold limits prion transmission and establishes phenotypic diversity // *Science*. 2010. Vol. 330, no. 6004. P. 680–683.
36. Derkatch I. L., Chernoff Y. O., Kushnirov V. V., Inge-Vechtomov S. G., Liebman S. W. Genesis and variability of [PSI] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genetics*. 1996. Dec. Vol. 144, no. 4. P. 1375–1386.

37. Derkatch I. L., Bradley M. E., Zhou P., Chernoff Y. O., Liebman S. W. Genetic and environmental factors affecting the de novo appearance of the [PSI<sup>+</sup>] prion in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genetics*. 1997. Vol. 147, no. 2. P. 507–519.
38. Derkatch I. L., Bradley M. E., Hong J. Y., Liebman S. W. Prions affect the appearance of other prions: the story of [PIN<sup>+</sup>] // *Cell*. 2001. Vol. 106. P. 171–182.
39. Deville C., Carroni M., Franke K. B., Topf M., Bukau B., Mogk A., Saibil H. R. Structural pathway of regulated substrate transfer and threading through an Hsp100 disaggregase // *Science Advances*. 2017. Vol. 3, no. 8. e1701726.
40. Dobson C. M. Protein folding and misfolding // *Nature*. 2003. Vol. 426, no. 6968. P. 884–890.
41. Douglas P. M., Treusch S., Ren H.-Y., Halfmann R., Duennwald M. L., Lindquist S., Cyr D. M. Chaperone-dependent amyloid assembly protects cells from prion toxicity. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. Vol. 105, no. 20. P. 7206–7211.
42. Drozdova P. B., Tarasov O. V., Matveenko A. G., Radchenko E. A., Sopova J. V., Polev D. E., Inge-Vechtomov S. G., Dobrynin P. V. Genome Sequencing and Comparative Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Strains of the Peterhof Genetic Collection. // *PloS one*. 2016. Vol. 11, no. 5. e0154722.
43. Drozdova P. B., Barbitoff Y. A., Belousov M. V., Skitchenko R. K., Rogoza T. M., Leclercq J. Y., Kajava A. V., Matveenko A. G., Zhouravleva G. A., Bondarev S. A. Estimation of amyloid aggregate sizes with semi-denaturing detergent agarose gel electrophoresis and its limitations // *Prion*. 2020. Vol. 14, no. 1. P. 118–128.
44. Du Z., Park K.-w., Yu H., Fan Q., Li L. Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nature Genetics*. 2008. Vol. 40, no. 4. P. 460–465.

45. Du Z., Zhang Y., Li L. The yeast prion [*SWI*<sup>+</sup>] abolishes multicellular growth by triggering conformational changes of multiple regulators required for flocculin gene expression // *Cell Reports*. 2015. Vol. 13, no. 12. P. 2865–2878.
46. Duran E. C., Weaver C. L., Lucius A. L. Comparative analysis of the structure and function of AAA+ motors ClpA, ClpB, and Hsp104: Common threads and disparate functions // *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2017. Vol. 4. P. 54.
47. Eaglestone S. S., Ruddock L. W., Cox B. S., Tuite M. F. Guanidine hydrochloride blocks a critical step in the propagation of the prion-like determinant [*PSI*<sup>+</sup>] of *Saccharomyces cerevisiae* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000. Vol. 97, no. 1. P. 240–244.
48. Ellis J. Proteins as molecular chaperones // *Nature*. 1987. Vol. 328, no. 6129. P. 378–379.
49. Escusa-Toret S., Vonk W. I., Frydman J. Spatial sequestration of misfolded proteins by a dynamic chaperone pathway enhances cellular fitness during stress // *Nature Cell Biology*. 2013. Vol. 15, no. 10. P. 1231–1243.
50. Faust O., Abayev-Avraham M., Wentink A. S., Maurer M., Nillegoda N. B., London N., Bukau B., Rosenzweig R. HSP40 proteins use class-specific regulation to drive HSP70 functional diversity // *Nature*. 2020. Nov. Vol. 587, no. 7834. P. 489–494.
51. Fohlman J., Eaker D., Karlsoon E., Thesleff S. Taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian snake taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*). Isolation, characterization, quaternary structure and pharmacological properties // *European Journal of Biochemistry*. England, 1976. Sept. Vol. 68, no. 2. P. 457–469.
52. Franzmann T. M., Janel M., Pozniakovsky A., Mahamid J., Holehouse A. S., Nüske E., Richter D., Baumeister W., Grill S. W., Pappu R. V., Hyman A. A., Alberti S. Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness // *Science*. 2018. Jan. Vol. 359, no. 6371. eaao5654.

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

62. Gorkovskiy A., Reidy M., Masison D. C., Wickner R. B. Hsp104 disaggregase at normal levels cures many [*PSI*<sup>+</sup>] prion variants in a process promoted by Sti1p, Hsp90, and Sis1p // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017. In press.
63. Greene M. K., Maskos K., Landry S. J. Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998. Vol. 95, no. 11. P. 6108–6113.
64. Halfmann R., Lindquist S. Screening for amyloid aggregation by Semi-Denaturing Detergent-Agarose Gel Electrophoresis. // *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 2008. No. 17.
65. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *Journal of Molecular Biology*. 1983. Vol. 166, no. 4. P. 557–580.
66. Harris J. M., Nguyen P. P., Patel M. J., Sporn Z. a., Hines J. K. Functional diversification of Hsp40: distinct J-protein functional requirements for two prions allow for chaperone-dependent prion selection // *PLoS Genetics*. 2014. Vol. 10, no. 7. e1004510.
67. Hartl F. U. Unfolding the chaperone story // *Molecular Biology of the Cell*. 2017. Nov. Vol. 28, no. 22. P. 2919–2923.
68. Helsen C. W., Glover J. R. Insight into molecular basis of curing of [*PSI* +] prion by overexpression of 104-kDa heat shock protein (Hsp104) // *Journal of Biological Chemistry*. 2012. Vol. 287, no. 1. P. 542–556.
69. Hemmingsen S. M., Woolford C., Vies S. M. van der, Tilly K., Dennis D. T., Georgopoulos C. P., Hendrix R. W., Ellis R. J. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly // *Nature*. 1988. May. Vol. 333, no. 6171. P. 330–334.
70. Higurashi T., Hines J. K., Sahi C., Aron R., Craig E. A. Specificity of the J-protein Sis1 in the propagation of 3 yeast prions. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. Vol. 105, no. 43. P. 16596–16601.

71. Hines J. K., Li X., Du Z., Higurashi T., Li L., Craig E. A. [*SWT*<sup>+</sup>], the prion formed by the chromatin remodeling factor Swi1, is highly sensitive to alterations in Hsp70 chaperone system activity // *PLoS Genetics*. 2011. Vol. 7, no. 2. P. 27–29.
72. Ho C. T., Grousl T., Shatz O., Jawed A., Ruger-Herreros C., Semmelink M., Zahn R., Richter K., Bukau B., Mogk A. Cellular sequestrases maintain basal Hsp70 capacity ensuring balanced proteostasis // *Nature Communications*. 2019. Vol. 10, no. 1. P. 1–15.
73. Howie R. L., Jay-Garcia L. M., Kiktev D. A., Faber Q. L., Murphy M., Rees K. A., Sachwani N., Chernoff Y. O. Role of the cell asymmetry apparatus and ribosome-associated chaperones in the destabilization of a *Saccharomyces cerevisiae* prion by heat shock // *Genetics*. 2019. Vol. 212, no. 3. P. 757–771.
74. Huang Y. W., King C.-Y. A complete catalog of wild-type Sup35 prion variants and their protein-only propagation // *Current Genetics*. 2020. Feb. Vol. 66, no. 1. P. 97–122.
75. Huang Y. W., Kushnirov V. V., King C. Y. Mutable yeast prion variants are stabilized by a defective Hsp104 chaperone // *Molecular Microbiology*. 2021. Vol. 115, no. 4. P. 774–788.
76. Hung G.-C., Masison D. C. N-Terminal Domain of Yeast Hsp104 Chaperone Is Dispensable for Thermotolerance and Prion Propagation but Necessary for Curing Prions by Hsp104 Overexpression // *Genetics*. 2006. Vol. 173, June. P. 611–620.
77. Iadanza M. G., Jackson M. P., Hewitt E. W., Ranson N. A., Radford S. E. A new era for understanding amyloid structures and disease // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018. Vol. 19, no. 12. P. 755–773.
78. Inoue Y. Life cycle of yeast prions: propagation mediated by amyloid fibrils // *Protein & Peptide Letters*. 2009. Mar. Vol. 16, no. 3. P. 271–276.
79. James P., Pfund C., Craig E. a. Functional specificity among Hsp70 molecular chaperones. // *Science*. 1997. Vol. 275, no. 5298. P. 387–389.



80. Jones G. W., Masison D. C. *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 mutations affect  $[PSI^+]$  prion propagation and cell growth differently and implicate Hsp40 and tetratricopeptide repeat cochaperones in impairment of  $[PSI^+]$  // Genetics. 2003. Vol. 163, no. 2. P. 495–506.
81. Jung G., Jones G., Wegrzyn R. D., Masison D. C. A role for cytosolic hsp70 in yeast  $[PSI^+]$  prion propagation and  $[PSI^+]$  as a cellular stress. // Genetics. 2000. Oct. Vol. 156, no. 2. P. 559–70.
82. Kadnar M. L., Articov G., Derkatch I. L. Distinct type of transmission barrier revealed by study of multiple prion determinants of Rnq1 // PLoS Genetics. 2010. Vol. 6, no. 1. P. 31–34.
83. Kaganovich D., Kopito R., Frydman J. Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. // Nature. 2008. Vol. 454, no. 7208. P. 1088–1095.
84. Kaiser C., Michaelis S., Mitchell A. Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. P. 234.
85. Kampinga H. H., Craig E. A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2010. Vol. 11, no. 8. P. 579–592.
86. Kiktev D., Inge-Vechtomov S., Zhouravleva G. Prion-dependent lethality of *sup45* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. // Prion. 2007. Vol. 1, no. 2. P. 136–143.
87. Kiktev D. A., Chernoff Y. O., Archipenko A. V., Zhouravleva G. A. Identification of genes influencing synthetic lethality of genetic and epigenetic alterations in translation termination factors in yeast // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2011. Vol. 438, no. 3. P. 117–119.
88. Kiktev D. A., Melomed M. M., Lu C. D., Newnam G. P., Chernoff Y. O. Feedback control of prion formation and propagation by the ribosome-associated chaperone complex // Molecular Microbiology. 2015. Vol. 96, no. 3. P. 621–632.
89. Kirkland P. A., Reidy M., Masison D. C. Functions of yeast Hsp40 chaperone Sis1p dispensable for prion propagation but important for prion cur-

- ing and protection from prion toxicity // *Genetics*. 2011. Vol. 188, no. 3. P. 565–577.
90. Kityk R., Kopp J., Mayer M. P. Molecular Mechanism of J-Domain-Triggered ATP Hydrolysis by Hsp70 Chaperones // *Molecular Cell*. 2018. Vol. 69, no. 2. 227–237.e4.
91. Klaips C. L., Gropp M. H. M., Hipp M. S., Hartl F. U. Sis1 potentiates the stress response to protein aggregation and elevated temperature // *Nature Communications*. 2020. Dec. Vol. 11, no. 1. P. 6271.
92. Kominek J., Marszalek J., Neuvéglise C., Craig E. A., Williams B. L. The complex evolutionary dynamics of Hsp70s: A genomic and functional perspective // *Genome Biology and Evolution*. 2013. Vol. 5, no. 12. P. 2460–2477.
93. Krantz K. C., Puchalla J., Thapa R., Kobayashi C., Bisher M., Viehweg J., Carr C. M., Rye H. S. Clathrin coat disassembly by the yeast hsc70/Ssa1p and auxilin/Swa2p proteins observed by single-particle burst analysis spectroscopy // *Journal of Biological Chemistry*. 2013. Vol. 288, no. 37. P. 26721–26730.
94. Kroschwald S., Maharana S., Mateju D., Malinowska L., Elisabeth N., Poser I., Richter D., Alberti S. Promiscuous interactions and protein disaggregases determine the material state of stress-inducible RNP granules // *eLife*. 2015. Vol. 4. e06807.
95. Kryndushkin D. S., Smirnov V. N., Ter-Avanesyan M. D., Kushnirov V. V. Increased expression of Hsp40 chaperones, transcriptional factors, and ribosomal protein Rpp0 can cure yeast prions // *Journal of Biological Chemistry*. 2002. Vol. 277, no. 26. P. 23702–23708.
96. Kryndushkin D. S., Alexandrov I. M., Ter-Avanesyan M. D., Kushnirov V. V. Yeast [*PSI*<sup>+</sup>] Prion Aggregates Are Formed by Small Sup35 Polymers Fragmented by Hsp104 // *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Dec. Vol. 278, no. 49. P. 49636–49643.

97. Kryndushkin D. S., Shewmaker F., Wickner R. B. Curing of the [*URE3*] prion by Btn2p, a Batten disease-related protein. // *EMBO Journal*. 2008. Vol. 27, no. 20. P. 2725–2735.
98. Kryndushkin D. S., Engel A., Edskes H., Wickner R. B. Molecular chaperone Hsp104 can promote yeast prion generation // *Genetics*. 2011. Vol. 188, no. 2. P. 339–348.
99. Krzewska J., Melki R. Molecular chaperones and the assembly of the prion Sup35p, an in vitro study // *EMBO Journal*. 2006. Vol. 25, no. 4. P. 822–833.
100. Kumar S., Dine E. A., Paddock E., Steinberg D. N., Greene L. E., Masison D. C. Mutations outside the Ure2 amyloid-forming region disrupt [*URE3*] prion propagation and alter interactions with protein quality control factors // *Molecular and Cellular Biology*. 2020. Oct. Vol. 40, no. 21. e00294–20.
101. Kumar J., Reidy M., Masison D. C. Yeast J-protein Sis1 prevents prion toxicity by moderating depletion of prion protein // *Genetics*. 2021. Oct. Vol. 219, no. 2. iyab129.
102. Kushnirov V. V., Ter-Avanesyan M. D. Structure and replication of yeast prions // *Cell*. 1998. Vol. 94, no. 1. P. 13–16.
103. Kushnirov V. V., Kryndushkin D. S., Boguta M., Smirnov V. N., Ter-Avanesyan M. D. Chaperones that cure yeast artificial [*PSI*<sup>+</sup>] and their prion-specific effects // *Current Biology*. 2000. Vol. 10, no. 22. P. 1443–1446.
104. Kushnirov V. V., Alexandrov I. M., Mitkevich O. V., Shkundina I. S., Ter-Avanesyan M. D. Purification and analysis of prion and amyloid aggregates. // *Methods (San Diego, Calif.)* 2006. May. Vol. 39, no. 1. P. 50–55.
105. Kushnirov V. V., Dergalev A. A., Alexandrov A. I. Proteinase K resistant cores of prions and amyloids // *Prion*. 2020. Vol. 14, no. 1. P. 11–19.

106. Kushnirov V. V., Dergalev A. A., Alexandrov A. I. Amyloid fragmentation and disaggregation in yeast and animals // *Biomolecules*. 2021. Dec. Vol. 11, no. 12. P. 1884.
107. Kushnirov V. V., Dergalev A. A., Alieva M. K., Alexandrov A. I. Structural bases of prion variation in yeast // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23, no. 10. P. 5738.
108. Lacroute F. Non-Mendelian mutation allowing ureidosuccinic acid uptake in yeast. // *Journal of bacteriology*. 1971. Vol. 106, no. 2. P. 519–522.
109. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227, no. 5259. P. 680–685.
110. Laskey R. A., Honda B. M., Mills A. D., Finch J. T. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA // *Nature*. 1978. Vol. 275, October. P. 416–420.
111. Lee S., Fan C. Y., Michael Younger J., Ren H. Identification of essential residues in the type II Hsp40 Sis1 that function in polypeptide binding // *Journal of Biological Chemistry*. 2002. Vol. 277, no. 24. P. 21675–21682.
112. Lee J., Sung N., Mercado J. M., Hryc C. F., Chang C., Lee S., Tsai F. T. Overlapping and specific functions of the Hsp104 N-domain define its role in protein disaggregation // *Scientific Reports*. 2017. Dec. Vol. 7, no. 1. P. 11184.
113. Levinthal, Cyrus. Are there pathways for protein folding? // *J. Chim. Phys.* 1968. Vol. 65. P. 44–45.
114. Li J., Wu Y., Qian X., Sha B. Crystal structure of yeast Sis1 peptide-binding fragment and Hsp70 Ssa1 C-terminal complex. // *The Biochemical journal*. 2006. Vol. 398, no. 3. P. 353–360.
115. Liebman S. W., Chernoff Y. O. Prions in yeast // *Genetics*. 2012. Vol. 191, no. 4. P. 1041–1072.
116. Liu Q., Hendrickson W. A. Insights into Hsp70 Chaperone Activity from a Crystal Structure of the Yeast Hsp110 Sse1 // *Cell*. 2007. Vol. 131, no. 1. P. 106–120.

117. Liu B., Larsson L., Caballero A., Hao X., Öling D., Grantham J., Nyström T. The polarisome is required for segregation and retrograde transport of protein aggregates // *Cell*. 2010. Vol. 140, no. 2. P. 257–267.
118. Lotz S. K., Knighton L. E., Nitika, Jones G. W., Truman A. W. Not quite the SSAME: unique roles for the yeast cytosolic Hsp70s // *Current Genetics*. 2019. Vol. 65, no. 5. P. 1127–1134.
119. Malinovska L., Kroschwald S., Munder M. C., Richter D., Alberti S. Molecular chaperones and stress-inducible protein-sorting factors coordinate the spatiotemporal distribution of protein aggregates // *Molecular Biology of the Cell*. 2012. Vol. 23, no. 16. P. 3041–3056.
120. 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*<sup>+</sup>] Prion and *SWI1* Deletion in Yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes*. 2019. Mar. Vol. 10, no. 3. P. 212.
121. Martin J., Mayhew M., Langer T., Hartl F. U. The reaction cycle of GroEL and GroES in chaperonin-assisted protein folding // *Nature*. 1993. Vol. 366, no. 6452. P. 228–233.
122. Masison D. C., Wickner R. B. Prion-Inducing Domain of Yeast Ure2p and Protease Resistance of Ure2p in Prion-Containing Cells // *Science*. 1995. Oct. Vol. 270, no. 5233. P. 93–95.
123. Matiiv A. B., Trubitsina N. P., Matveenko A. G., Barbitoff Y. A., Zhouravleva G. A., Bondarev S. A. Amyloid and Amyloid-Like Aggregates: Diversity and the Term Crisis // *Biochemistry (Moscow)*. 2020. Sept. Vol. 85, no. 9. P. 1011–1034.
124. Matiiv A. B., Trubitsina N. P., Matveenko A. G., Barbitoff Y. A., Zhouravleva G. A., Bondarev S. A. Structure and Polymorphism of Amyloid and Amyloid-Like Aggregates // *Biochemistry (Moscow)*. 2022. Vol. 87, no. 5. P. 450–463.
125. Matveenko A. G., Drozdova P. B., Belousov M. V., Moskalenko S. E., Bondarev S. A., Barbitoff Y. A., Nizhnikov A. A., Zhouravleva G. A.

- SFPI*-mediated prion-dependent lethality is caused by increased Sup35 aggregation and alleviated by Sis1 // *Genes to Cells*. 2016. Vol. 21, no. 12. P. 1290–1308.
126. Matveenko A. G., Barbitoff Y. A., Jay-Garcia L. M., Chernoff Y. O., Zhouravleva G. A. Differential effects of chaperones on yeast prions: CURrent view // *Current Genetics*. 2018. Vol. 64, no. 2. P. 317–325.
127. Mayer M. P., Gierasch L. M. Recent advances in the structural and mechanistic aspects of Hsp70 molecular chaperones // *Journal of Biological Chemistry*. 2019. Vol. 294, no. 6. P. 2085–2097.
128. Merz P. A., Rohwer R. G., Kasczak R., Wisniewski H. M., Somerville R. A., Gibbs C. J. J., Gajdusek D. C. Infection-specific particle from the unconventional slow virus diseases. // *Science*. 1984. Vol. 225, no. 4660. P. 437–440.
129. Miller S. B., Ho C.-T., Winkler J., Khokhrina M., Neuner A., Mohamed M. Y. H., Guilbride D. L., Richter K., Lisby M., Schiebel E., Mogk A., Bukau B. Compartment-specific aggregates direct distinct nuclear and cytoplasmic aggregate deposition. // *EMBO Journal*. 2015a. Vol. 34, no. 6. P. 778–797.
130. Miller S. B., Mogk A., Bukau B. Spatially organized aggregation of misfolded proteins as cellular stress defense strategy // *Journal of Molecular Biology*. 2015b. Vol. 427, no. 7. P. 1564–1574.
131. Moehle C. M., Aynardi M. W., Kolodny M. R., Park F. J., Jones E. W. Protease B of *Saccharomyces cerevisiae*: Isolation and Regulation of the *PRB1* Structural Gene // *Genetics*. 1987. Feb. Vol. 115, no. 2. P. 255–263.
132. Morange M. What history tells us. II. The discovery of chaperone function // *Journal of Biosciences*. 2005. Vol. 30, no. 4. P. 461–464.
133. Moriyama H., Edskes H. K., Wickner R. B. [*URE3*] prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for chaperone Hsp104 and curing by overexpressed chaperone Ydj1p // *Molecular and cellular biology*. 2000. Vol. 20, no. 23. P. 8916–8922.

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

- ation of cytosolic proteins by sequestering the Sis1p chaperone // *Cell*. 2013. Vol. 154, no. 1. P. 134–145.
143. Park Y.-N., Zhao X., Yim Y.-I., Todor H., Ellerbrock R., Reidy M., Eisenberg E., Masison D. C., Greene L. E. Hsp104 Overexpression Cures *Saccharomyces cerevisiae* [*PSI*<sup>+</sup>] by Causing Dissolution of the Prion Seeds // *Eukaryotic Cell*. 2014. May. Vol. 13, no. 5. P. 635–647.
  144. Patino M. M., Liu J.-j., Glover J. R., Lindquist S. Support for the Prion Hypothesis for Inheritance of a Phenotypic Trait in Yeast // *Science*. 1996. Aug. Vol. 273, no. 5275. P. 622–626.
  145. Paushkin S. V., Kushnirov V. V., Smirnov V. N., Ter-Avanesyan M. D. Propagation of the yeast prion-like [*PSI*<sup>+</sup> determinant is mediated by oligomerization of the *SUP35*-encoded polypeptide chain release factor. // *EMBO Journal*. 1996. June. Vol. 15, no. 12. P. 3127–3134.
  146. Pelham H. R. B. Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock // *EMBO Journal*. 1984. Vol. 3, no. 13. P. 3095–3100.
  147. Powers E. T., Balch W. E. Diversity in the origins of proteostasis networks—a driver for protein function in evolution // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013. Vol. 14, no. 4. P. 237–248.
  148. Prusiner S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. // *Science*. 1982. Vol. 216, no. 4542. P. 136–144.
  149. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing / R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2014.
  150. Reidy M., Miot M., Masison D. C. Prokaryotic chaperones support yeast prions and thermotolerance and define disaggregation machinery interactions // *Genetics*. 2012. Vol. 192, no. 1. P. 185–193.
  151. Reidy M., Sharma R., Shastry S., Roberts B.-L., Albino-Flores I., Wickner S., Masison D. C. Hsp40s specify functions of Hsp104 and Hsp90 protein chaperone machines // *PLoS Genetics*. 2014. Vol. 10, no. 10. e1004720.
  152. Rohner N., Jarosz D. F., Kowalko J. E., Yoshizawa M., Jeffery W. R., Borowsky R. L., Lindquist S., Tabin C. J. Cryptic Variation in Morpho-



- logical Evolution: HSP90 as a Capacitor for Loss of Eyes in Cavefish // *Science*. 2013. Dec. Vol. 342, no. 6164. P. 1372–1375.
153. Rosenzweig R., Nillegoda N. B., Mayer M. P., Bukau B. The Hsp70 chaperone network // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019. Vol. 20, no. 11. P. 665–680.
154. Ross E. D., Minton A., Wickner R. B. Prion domains: sequences, structures and interactions. // *Nature Cell Biology*. 2005. Vol. 7, no. 11. P. 1039–1044.
155. Ryzhova T. A., Sopova J. V., Zadorsky S. P., Siniukova V. A., Sergeeva A. V., Galkina S. A., Nizhnikov A. A., Shenfeld A. A., Volkov K. V., Galkin A. P. Screening for amyloid proteins in the yeast proteome // *Current Genetics*. 2018. Apr. Vol. 64, no. 2. P. 469–478.
156. Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013. Vol. 14, no. 10. P. 630–642.
157. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Elsevier, 04/1989. P. 1626.
158. Sambrook J., Russell D. W. Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride // *Cold Spring Harbor Protocols*. 2006. Vol. 2006, no. 1. pdb.prot3932.
159. Savistchenko J., Krzewska J., Fay N., Melki R. Molecular chaperones and the assembly of the prion Ure2p in vitro // *Journal of Biological Chemistry*. 2008. Vol. 283, no. 23. P. 15732–15739.
160. Schuermann J. P., Jiang J., Cuellar J., Llorca O., Wang L., Gimenez L. E., Jin S., Taylor A. B., Demeler B., Morano K. A., Hart P. J., Valpuesta J. M., Lafer E. M., Sousa R. Structure of the Hsp110:Hsc70 Nucleotide Exchange Machine // *Molecular Cell*. 2008. Vol. 31, no. 2. P. 232–243.
161. Schumacher R. J., Hansen W. J., Freeman B. C., Alnemri E., Litwack G., Toft D. O. Cooperative action of Hsp70, Hsp90, and DnaJ proteins in protein renaturation // *Biochemistry*. 1996. Vol. 35, no. 47. P. 14889–14898.

162. Schwimmer C., Masison D. C. Antagonistic interactions between yeast [*PSI*<sup>+</sup>] and [*URE3*] prions and curing of [*URE3*] by Hsp70 protein chaperone Ssa1p but not by Ssa2p. // *Molecular and cellular biology*. 2002. Vol. 22, no. 11. P. 3590–3598.
163. Scior A., Buntru A., Arnsburg K., Ast A., Iburg M., Juenemann K., Pigazzini M. L., Mlody B., Puchkov D., Priller J., Wanker E. E., Prigione A., Kirstein J. Complete suppression of Htt fibrilization and disaggregation of Htt fibrils by a trimeric chaperone complex // *EMBO Journal*. 2018. Vol. 37, no. 2. P. 282–299.
164. Sergeeva A. V., Galkin A. P. Functional amyloids of eukaryotes: criteria, classification, and biological significance // *Current Genetics*. 2020. Vol. 66, no. 5. P. 849–866.
165. Sharma D., Masison D. C. Functionally redundant isoforms of a yeast Hsp70 chaperone subfamily have different antiprion effects // *Genetics*. 2008a. Vol. 179, no. 3. P. 1301–1311.
166. Sharma D., Masison D. C. Functionally redundant isoforms of a yeast Hsp70 chaperone subfamily have different antiprion effects // *Genetics*. 2008b. Vol. 179, no. 3. P. 1301–1311.
167. Sharma D., Martineau C. N., Le Dall M. T., Reidy M., Masison D. C., Kabani M. Function of SSA subfamily of Hsp70 within and across species varies widely in complementing *Saccharomyces cerevisiae* cell growth and prion propagation // *PLoS ONE*. 2009. Vol. 4, no. 8.
168. Shorter J., Lindquist S. Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers. // *Science (New York, N.Y.)* 2004. June. Vol. 304, no. 5678. P. 1793–1797.
169. Shorter J., Lindquist S. Destruction or potentiation of different prions catalyzed by similar Hsp104 remodeling activities // *Molecular Cell*. 2006. Vol. 23, no. 3. P. 425–438.
170. Shorter J., Lindquist S. Hsp104, Hsp70 and Hsp40 interplay regulates formation, growth and elimination of Sup35 prions // *EMBO Journal*. 2008. Vol. 27, no. 20. P. 2712–2724.

171. Shorter J., Southworth D. R. Spiraling in control: structures and mechanisms of the Hsp104 disaggregase // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2019. Aug. Vol. 11, no. 8. a034033.
172. Sikorski R. S., Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genetics*. 1989. Vol. 122, no. 1. P. 19–27.
173. Snider J., Thibault G., Houry W. A. The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins // *Genome Biology*. 2008. Vol. 9, no. 4. P. 1–8.
174. Son M., Wickner R. B. Antiprion systems in yeast cooperate to cure or prevent the generation of nearly all [*PSI*<sup>+</sup>] and [*URE3*] prions // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2022. July. Vol. 119, no. 28. P. 1–9.
175. Sondheimer N., Lindquist S. Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. // *Molecular cell*. 2000. Vol. 5, no. 1. P. 163–172.
176. Sondheimer N., Lopez N., Craig E. a., Lindquist S. The role of Sis1 in the maintenance of the [RNQ<sup>+</sup>] prion // *EMBO Journal*. 2001. Vol. 20, no. 10. P. 2435–2442.
177. Sopova J. V., Koshel E. I., Belashova T. A., Zadorsky S. P., Sergeeva A. V., Siniukova V. A., Shenfeld A. A., Velizhanina M. E., Volkov K. V., Nizhnikov A. A., Kachkin D. V., Gaginskaya E. R., Galkin A. P. RNA-binding protein FXR1 is presented in rat brain in amyloid form // *Scientific Reports*. 2019. Dec. Vol. 9, no. 1. P. 18983.
178. Specht S., Miller S. B. M., Mogk A., Bukau B. Hsp42 is required for sequestration of protein aggregates into deposition sites in *Saccharomyces cerevisiae* // *Journal of Cell Biology*. 2011. Vol. 195, no. 4. P. 617–629.
179. Stansfield I., Jones K. M., Kushnirov V. V., Dagkesamanskaya A. R., Poznyakovski A. I., Paushkin S. V., Nierras C. R., Cox B. S., Ter-Avanesyan M. D., Tuite M. F. The products of the *SUP45* (eRF1) and *SUP35* genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. // *EMBO Journal*. 1995. Sept. Vol. 14, no. 17. P. 4365–73.

180. Stein K. C., True H. L. Structural variants of yeast prions show conformer-specific requirements for chaperone activity // *Molecular Microbiology*. 2014. Vol. 93, no. 6. P. 1156–1171.
181. Studier F. W., Moffatt B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes // *Journal of Molecular Biology*. 1986. Vol. 189, no. 1. P. 113–130.
182. Sweeny E. A., Shorter J. Mechanistic and Structural Insights into the Prion-Disaggregase Activity of Hsp104 // *Journal of Molecular Biology*. 2016. Vol. 428, no. 9. P. 1870–1885.
183. Taipale M., Jarosz D. F., Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: Emerging mechanistic insights // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010. Vol. 11, no. 7. P. 515–528.
184. Tanaka M., Chien P., Naber N., Cooke R., Weissman J. S. Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences // *Nature*. 2004. Vol. 428, no. 6980. P. 323–328.
185. Ter-Avanesyan M. D., Kushnirov V. V., Dagkesamanskaya A. R., Didichenko S. A., Chernoff Y. O., Inge-Vechtomov S. G., Smirnov V. N. Deletion analysis of the SUP35 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two non-overlapping functional regions in the encoded protein // *Molecular Microbiology*. 1993. Mar. Vol. 7, no. 5. P. 683–692.
186. Ter-Avanesyan M. D., Dagkesamanskaya A. R., Kushnirov V. V., Smirnov V. N. The SUP35 omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [*psi*<sup>+</sup>] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genetics*. 1994. July. Vol. 137, no. 3. P. 671–676.
187. Tessarz P., Schwarz M., Mogk A., Bukau B. The yeast AAA+ chaperone Hsp104 is part of a network that links the actin cytoskeleton with the inheritance of damaged proteins // *Molecular and Cellular Biology*. 2009. July. Vol. 29, no. 13. P. 3738–3745.
188. Tipton K. a., Verges K. J., Weissman J. S. In Vivo Monitoring of the Prion Replication Cycle Reveals a Critical Role for Sis1 in Delivering Substrates to Hsp104 // *Molecular Cell*. 2008. Vol. 32, no. 4. P. 584–591.

189. Troisi E. M., Rockman M. E., Nguyen P. P., Oliver E. E., Hines J. K. Swa2, the yeast homolog of mammalian auxilin, is specifically required for the propagation of the prion variant [*URE3-I*] // *Molecular Microbiology*. 2015. Vol. 97, no. 5. P. 926–941.
190. Tsai J., Douglas M. G. A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding // *Journal of Biological Chemistry*. 1996. Vol. 271, no. 16. P. 9347–9354.
191. Uversky V. N. Mysterious oligomerization of the amyloidogenic proteins // *FEBS Journal*. 2010. Vol. 277, no. 14. P. 2940–2953.
192. Walsh P., Bursać D., Law Y. C., Cyr D., Lithgow T. The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. // *EMBO reports*. 2004. Vol. 5, no. 6. P. 567–571.
193. Wang J., Song J. J., Franklin M. C., Kamtekar S., Im Y. J., Rho S. H., Seong I. S., Lee C. S., Chung C. H., Eom S. H. Crystal structures of the HslVU peptidase-ATPase complex reveal an ATP-dependent proteolysis mechanism // *Structure*. 2001. Vol. 9, no. 2. P. 177–184.
194. Wegrzyn R. D., Bapat K., Newnam G. P., Zink a. D., Chernoff Y. O. Mechanism of prion loss after Hsp104 inactivation in yeast. // *Molecular and cellular biology*. 2001. Vol. 21, no. 14. P. 4656–4669.
195. Wentink A. S., Nillegoda N. B., Feufel J., Ubartaitė G., Schneider C. P., De Los Rios P., Hennig J., Barducci A., Bukau B. Molecular dissection of amyloid disaggregation by human HSP70 // *Nature*. 2020. Nov. Vol. 587, no. 7834. P. 483–488.
196. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016. P. 260.
197. Wickner R. B. [*URE3*] as an altered *URE2* protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Science*. 1994. Vol. 264, no. 5158. P. 566–569.

198. Wickner R. B. Discovering protein-based inheritance through yeast genetics. // *Journal of Biological Chemistry*. 2012. Vol. 287, no. 18. P. 14432–14442.
199. Wickner R. B., Edskes H. K., Bateman D. a., Kelly A. C., Gorkovskiy A., Dayani Y., Zhou A. Amyloids and yeast prion biology // *Biochemistry*. 2013. Vol. 52, no. 9. P. 1514–1527.
200. Wickner R. B., Bezsonov E., Bateman D. a. Normal levels of the antiprion proteins Btn2 and Cur1 cure most newly formed [*URE3*] prion variants. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014. Vol. 111, no. 26. E2711–20.
201. Winkler J., Tyedmers J., Bukau B., Mogk A. Chaperone networks in protein disaggregation and prion propagation // *Journal of Structural Biology*. 2012a. Vol. 179, no. 2. P. 152–160.
202. Winkler J., Tyedmers J., Bukau B., Mogk A. Hsp70 targets Hsp100 chaperones to substrates for protein disaggregation and prion fragmentation // *Journal of Cell Biology*. 2012b. Vol. 198, no. 3. P. 387–404.
203. Yu C.-i., King C.-y. Forms and abundance of chaperone proteins influence yeast prion variant competition // *Molecular Microbiology*. 2019. Mar. Vol. 111, no. 3. P. 798–810.
204. Zaarur N., Xu X., Lestienne P., Meriin A. B., McComb M., Costello C. E., Newnam G. P., Ganti R., Romanova N. V., Shanmugasundaram M., Bandejas T. M., Matias P. M., Lobachev K. S., Lednev I. K., Chernoff Y. O., Sherman M. Y. RuvbL 1 and RuvbL 2 enhance aggresome formation and disaggregate amyloid fibrils // *EMBO Journal*. 2015. Vol. 34, no. 18. P. 2363–2382.
205. Zhang T., Lei J., Yang H., Xu K., Wang R., Zhang Z. An improved method for whole protein extraction from yeast *Saccharomyces cerevisiae* Tingting // *Yeast* (Chichester, England). 2011. Vol. 28, no. 11. P. 795–798.
206. Zhao X., Rodriguez R., Silberman R. E., Ahearn J. M., Saidha S., Cummins K. C., Eisenberg E., Greene L. E. Heat shock protein 104 (Hsp104)-mediated curing of [*PSI*<sup>+</sup>] yeast prions depends on both [*PSI*<sup>+</sup>] conforma-

- tion and the properties of the Hsp104 homologs // *Journal of Biological Chemistry*. 2017. Vol. 292, no. 21. P. 8630–8641.
207. Zhao X., Lanz J., Steinberg D., Pease T., Ahearn J. M., Bezsonov E. E., Staguhn E. D., Eisenberg E., Masison D. C., Greene L. E. Real-time imaging of yeast cells reveals several distinct mechanisms of curing of the [URE3] prion // *Journal of Biological Chemistry*. 2018. Vol. 293, no. 9. P. 3104–3117.
208. Zhouravleva G., Frolova L., Le Goff X., Le Guellec R., Inge-Vechtomov S., Kisselev L., Philippe M. Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. // *EMBO Journal*. 1995. Aug. Vol. 14, no. 16. P. 4065–72.
209. Zhu X., Zhao X., Burkholder W. F., Gragerov A., Ogata C. M., Gottesman M. E., Hendrickson W. A. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK // *Science*. 1996. Vol. 272, no. 5268. P. 1606–1614.

### **Acknowledgements**

I would like to express my gratitude for the invaluable role of my family and the entire staff of the Laboratory of Physiological Genetics of the Department of Genetics and Biotechnology, SPbSU, in preparing this work. I would especially like to thank:

- Galina Anatolyevna Zhouravleva and Andrew Georgievich Matveenko for their management of the work, assistance in the interpretation and critical evaluation of the research results;
- Stanislav Aleksandrovich Bondarev for his invaluable contribution to mastering methods and conducting a number of experiments;
- Kulikova Alexandra Vladimirovna and Beliavskaia Julianna Igorevna for their help in conducting the experiments;
- Chernoff Yury Olegovich and Reed B. Wickner for constructive criticism of the results and valuable comments.

I would like to express special thanks to Evgeniia Mikhailovna Maksiutenko for her invaluable support and help in and out of the work.