

УДК 577.11, 577.22

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ РЕГУЛЯТОР Gln3 *Saccharomyces cerevisiae* ДЕМОНСТРИРУЕТ ПРИОНОПОДОБНЫЕ СВОЙСТВА ПРИ СВЕРХПРОДУКЦИИ

© 2019 К.С. Антонец^{1,2}, М.В. Белоусов^{1,2}, М.Е. Белоусова²,
А.А. Нижников^{1,2*}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Санкт-Петербург,
Россия; электронная почта: ant.nizhnikov@gmail.com

² Всероссийский Научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии, 196608 Пушкин, Россия

Поступила в редакцию 09.06.2018

После доработки 24.11.2018

Принята к публикации 24.11.2018

Прионами называют белки, способные в одних и тех же условиях существовать в двух и более конформациях, как минимум одна из которых обладает инфекционными свойствами. Обычно формирование такой инфекционной прионной конформации сопряжено с образованием амилоидов, то есть белковых агрегатов с особой пространственной структурой. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к настоящему времени идентифицировано около десяти прионов. Одним из ключевых регуляторов метаболизма азота у *S. cerevisiae* является Gln3, который имеет амилоидогенный участок, обладающий прионоподобными свойствами. Способность к прионизации полноразмерного Gln3 ранее не изучалась. В настоящем исследовании установлено, что амилоидогенный участок Gln3 в присутствии приона [*PIN*⁺] способен выступать в качестве матрицы, инициирующей агрегацию полноразмерного Gln3 при совместной сверхпродукции. Показано, что агрегированное состояние полноразмерного Gln3 проявляет прионоподобные свойства, включающие инфекционность и зависимость от антиприонных агентов, однако в отличие от известных прионов дрожжей, поддерживается только при сверхпродукции. Мы предлагаем термин «условные прионы» для таких белков, поддержание прионного состояния которых возможно лишь в условиях, не соответствующих физиологическим.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: прион, Gln3, амилоид, [*PIN*⁺], инфекционность, дрожжи, *S. cerevisiae*.

DOI: 10.1134/S0320972519040122

Большинство известных прионов представляет собой инфекционные агрегаты определенных белков [1], однако известны и прионы, не связанные с агрегацией [2]. Первый из идентифицированных прионов, PrP^{Sc} (prion от proteinaceous и infectious), представляет собой летальный патоген, вызывающий инфекционные нейродегенеративные заболевания человека и животных [3, 4]. Наибольшее число прионов (~10) идентифицировано у дрожжей *Saccharomyces*

cerevisiae [1, 5–10]. Многие из них являются ДНК- или РНК-связывающими белками, имеющими участки, обогащенные глутамином (Q) и/или аспарагином (N), которые склонны к агрегации и играют важную роль в образовании прионов [11–13]. Агрегаты некоторых из этих белков обладают свойствами амилоидов, то есть белковых фибрилл с особой пространственной структурой [14, 15].

Возникновение прионных агрегатов в дрожжевой клетке вызывает автокаталитическую конверсию мономеров соответствующего белка в агрегированное состояние, сопровождающуюся раундами репликации инфекционных агрегатов [16, 17]. Этот процесс находится под контролем системы белков-шаперонов, которые «разрезают» прионные агрегаты на относительно небольшие олигомеры, что обеспечивает их эффективную передачу в дочерние клетки и стабильное наследование прионов в митозе и мейозе [18]. Дрожжевые прионы обладают свойствами, отличающими их от других нехромосомных

Принятые сокращения: ГГХ – гуанидин-гидрохлорид (хлорид гуанидина); ПЦР – полимеразная цепная реакция; ФОК – 5-фтороротовая кислота; CFP – Cyan Fluorescent Protein, циановый флуоресцентный белок; DAPI – 4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole, 4,6-диамидино-2-фенилиндол, флуоресцентный краситель, специфичный к АТ-богатым участкам ДНК; Gln3QN – аспарагин-глутамин-обогащенный фрагмент белка Gln3 со 166 по 242 аминокислоту; [*PIN*⁺] – прионная изоформа белка Rnq1; PMSF – PhenylMethylSulfonyl Fluoride, фенилметилсульфонил фторид; YFP – Yellow Fluorescent Protein, желтый флуоресцентный белок.

* Адресат для корреспонденции.

детерминантов: 1) индукция при сверхпродукции структурного белка (увеличение числа молекул белка повышает вероятность его перехода в прионную конформацию), 2) обратимость изгнания (прион может быть элиминирован под действием агентов, блокирующих шапероны, например, хлорида гуанидина, и вновь индуцирован *de novo*) [19] и 3) инфекционность (прионная конформация является инфекционной и доминантной), которая может быть проанализирована либо при помощи классической цитодукции [20, 21], либо путем белковой трансформации [22].

Белок Gln3 является транскрипционным регулятором катаболизма азота [23, 24], влияет на эффективность терминации трансляции [25–27] и имеет QN-обогащенный амилоидогенный участок (Gln3QN) 166–242 а.о., формирующий при сверхпродукции агрегаты, обладающие прионоподобными свойствами [1]. Ранее мы показали, что агрегация, наблюдаемая при сверхпродукции этого QN-обогащенного фрагмента, зависит от присутствия в клетке дрожжевых прионов, в то время как полноразмерный Gln3 при сверхпродукции не агрегирует [28].

В настоящем исследовании установлено, что совместная сверхпродукция с собственным QN-обогащенным фрагментом на фоне приона [*PIN*⁺] вызывает агрегацию полноразмерного Gln3. Агрегированное состояние полноразмерного Gln3 наследуется в ряду клеточных поколений, обладает инфекционностью и зависит от хлорида гуанидина и Hsp104, то есть имеет свойства дрожжевого приона. Вместе с тем, это агрегированное состояние Gln3 поддерживается только при сверхпродукции, что отличает его от других прионов дрожжей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы микроорганизмов, среды и условия культивирования. В работе применяли стандартные методы генетики дрожжей *S. cerevisiae* [29, 30]. Дрожжи культивировали при 30 °С на твердой или жидкой средах, полной YAPD и селективной MD [29, 30]. Использовали изогенные штаммы дрожжей 1-OT56 с генотипом *MATa ade1-14_{UGA} his3 leu2 trp1-289_{UAG} ura3 [psi⁻][PIN⁺]* и 2-OT56 с генотипом *MATa ade1-14_{UGA} his3 leu2 trp1-289_{UAG} ura3 [psi⁻][pin⁻]*, отличающиеся лишь статусом дрожжевого приона [*PIN*⁺] [28]. Делецию гена *HSP104* в штамме 25-1-OT56 [*GLN3*[↑]] получали при помощи метода ПЦР-опосредованной замены последовательности *HSP104* на кассету KanMX4, определяющую устойчивость дрожжей к антибиотику генетицину, G418

(«Sigma», США). Подбор праймеров проводили при помощи программного обеспечения SnapGene («SnapGene», США). Все использованные в работе праймеры («Beagle», Россия) приведены в табл. 1. Для двустадийной амплификации KanMX4, фланкированной участками *HSP104*, использовали пары праймеров FHSP104delta-KanMX и RHSP104deltaKanMX, FHSP104delta и RHSP104delta; проверку делеции *HSP104* производили с помощью праймеров FHSP104dch и RHSP104dch соответственно.

Для индукции экспрессии генов, находящихся под контролем промотора *CUP1*, в твердые и жидкие среды добавляли 150 и 100 мкМ сульфата меди II (CuSO₄) соответственно. Анализ зависимости агрегации белков от универсального антиприонного агента хлорида гуанидина (ГГХ) проводили после 3× (каждые 24 ч) пассирования дрожжей на полной среде с добавлением 5 мМ ГГХ («Sigma», США) [31].

Зависимость роста дрожжей от антибиотика рапамицина анализировали путем последовательного двукратного переноса дрожжей методом отпечатка с селективной среды на селективную среду с добавлением 5 нг/мл рапамицина («Sigma», США) с длительностью пассажа между переносом в 48 ч. Потерю плазмид, несущих ген *URA3*, проводили на селективной среде с добавлением 1 г/л 5-фтороротовой кислоты (ФОК). Выросшие колонии рассеивали истошающим штрихом и дополнительно проверяли на потерю плазмиды, несущей ген *URA3*, путем переноса методом отпечатка на селективную среду без урацила.

Плазмиды. Плазмиды, использованные в работе, перечислены в табл. 2. Плазмиды pL-CUP1-GLN3-YFP получена путем встраивания амплифицированной при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) последовательности гена *GLN3* (праймеры GLN3HindIII F и GLN3YFPBamHI R; матрица – плазмидная ДНК pU-CUP1-GLN3-YFP [28]) в плазмиду pL-CUP1-GLN3QN-YFP [28] по сайтам рестрикции *HindIII* и *BamHI*.

Для получения плазмиды pL-CUP1-GLN3 последовательность гена *GLN3*, амплифицированного при помощи ПЦР (праймеры GLN3HindIII F и GLN3SacI R; матрица – плазмидная ДНК pU-CUP1-GLN3-YFP [28]), была встроена в плазмиду pL-CUP1-GLN3-YFP по сайтам рестрикции *HindIII* и *SacI*.

Плазмиды pL-CUP1-GLN3QN-CFP сконструированы путем встраивания последовательности, кодирующей циановый флуоресцентный белок (CFP), амплифицированной при помощи ПЦР (праймеры FGFPBamHI и RGFPSacI; плазмиды pGPD-CFP(LEU2) [32] в качестве матрицы) в плазмиду pL-CUP1-GLN3QN-YFP [28] по сайтам рестрикции *BamHI* и *SacI*.

Таблица 1. Праймеры

Название	Последовательность 5'–3'
GLN3HindIII	TAATAAGCTTATGCAAGACGACCCCGAA
GLN3YFPBamHIR	AGTAGGATCCTATACCAAATTTTAACCAATCCAAT
GLN3SacIR	AGTAGAGCTCTCATATACCAAATTTTAACCAATCCAAT
FGFPBamH1	CGTGGATCCATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTC
RGFPSacI	CTAGAGCTCTCATTTGTATAGTTTCATCCATGC
FHSP104delta	ATGAACGACCAAACGCAATTTACAGAAAGGGCTCTAACGATTTTGACGT
FHSP104deltaKanMX	GGCTCTAACGATTTTGACGTCGTACGCTGCAGGTCGAC
RHSP104delta	AATCTAGGTCATCATCAATTTCCATACTGTCCTCATTATCGTCATCACC
RHSP104deltaKanMX	TCCTCATTATCGTCATCACCATCGATGAATTCGAGCTCG
FHSP104dch	CTTTGTCCAGAGGCCAATTG
RHSP104dch	ACGTCTCTCTCCTCAGCAA

Таблица 2. Плазмиды

Название	Тип*	Промотор	Ген	Маркер	Ссылка
pL-CUP1-GLN3-YFP	<i>cen</i>	<i>CUP1</i>	<i>GLN3-YFP</i>	<i>LEU2</i>	Получена в настоящей работе
pU-CUP1-GLN3-YFP	<i>cen</i>	<i>CUP1</i>	<i>GLN3-YFP</i>	<i>URA3</i>	[28]
pL-CUP1-GLN3	<i>cen</i>	<i>CUP1</i>	<i>GLN3</i>	<i>LEU2</i>	Получена в настоящей работе
pU-CUP1-GLN3	<i>cen</i>	<i>CUP1</i>	<i>GLN3</i>	<i>URA3</i>	[28]
pL-CUP1-GLN3QN-YFP	<i>cen</i>	<i>CUP1</i>	<i>GLN3QN-YFP</i>	<i>LEU2</i>	[28]
pU-CUP1-GLN3QN-YFP	<i>cen</i>	<i>CUP1</i>	<i>GLN3QN-YFP</i>	<i>URA3</i>	[28]
pL-CUP1-GLN3QN-CFP	<i>cen</i>	<i>CUP1</i>	<i>GLN3QN-YFP</i>	<i>LEU2</i>	Получена в настоящей работе
pU-CUP1-YFP	<i>cen</i>	<i>CUP1</i>	<i>YFP</i>	<i>URA3</i>	[28]
pL-CUP1-YFP	<i>cen</i>	<i>CUP1</i>	<i>YFP</i>	<i>LEU2</i>	[28]
pGPD-CFP(Leu)	<i>2μ</i>	<i>GPD</i>	<i>CFP</i>	<i>LEU2</i>	[32]
pRS316	<i>cen</i>	–	–	<i>URA3</i>	[51]
pRS315	<i>cen</i>	–	–	<i>LEU2</i>	[51]
pLH105	<i>2μ</i>	<i>GPD</i>	<i>HSP104</i>	<i>LEU2</i>	[52]

* *cen* – центромерная плаزمида, *2μ* – многокопийная плазмида.

Методы работы с белками. Для анализа агрегации белков использовали метод седиментационного анализа [33]. При выделении суммарного белка использовали ингибиторы протеаз Complete («Roche», Швейцария) (1 таблетка на 50 мл раствора) и фенилметилсульфонил фторида, PMSF («Sigma», США) в концентрации 5 мМ. Седиментационный анализ проводили с помощью ультрацентрифугирования проб суммарного белка при 50 000 g в роторе MLA-130 на ультрацентрифуге BC Optima MAX-XP («Beckman Coulter», США) через подушку из 20%-ной сахарозы в течение 25 мин при 4 °С, после чего отбирали надосадочную фракцию, а к осадочной добавляли равный объем однократного фосфат-

ного буфера, pH 7,4 («Thermo Fisher Scientific», США) с ингибиторами протеаз Complete (1 таблетка на 50 мл раствора) и 5 мМ PMSF. Для анализа устойчивости белка к обработке ионными детергентами к пробам суммарного белка перед ультрацентрифугированием добавляли лаурилсаркозинат натрия («Хеликон», Россия) до 3% (v/v), после чего пробы инкубировали в течение 5 мин. Все действия с белком проводили при 4 °С.

Для переноса применяли мембрану PVDF Hybond-P, размер пор 0,45 мкм («Amersham», США). В ходе детекции сигналов белков, слитых с YFP (желтый флуоресцентный белок), применяли моноклональные антитела кролика против GFP, Anti-GFP antibody [E385], ab32146

(«Abcam», Великобритания), а также набор для детекции Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent («Amersham», США).

Белковую трансформацию проводили согласно ранее опубликованному протоколу [34], с адаптациями. Для трансформации использовали суммарные белковые лизаты, выделенные непосредственно перед трансформацией из дрожжевых сферопластов с добавлением ингибитора протеаз Complete (1 таблетка на 50 мл раствора) и 1 мМ PMSF, соничированные на льду ультразвуком («Bandelin Sonopuls», Германия), 5 циклов по 0,9 с при 20% мощности.

Микроскопия. Для исследования способности белков, слитых с CFP и YFP, формировать агрегаты, а также их колокализации, использовали лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Leica TCS SP5 («Leica Microsystems», Германия). При анализе слитых с CFP белков применяли аргоновый лазер (детекция сигнала при 461–510 нм), слитых с YFP, – 514 нм аргоновый лазер (518–580 нм соответственно) и для ДНК-специфичного красителя DAPI – 405 нм аргоновый лазер ультрафиолетового диапазона (425–475 нм). Для окрашивания клеток дрожжей применяли флуоресцентный краситель, специфичный к АТ-богатым участкам ДНК (DAPI), используя коммерческий набор «Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI» (1,5 мкг/мл DAPI), по протоколу производителя («Vector Laboratories», США). Для индукции агрегации белков перед микроскопией дрожжевые культуры выращивали в течение 48 ч при 30 °С на селективных средах с добавлением 150 мкМ CuSO₄.

Статистический анализ. Для обработки результатов сравнительного анализа выборки использовали непараметрический критерий Манна–Уитни и программное обеспечение R («R Foundation», США). При исследовании частот образования агрегатов при помощи микроскопии анализировали по пять случайных полей зрения для пяти независимо полученных трансформантов. Для каждого поля зрения определяли долю клеток с агрегатами. Достоверность наблюдаемых отличий проверяли критерием Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Агрегация полноразмерного Gln3, слитого с YFP, индуцируется при его совместной сверхпродукции с QN-обогащенным фрагментом (Gln3QN), слитым с CFP. Известно, что сверхпродукция QN-обогащенного фрагмента Gln3, слитого с желтым флуоресцентным белком YFP (Gln3QN-YFP), приводит к формированию агрегатов в

цитоплазме дрожжевых клеток (рис. 1, а), в то время как сверхпродукция полноразмерного Gln3, слитого с YFP (Gln3-YFP), не вызывает агрегацию, и белок Gln3-YFP проявляет ядерную локализацию (рис. 1, б) [28]. Также ранее мы установили, что агрегация Gln3QN-YFP значительно усиливается в случае присутствия в клетке дрожжевого приона [*PIN*⁺] [28], олигомеры которого, согласно современным представлениям, действуют в качестве «конформационной матрицы» для сборки агрегатов других белков [35].

Поскольку полноразмерный Gln3-YFP не агрегирует при сверхпродукции в штамме 1-OT56 [*PIN*⁺] (рис. 1, б), можно было бы заключить, что этот белок не способен к агрегации *in vivo*. Однако мы предположили, что агрегаты QN-обогащенного фрагмента Gln3 могли бы служить в качестве своеобразного «фактора [*PIN*]», индуцирующего агрегацию полноразмерного Gln3. Для проверки этого предположения мы ко-трансформировали штамм 1-OT56 [*PIN*⁺] плазмидами pL-CUP1-GLN3QN-CFP и pU-CUP1-GLN3-YFP, кодирующими белки Gln3QN-CFP и Gln3-YFP соответственно. Трансформанты были отобраны на селективной среде без лейцина и урацила и помещены на селективную среду без лейцина и урацила с добавлением 150 мкМ сульфата меди для индукции агрегации белков. Индукцию проводили путем двух последовательных пассирований по 48 ч при 30 °С. Всего провели три эксперимента, в которых при помощи микроскопии исследовали агрегацию Gln3-YFP у 115, 78 и 205 клонов соответственно. В результате в первом и третьем экспериментах были выявлены 1 и 2 клона соответственно, в которых были обнаружены агрегаты Gln3-YFP. Эти агрегаты демонстрировали полную колокализацию с агрегатами Gln3QN-CFP (рис. 1, в).

Для того, чтобы выяснить, поддерживается ли агрегированное состояние Gln3-YFP в отсутствие агрегатов Gln3QN-CFP, мы провели потерю плазмиды pL-CUP1-GLN3QN-CFP в клонах, где наблюдалась агрегация Gln3-YFP. При последующем микроскопировании было установлено, что у 25 из 49, 21 из 50 и 11 из 32 потомков трех исходно полученных клонов агрегация Gln3-YFP сохранилась на среде, содержащей 150 мкМ CuSO₄, уже после потери плазмиды для сверхпродукции Gln3QN-CFP. Агрегаты Gln3-YFP в этих клонах располагались в цитоплазме (рис. 1, г, отмечено в одной из клеток белой стрелкой), однако часть Gln3-YFP находилась в ядре в диффузном состоянии (рис. 1, г, отмечено черной стрелкой). Таким образом, нам удалось индуцировать агрегированное состояние Gln3-YFP, наследуемое в ряду клеточных поко-

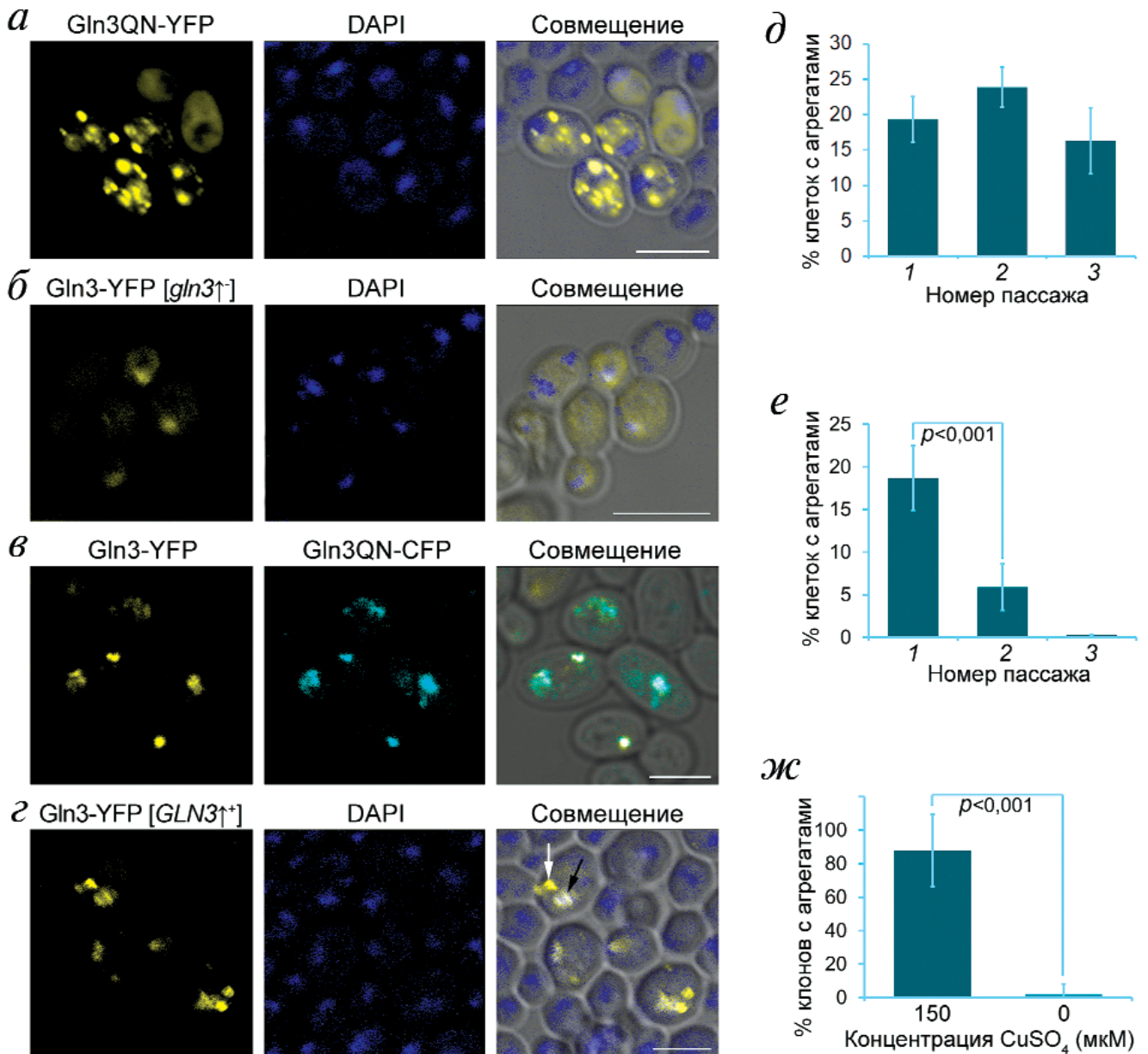


Рис. 1. Агрегация Gln3-YFP индуцируется при совместной сверхпродукции с Gln3QN-CFP на фоне приона [*PIN*⁺]. *а* – Сверхпродукция Gln3QN-YFP на фоне приона [*PIN*⁺] приводит к возникновению агрегатов, не колокализующихся с ядром. *б* – Сверхпродукция полноразмерного Gln3-YFP не вызывает его агрегацию, причем белок локализуется преимущественно в ядре. *в* – Совместная сверхпродукция Gln3-YFP и Gln3QN-CFP на фоне приона [*PIN*⁺] приводит к агрегации Gln3-YFP. *г* – Агрегация Gln3-YFP сохраняется после прекращения сверхпродукции Gln3QN-CFP. Черной стрелкой для примера отмечена колокализация растворимого Gln3-YFP с ядром, белой стрелкой отмечен агрегат Gln3-YFP в цитоплазме. На панелях (*а–г*) показаны каналы флуоресценции соответствующих белков и специфичного к ДНК красителя DAPI. «Совмещение» – изображение, получаемое при наложении обоих каналов флуоресценции на канал фазового контраста. Масштабная линейка соответствует 5 мкм. *д* – Агрегация Gln3-YFP стабильно наследуется в ряду клеточных поколений при сверхпродукции. Отмечены номера пассажей; каждый пассаж длительностью 24 ч при 30 °С. *е* – Прекращение сверхпродукции Gln3-YFP вызывает потерю его агрегации, которая не восстанавливается при повторной сверхпродукции. Показаны проценты клеток с агрегатами после соответствующего числа пассажей на среде без CuSO₄ длительностью 24 ч при 30 °С. *ж* – Белок Gln3 обеспечивает поддержание агрегированного состояния [*GLN3*[↑]] при сверхпродукции. Показан процент клонов, сохранивших [*GLN3*[↑]] при замене Gln3-YFP на Gln3 и пассивировании на селективных средах с добавлением 150 или 0 мкМ CuSO₄. На гистограммах (*е–ж*) отмечены планки погрешностей, соответствующие стандартным отклонениям, а также указаны уровни значимости. Агрегацию во всех случаях анализировали через 48 ч после переноса клеток на соответствующую индукционную среду с добавлением 150 мкМ CuSO₄. С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

лений. Далее клоны, у которых была индуцирована и сохранилась агрегация Gln3-YFP при сверхпродукции, мы обозначали [*GLN3*^{↑+}] (знак «↑» обозначает, что агрегированное состояние наблюдается при сверхпродукции), а исходные клоны, в которых Gln3-YFP при сверхпродукции находится в ядре в мономерном состоянии, — [*gln3*^{↑-}].

Агрегированное состояние Gln3 поддерживается только при его сверхпродукции. Далее мы проанализировали насколько стабильна агрегация Gln3, и поддерживается ли она в нативных условиях без сверхпродукции. Для оценки стабильности мы пассировали клоны [*GLN3*^{↑+}], сверхпродуцирующие Gln3-YFP, на селективной среде без урацила, содержащей 150 мкМ CuSO₄, в течение 7 суток, каждые 24 ч пересевая клоны на свежую среду. Результаты эксперимента показали, что состояние [*GLN3*^{↑+}] при сверхпродукции является весьма стабильным: разница в доле клеток с агрегатами после 7 пассажей и до пассирования была статистически незначительной ($p > 0,05$) (рис. 1, д).

Снижение уровня продукции Gln3-YFP при инкубации клеток на среде без добавления сульфата меди привело к полной утрате агрегации уже через 3 пассажа длительностью по 24 ч (всего ~30 поколений). Для анализа агрегации клоны после пассирования на среде без CuSO₄ помещали вновь на среду, содержащую 150 мкМ CuSO₄, и через 48 ч анализировали агрегацию Gln3-YFP при помощи конфокальной микроскопии (рис. 1, е). Таким образом, агрегированное состояние Gln3-YFP поддерживается только при его сверхпродукции.

На следующем этапе работы мы исследовали, сохраняется ли агрегация при замене конструкции, сверхпродуцирующей Gln3-YFP, на плазмиду для сверхпродукции Gln3. Для этого штамм [*GLN3*^{↑+}], несущий плазмиду pU-CUP1-GLN3-YFP, был трансформирован плазмидой pL-CUP1-GLN3; трансформанты были отобраны на селективной среде без лейцина, содержащей 150 мкМ CuSO₄. Далее была проведена потеря плазмиды pU-CUP1-GLN3-YFP на среде с ФОК. Полученные клоны после дополнительной проверки на предмет потери плазмиды pU-CUP1-GLN3-YFP пассировали в течение 5 суток с длительностью каждого пассажа в 24 ч на селективных средах без лейцина, содержащих 150 мкМ CuSO₄, и без добавления сульфата меди. Далее клоны рассеивали истощающим штрихом, и по десять индивидуальных колоний, полученных для каждого из пяти исходных клонов, использованных для анализа, вновь трансформировали плазмидой pU-CUP1-GLN3-YFP. Трансформанты выращивали в течение 48 ч на

селективной среде без урацила, содержащей 150 мкМ CuSO₄, и анализировали агрегацию Gln3-YFP при помощи микроскопии.

Полученные данные показали (рис. 1, ж), что агрегация Gln3-YFP сохранилась у 88% (44 из 50) потомков клонов, в которых происходила сверхпродукция Gln3 на среде, содержащей 150 мкМ CuSO₄, в то время как среди потомков клонов, которые выращивали на среде без добавления сульфата меди, был найден лишь один клон с агрегацией Gln3-YFP. Таким образом, агрегированное состояние [*GLN3*^{↑+}] поддерживается при сверхпродукции как Gln3-YFP, так и нативного Gln3, однако снижение уровня продукции этих белков вызывает элиминацию [*GLN3*^{↑+}].

Агрегированное состояние Gln3-YFP зависит от антиприонного агента хлорида гуанидина и передается при белковой трансформации. Поскольку мы получили два стабильно поддерживаемых при сверхпродукции в ряду клеточных поколений состояния Gln3: агрегированное [*GLN3*^{↑+}] и не агрегированное [*gln3*^{↑-}], — мы предположили, что [*GLN3*^{↑+}] мог бы обладать прионными свойствами.

Мы проанализировали зависимость [*GLN3*^{↑+}] от универсального антиприонного агента хлорида гуанидина. Для этого штамм [*GLN3*^{↑+}] три раза пассировали на селективной среде, содержащей 150 мкМ CuSO₄, и 5 мМ хлорида гуанидина с длительностью каждого пассажа 24 ч. В качестве контроля [*GLN3*^{↑+}] пассировали на аналогичной среде без хлорида гуанидина. Полученные данные показали, что пассирование на среде с хлоридом гуанидина приводит к снижению доли клеток с агрегатами Gln3-YFP ~10×, в то время как в контрольном штамме [*GLN3*^{↑+}], который пассировали на среде без хлорида гуанидина, агрегация сохраняется на прежнем уровне (рис. 2, а).

Действие хлорида гуанидина на прионы дрожжей связано, в том числе, с тем, что это вещество инактивирует АТФ-азную активность шаперона Hsp104, фрагментирующего агрегаты дрожжевых прионов и обеспечивающего их эффективную передачу в дочерние клетки [36]. Делеция гена, кодирующего Hsp104, обычно приводит к потере большинства известных дрожжевых прионов, в то время как сверхпродукция Hsp104 действует только на некоторые из них [16].

Мы проанализировали эффекты делеции и сверхпродукции Hsp104 на [*GLN3*^{↑+}]. Делеция *HSP104* была введена в штамм 25-1-OT56 [*GLN3*^{↑+}] путем ПЦР-опосредованного замещения *HSP104* на кассету KanMX4. Для сверхпродукции Hsp104 штамм 25-1-OT56 [*GLN3*^{↑+}] был трансформирован плазмидой pLH-105, обеспечивающей сверхпродукцию Hsp104. Полученные клоны троекратно пассировали на соответствующих селективных средах, содержащих 150 мкМ CuSO₄, с дли-

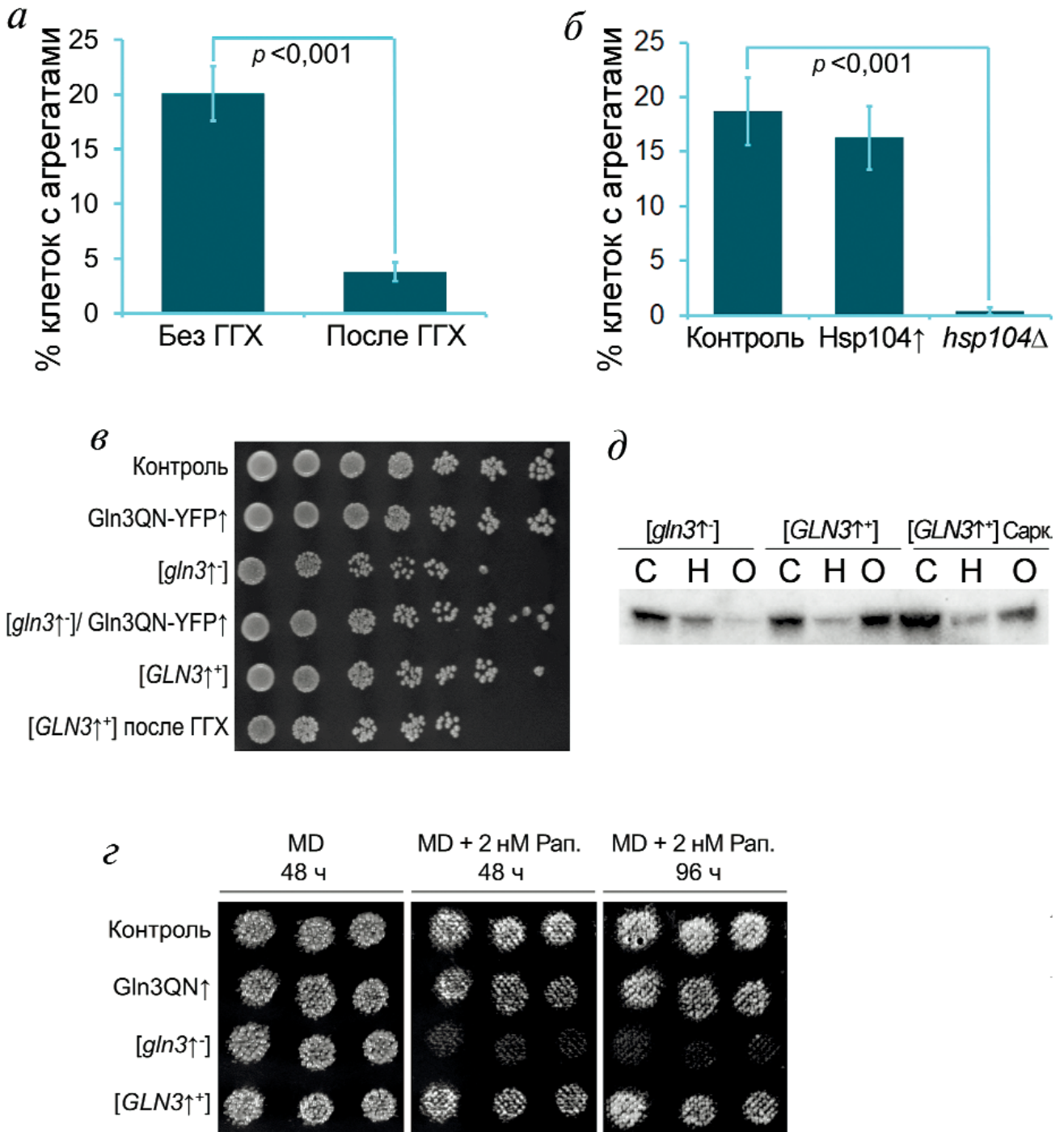


Рис. 2. [GLN3^{↑+}] обладает свойствами приона. *а* – Зависимость [GLN3^{↑+}] от хлорида гуанидина. Показаны проценты клеток с агрегатами Gln3-YFP после пассирования на средах с 5 мМ хлоридом гуанидина и без. *б* – [GLN3^{↑+}] зависит от шаперона Hsp104. Показаны эффекты сверхпродукции Hsp104 (Hsp104[↑]) и делеции HSP104 (hsp104Δ). Планки погрешностей на панелях (*а–б*) соответствуют стандартным отклонениям. Показаны уровни значимости. *в* – Сравнение эффективности вегетативного роста штаммов, отличающихся по агрегации Gln3-YFP при помощи теста на разведение. [GLN3^{↑+}] после ГГХ – штамм после трехкратного пассирования на среде с 5 мМ хлоридом гуанидина. *з* – Влияние рапамицина на рост штаммов [GLN3^{↑+}] и [gln3^{↑-}]. Показан рост клеток, перенесенных методом отпечатков на селективных средах с добавлением 5 нг/мл рапамицина и без через соответствующее время инкубации при 30 °С. *д* – Агрегированное состояние Gln3-YFP детектируется при помощи седиментационного анализа и обладает устойчивостью к лаурил-саркозинату натрия. Представлены результаты вестерн-блот гибридации с антителами против GFP. «С» – суммарный белок, «Н» – надосадочная фракция, «О» – осадочная, «Сарк.» – пробы обработаны 3% лаурил-саркозинатом натрия. С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

тельностью каждого пассажа 24 ч, после чего анализировали агрегацию Gln3-YFP при помощи микроскопии. В результате проведенного эксперимента было установлено, что агрегация Gln3-YFP в штамме [GLN3^{↑+}] не зависит от сверхпродукции Hsp104, однако делеция гена, кодирующего этот шаперон, приводит к практически полному исчезновению агрегатов Gln3-YFP (единичные агрегаты наблюдались в <0,4% клеток, сверхпродуцирующих Gln3-YFP) (рис. 2, б).

Ключевым свойством прионов является инфекционность, которая может быть продемонстрирована либо цитодукцией [21], либо белковой трансформацией [22], при которой штамм, не несущий прион, котрансформируют белковым лизатом из штамма, несущего прион, а также плазмидным вектором, позволяющим селективировать клетки с наиболее поврежденной стенкой, вероятность попадания в которые прионных агрегатов более высока [22].

Мы котрансформировали сферопласты штамма [gln3^{↑-}] белковым лизатом (см. «Методы исследования»), выделенным из штамма [GLN3^{↑+}] и вектором pRS315. Трансформанты высевали на среду с полужидким агаром (1,2%) без лейцина и урацила, содержащую 150 мкМ CuSO₄. Далее по 150 трансформантов в каждом из трех экспериментов переносили на селективную среду без лейцина и урацила, содержащую 150 мкМ CuSO₄, и через 48 ч анализировали агрегацию Gln3-YFP при помощи микроскопии. Для того, чтобы избежать возможных артефактов, использовали штамм [gln3^{↑-}], несущий плазмиду для сверхпродукции Gln3-YFP с маркером URA3, и штамм [GLN3^{↑+}], несущий плазмиду для сверхпродукции Gln3 с маркером LEU2, а полученные трансформанты проверяли на предмет гаплоидности и сохранения типа спаривания MATa путем скрещивания с контрольными штаммами – тестерами типов спаривания. Полученные данные показали, что [GLN3^{↑+}] передается при белковой трансформации с частотой ~2% (табл. 3). При этом в контрольном эксперименте, где штамм [gln3^{↑-}] трансформировали белковым

лизатом, выделенным из [gln3^{↑-}], возникновение клеток с агрегатами Gln3-YFP отмечено не было (табл. 3). На основании полученных данных можно заключить, что [GLN3^{↑+}] обладает свойствами, присущими дрожжевым прионам: инфекционностью и зависимостью от антиприонных агентов.

Агрегация Gln3-YFP частично компенсирует подавление роста и снижение устойчивости к рапамицину, наблюдаемые при сверхэкспрессии GLN3. Далее мы решили проверить, имеет ли [GLN3^{↑+}] собственное фенотипическое проявление. Известно, что сверхпродукция Gln3 на генетическом фоне наших штаммов вызывает относительно сильное ингибирование вегетативного роста, Gln3-YFP – более слабое, а Gln3QN-YFP – не влияет на вегетативный рост. Это ингибирование плохо детектируется при переносе клонов методом отпечатка на селективную среду, но уверенно выявляется при использовании более чувствительного метода – теста на разведение [28].

Мы сравнили рост штаммов [GLN3^{↑+}] и [gln3^{↑-}] при помощи теста на разведение, для проведения которого эквивалентные количества культур [GLN3^{↑+}] и [gln3^{↑-}] засеивали в жидкую среду, содержащую 100 мкМ CuSO₄, и выращивали в течение 48 ч, после чего производили серию последовательных десятикратных разведений на твердой селективной среде. Полученные результаты показали, что возникновение [GLN3^{↑+}] частично компенсирует токсичность сверхпродукции Gln3: штаммы [GLN3^{↑+}] растут на селективной среде лучше, чем [gln3^{↑-}] (рис. 2, в). Более того, штамм [GLN3^{↑+}], который предварительно пассировали на среде с хлоридом гуанидина, демонстрировал более слабый рост, сходный с ростом штамма [gln3^{↑-}] (рис. 2, в), коррелирующий с потерей агрегации Gln3.

По литературным данным инактивация Gln3 повышает устойчивость дрожжей к ингибитору TOR-киназного каскада: антибиотику рапамицину [37]. Мы сравнили рост штаммов [GLN3^{↑+}], [gln3^{↑-}], а также контрольного штам-

Таблица 3. Белковая трансформация [GLN3^{↑+}]

Штамм-донор белкового лизата	Номер эксперимента	Всего трансформантов отобрано	Количество трансформантов [GLN3 ^{↑+}]	Эффективность передачи [GLN3 ^{↑+}] (%)
[GLN3 ^{↑+}]	1	112	2	1,8
	2	143	4	2,8
	3	98	1	1,0
[gln3 ^{↑-}]	1	128	0	0,0
	2	75	0	0,0
	3	140	0	0,0

ма, трансформированного вектором pRS316, на селективной среде, содержащей 150 мкМ CuSO_4 , и 5 нг/мл рапамицина. Полученные данные показали, что сверхпродукция Gln3 приводит к сильному подавлению роста дрожжей на селективной среде с рапамицином (рис. 2, з, штамм $[gln3^{\uparrow-}]$), в то время как прионоподобное состояние $[GLN3^{\uparrow+}]$ компенсирует потерю устойчивости штаммов, сверхпродуцирующих Gln3, к рапамицину, и вегетативный рост штаммов $[GLN3^{\uparrow+}]$ соответствует уровню роста контрольных штаммов (рис. 2, з). Таким образом, $[GLN3^{\uparrow+}]$ компенсирует подавление вегетативного роста и потерю устойчивости к рапамицину, вызываемые сверхпродукцией белка Gln3.

Агрегированное состояние Gln3-YFP детектируется биохимически. Для большинства QN-обогащенных дрожжевых прионов свойственно формирование агрегатов, которые детектируются при помощи седиментационного анализа, в ходе которого белки разделяют на осадочную и надосадочную фракции при помощи центрифугирования [33]. При этом большая часть соответствующего прион-формирующего белка в штаммах, не несущих прион, находится в растворимой фракции, а в штаммах с прионом – в осадочной. Мы проанализировали агрегацию Gln3-YFP при помощи седиментационного анализа в штаммах $[GLN3^{\uparrow+}]$ и $[gln3^{\uparrow-}]$ (см. «Методы исследования»). Следует отметить, что Gln3-YFP крайне нестабилен, и все действия с ним необходимо проводить на льду. Полученные данные показали, что большая часть белка Gln3-YFP в штамме $[GLN3^{\uparrow+}]$ находится в осадочной фракции, в то время как в исходном штамме $[gln3^{\uparrow-}]$ этот белок присутствует преимущественно в растворимой надосадочной фракции (рис. 2, д), что соответствует результатам конфокальной микроскопии. Более того, инкубация тотального белка, выделенного из штамма $[GLN3^{\uparrow+}]$ с ионным детергентом (3%-ный лаурил-саркозинат натрия) в течение 10 мин при 4 °С, показала, что агрегаты Gln3-YFP устойчивы к этому детергенту (рис. 2, д). Необходимо отметить, что лаурил-саркозинат натрия был выбран, поскольку он не выпадает в осадок при охлаждении в отличие от более распространенного додецил-сульфата натрия. Таким образом, агрегация Gln3-YFP в штамме $[GLN3^{\uparrow+}]$ может быть детектирована биохимическими методами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Прионизация белков изначально рассматривалась как уникальный случай формирования белком PrP инфекционных частиц, вызывающих

нейродегенеративные заболевания у человека [3]. Подобные инфекционные белковые частицы были позднее обнаружены у аскомицетов и, прежде всего, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [5], у которых они наследуются в ряду клеточных поколений и детерминируют различные фенотипические признаки, в том числе адаптивные [38], что легло в основу концепции белковой наследственности [5, 39]. Согласно этой концепции, носителями наследственной информации могут являться не только нуклеиновые кислоты, но и белки, причем в качестве матрицы в этом случае выступает не последовательность аминокислот, а пространственная структура белка, которая автокаталитически копируется и затем передается в дочерние клетки [40].

Ключевым свойством прионных агрегатов является инфекционность [41]. Применительно к прионам дрожжей это свойство означает, что введение прионных агрегатов в клетку, в которой соответствующий структурный белок находится в растворимом состоянии, приводит к конверсии последнего в агрегированную прионную конформацию, стабильно наследуемую и передающуюся дочерним клеткам [22]. Отсюда следует и доминантность прионной конформации над мономерной [42]. Прионоподобное состояние $[GLN3^{\uparrow+}]$ обладает инфекционностью и доминантностью в отношении $[gln3^{\uparrow-}]$ с тем лишь отличием, что эти свойства проявляются и поддерживаются только при сверхпродукции Gln3 (рис. 3). Как и большинство известных QN-обогащенных прионов дрожжей [17], $[GLN3^{\uparrow+}]$ зависит от хлорида гуанидина и Hsp104 (рис. 2), что также показывает прионоподобную природу этого агрегированного состояния Gln3.

Третьим важным свойством прионов является повышение частоты индукции приона с увеличением уровня продукции соответствующего структурного белка. Это свойство объясняется тем, что увеличение количества молекул белка и их локальной концентрации повышает вероятность перехода в прионную конформацию. Для возникновения $[GLN3^{\uparrow+}]$ недостаточно только сверхпродукции структурного белка Gln3 (или Gln3-YFP), но необходимо также одновременное присутствие в клетке приона $[PIN^+]$ и косверхпродукция QN-обогащенного фрагмента Gln3, слитого для визуализации агрегации с CFP (рис. 1, 3). Прион $[PIN^+]$ является универсальным индуктором различных прионов [6, 35], однако он непосредственно не вызывает индукцию $[GLN3^{\uparrow+}]$ при сверхпродукции Gln3 [28] (рис. 3). Тем не менее на фоне $[PIN^+]$ весьма эффективно агрегирует Gln3QN, полимеры которого, в свою очередь, индуцируют агрегацию полноразмерного Gln3 (рис. 3). Таким образом,

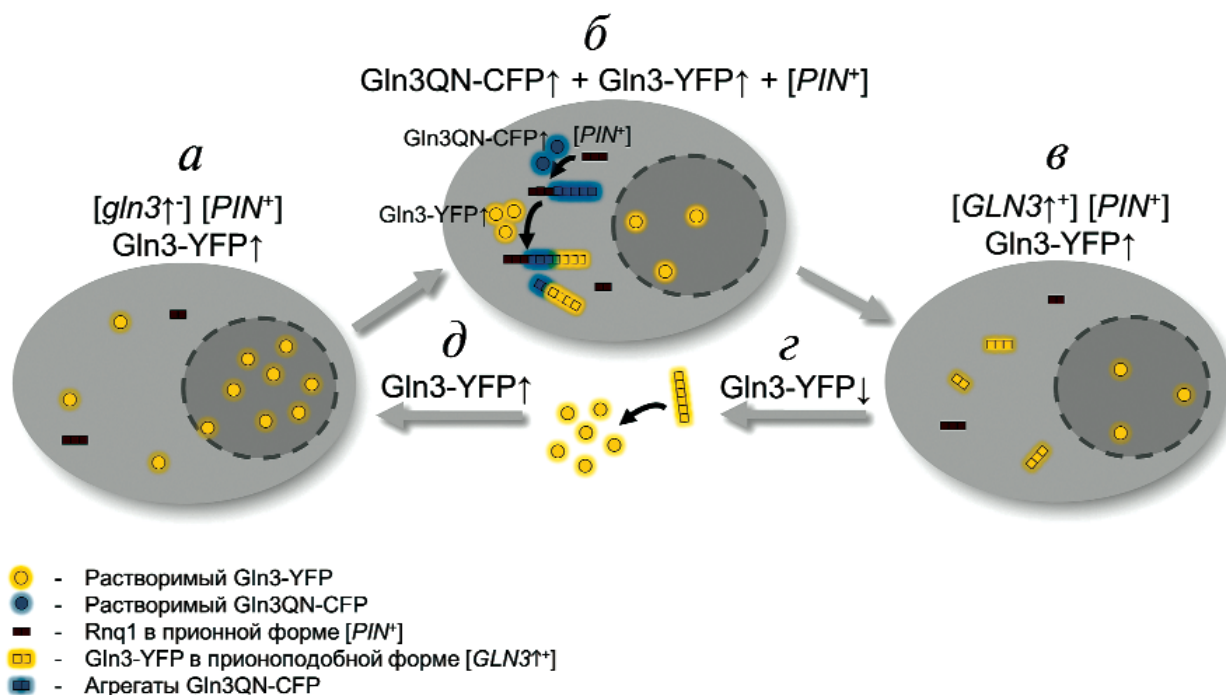


Рис. 3. «Жизненный цикл» условного приона $[GLN3^{\uparrow+}]$. Показана схема индукции, поддержания и элиминации $[GLN3^{\uparrow+}]$. *a* – Сверхэкспрессия Gln3-YFP не приводит к его агрегации, белок локализуется преимущественно в ядре. *б* – Прион $[PIN^+]$ вызывает агрегацию Gln3QN-CFP при сверхпродукции. Появление полимеров Gln3QN-CFP вызывает агрегацию Gln3-YFP. *в* – Прекращение сверхпродукции Gln3QN-CFP не вызывает элиминацию агрегатов Gln3-YFP, и эти агрегаты стабильно наследуются в ряду клеточных поколений. *з* – Прекращение сверхпродукции Gln3-YFP приводит к элиминации его агрегатов. *д* – Повышение уровня продукции Gln3-YFP после элиминации $[GLN3^{\uparrow+}]$ не приводит к агрегации этого белка.

С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

в данном случае имеет место трехкомпонентная система для индукции $[GLN3^{\uparrow+}]$ (косверхпродукция Gln3 и Gln3QN на фоне $[PIN^+]$) (рис. 3). Эта описанная нами система может быть потенциально полезна и для скрининга новых прионов в дрожжевой системе при замене Gln3 и Gln3QN на соответствующие анализируемые белки и их QN-обогащенные фрагменты.

По имеющимся данным, регуляция активности Gln3 осуществляется в основном за счет фосфорилирования и связывания с другими белками [43], в том числе Uge2, который сам обладает прионными свойствами [5], но не путем изменения уровня продукции, поэтому появление $[GLN3^{\uparrow+}]$ в реальных условиях представляется маловероятным. Тем не менее полностью отрицать такую возможность нельзя, поскольку ряд патологических амилоидов человека возникает именно в результате мутаций в регуляторных областях их генов-детерминантов, приводящих *in vivo* к сверхпродукции соответствующих структурных белков [44]. При тепловом стрессе происходит увеличение продукции дрожжевого белка Lsb2, что вызывает его прионоподобную агрегацию [45]. С другой стороны, прионоподобная

агрегация Gln3 является даже полезной для клетки, поскольку компенсирует токсичность сверхпродукции этого белка (рис. 2), которая может быть опосредована негативным влиянием на эффективность терминации трансляции [25–27]. Поскольку увеличение уровня продукции многих транскрипционных факторов является летальным [46], их прионизация при сверхпродукции потенциально могла бы представлять механизм компенсации эффектов вредных регуляторных мутаций в соответствующих генах.

Наиболее существенным отличием $[GLN3^{\uparrow+}]$ от известных прионов дрожжей является то, что это состояние белка Gln3 поддерживается только при его постоянной сверхпродукции. Мы предлагаем называть такие белки «условными прионами» для того, чтобы отличать их от «истинных» (*bona fide* [1]) прионов, которые поддерживаются при нормальном уровне продукции, а также «искусственных» [47] прионов, которые образуются белками с измененной первичной структурой (например, изолированные прионогенные фрагменты белков [1, 47] или синтетические последовательности с прионными свойствами [48]). Так, к истинным (*bona fide*)

прионам дрожжей можно отнести 9 белков (Sup35, Ure2, Rnq1, Mot3, Swi1, Cys8, Mod5, Sfp1 и Prb), а к искусственным – QN-обогащенные фрагменты 18 белков [1], также обладающие приноподобными свойствами.

Необходимо отметить, что Gln3 является иллюстрацией того, что свойства фрагментов существенно отличаются от свойств соответствующих полноразмерных белков. В самом деле, QN-обогащенный фрагмент Gln3 обладает некоторыми свойствами искусственного приона [1], его агрегаты индуцируются преимущественно на фоне [*PIN*⁺] и обладают устойчивостью к ионным детергентам [1, 28] (рис. 2). Агрегация полноразмерного Gln3 может быть индуцирована только при совместной сверхпродукции с собственным QN-обогащенным фрагментом, а его агрегаты, хотя и обладают инфекционностью, все же менее устойчивы к ионным детергентам и поддерживаются исключительно при сверхпродукции (рис. 2).

Могут ли быть и другие белки, обладающие свойствами условных прионов, подобно Gln3? Протеомы являются динамичными системами, и уровень продукции белков может многократно меняться в случае стрессов, смены фаз жизненного цикла или действия иных факторов [49]. В протеоме дрожжей 10 ключевых регуляторных комплексов содержат не менее двух белков, обогащенных Q и N [13], причем в трех из этих комплексов (Pub1/Sup35, Cys8/Tup1 и Swi/Snf) описаны белки, образующие прионы [7, 8, 50]. Можно предположить, что и другие QN-богатые белки данных комплексов в определенных условиях могли бы приобретать свойства условных прионов, опосредованные взаимодействиями с уже известными прионными белками.

В целом, в настоящем исследовании показано, что белок Gln3 дрожжей *S. cerevisiae* обладает приноподобными свойствами, которые поддерживаются только при его сверхпродукции. Предложена система классификации прионов на истинные, условные и искусственные. Опробован подход для скрининга прионов путем совместной сверхпродукции полноразмерных белков-кандидатов с прионогенными фрагментами, слитыми с флуоресцентными белками YFP и CFP соответственно в присутствии приона [*PIN*⁺].

Финансирование

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№ 16-34-60153 и № 17-04-00816).

Благодарности

Исследование проведено с использованием оборудования ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ. Авторы благодарят к.б.н. А.Г. Матвеевко за любезно предоставленные штаммы *S. cerevisiae*.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alberti, S., Halfmann, R., King, O., Kapila, A., and Lindquist, S. (2009) A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins, *Cell*, **137**, 146–158, doi: 10.1016/j.cell.2009.02.044.
2. Roberts, B.T., and Wickner, R.B. (2003) Heritable activity: a prion that propagates by covalent autoactivation, *Genes Dev.*, **17**, 2083–2087.
3. Bolton, D.C., McKinley, M.P., and Prusiner, S.B. (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion, *Science*, **218**, 1309–1311.
4. Prusiner, S.B., and Scott, M.R. (1997) Genetics of prions, *Annu. Rev. Genet.*, **31**, 139–175.
5. Wickner, R.B. (1994) [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*, *Science*, **264**, 566–569, doi: 10.1126/science.7909170.
6. Derkatch, I.L., Bradley, M.E., Hong, J.Y., and Liebman, S.W. (2001) Prions affect the appearance of other prions: the story of [*PIN*⁺], *Cell*, **106**, 171–182, doi: 10.1016/S0092-8674(01)00427-5.
7. Du, Z., Park, K.K.-W., Yu, H., Fan, Q., and Li, L. (2008) Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nat. Genet.*, **40**, 460–465, doi: 10.1038/ng.112.
8. Patel, B.K., Gavin-Smyth, J., and Liebman, S.W. (2009) The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion, *Nat. Cell Biol.*, **11**, 344–349, doi: 10.1038/ncb1843.
9. Suzuki, G., Shimazu, N., and Tanaka, M. (2012) A yeast prion, Mod5, promotes acquired drug resistance and cell survival under environmental stress, *Science*, **336**, 355–359, doi: 10.1126/science.1219491.
10. Osherovich, L.Z., and Weissman, J.S. (2001) Multiple Gln/Asn-rich prion domains confer susceptibility to induction of the yeast [*PSI*⁺] prion, *Cell*, **106**, 183–194, doi: 10.1016/S0092-8674(01)00440-8.
11. Michelitsch, M.D., and Weissman, J.S. (2000) A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions,

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11910–11915, doi: 10.1073/pnas.97.22.11910.
12. Harrison, P.M., and Gerstein, M. (2003) A method to assess compositional bias in biological sequences and its application to prion-like glutamine/asparagine-rich domains in eukaryotic proteomes, *Genome Biol.*, **4**, R40, doi: 10.1186/gb-2003-4-6-r40.
 13. Nizhnikov, A.A., Antonets, K.S., Bondarev, S.A., Inge-Vechtomov, S.G., and Derkatch, I.L. (2016) Prions, amyloids, and RNA: pieces of a puzzle, *Prion*, **10**, 182–206, doi: 10.1080/19336896.2016.1181253.
 14. Tycko, R., and Wickner, R.B. (2013) Molecular structures of amyloid and prion fibrils: consensus versus controversy, *Acc. Chem. Res.*, **46**, 1487–1496, doi: 10.1021/ar300282r.
 15. Wickner, R.B., Shewmaker, F., Edskes, H., Kryndushkin, D., Nemecek, J., McGlinchey, R., Bateman, D., and Winchester, C.L. (2010) Prion amyloid structure explains templating: how proteins can be genes, *FEMS Yeast Res.*, **10**, 980–991, doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00666.x.
 16. Romanova, N.V., and Chernoff, Y.O. (2009) Hsp104 and prion propagation, *Protein Pept. Lett.*, **16**, 598–605, doi: 10.2174/092986609788490078.
 17. Liebman, S.W., and Chernoff, Y.O. (2012) Prions in yeast, *Genetics*, **191**, 1041–1072, doi: 10.1534/genetics.111.137760.
 18. Chernova, T.A., Wilkinson, K.D., and Chernoff, Y.O. (2014) Physiological and environmental control of yeast prions, *FEMS Microbiol. Rev.*, **38**, 326–344, doi: 10.1111/1574-6976.12053.
 19. Wickner, R.B., Shewmaker, F.P., Bateman, D.A., Edskes, H.K., Gorkovskiy, A., Dayani, Y., and Bezsonov, E.E. (2015) Yeast prions: structure, biology, and prion-handling systems, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **79**, 1–17, doi: 10.1128/MMBR.00041-14.
 20. Wright, R.E., and Lederberg, J. (1957) Extranuclear transmission in yeast heterokaryons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **43**, 919–923.
 21. Zakharov, I.A., and Yarovoy, B.P. (1977) Cytoinduction as a new tool in studying the cytoplasmic heredity in yeast, *Mol. Cell. Biochem.*, **14**, 15–18.
 22. Tanaka, M., Chien, P., Naber, N., Cooke, R., and Weissman, J.S. (2004) Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences, *Nature*, **428**, 323–328, doi: 10.1038/nature02392.
 23. Cox, K., Rai, R., Distler, M., Daugherty, J.R., Coffman, J.A., and Cooper, T.G. (2000) *Saccharomyces cerevisiae* GATA sequences function as TATA elements during nitrogen catabolite repression and when Gln3p is excluded from the nucleus by overproduction of Ure2p, *J. Biol. Chem.*, **275**, 17611–17618, doi: 10.1074/jbc.M001648200.
 24. Kulkarni, A.A., Abul-Hamad, A.T., Rai, R., El Berry, H., and Cooper, T.G. (2001) Gln3p nuclear localization and interaction with Ure2p in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 32136–32144, doi: 10.1074/jbc.M104580200.
 25. Nizhnikov, A.A., Kondrashkina, A.M., Antonets, K.S., and Galkin, A.P. (2014) Overexpression of genes encoding asparagine-glutamine-rich transcriptional factors causes nonsense suppression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Russ. J. Genet. Appl. Res.*, **4**, 122–130, doi: 10.1134/S2079059714-020051.
 26. Nizhnikov, A.A., Antonets, K.S., Inge-Vechtomov, S.G., and Derkatch, I.L. (2014) Modulation of efficiency of translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*: turning nonsense into sense, *Prion*, **8**, 247–260, doi: 10.4161/pri.29851.
 27. Matveenko, A.G., Belousov, M.V., Bondarev, S.A., Moskalenko, S.E., and Zhouravleva, G.A. (2016) Identification of new genes that affect [PSI⁺] prion toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* yeast, *Mol. Biol.*, **50**, 710–718, doi: 10.1134/S0026893316050113.
 28. Antonets, K.S., Sargsyan, H.M., and Nizhnikov, A.A. (2016) A glutamine/asparagine-rich fragment of Gln3, but not the full-length protein, aggregates in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 407–413, doi: 10.1134/S0006297916040118.
 29. Kaiser, C., Michaelis, S., Mitchell, A., and Cold Spring Harbor Laboratory (1994) *Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 30. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.Н., Федорова И.В. (1976) *Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов*, Наука, Ленинград.
 31. Nizhnikov, A.A., Ryzhova, T.A., Volkov, K.V., Zadorsky, S.P., Sopova, J.V., Inge-Vechtomov, S.G., and Galkin, A.P. (2016) Interaction of prions causes heritable traits in *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS Genet.*, **12**, e1006504, doi: 10.1371/journal.pgen.1006504.
 32. Rubel, A.A., Ryzhova, T.A., Antonets, K.S., Chernoff, Y.O., and Galkin, A.P. (2013) Identification of PrP sequences essential for the interaction between the PrP polymers and A β peptide in a yeast-based assay, *Prion*, **7**, 469–476, doi: 10.4161/pri.26867.
 33. Newnam, G.P., Węgrzyn, R.D., Lindquist, S.L., and Chernoff, Y.O. (1999) Antagonistic interactions between yeast chaperones Hsp104 and Hsp70 in prion curing, *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1325–1333, doi: 10.1128/mcb.19.2.1325.
 34. Saifitdinova, A.F., Nizhnikov, A.A., Lada, A.G., Rubel, A.A., Magomedova, Z.M., Ignatova, V.V., Inge-Vechtomov, S.G., and Galkin, A.P. (2010) [NSI(+)] : a novel non-Mendelian nonsense suppressor determinant in *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.*, **56**, 467–478, doi: 10.1007/s00294-010-0314-2.
 35. Derkatch, I.L., and Liebman, S.W. (2007) Prion–prion interactions, *Prion*, **1**, 161–169.
 36. Masison, D.C., and Reidy, M. (2015) Yeast prions are useful for studying protein chaperones and protein quality control, *Prion*, **9**, 174–183, doi: 10.1080/19336896.2015.1027856.
 37. Huang, Z., Chen, K., Zhang, J., Li, Y., Wang, H., Cui, D., Tang, J., Liu, Y., Shi, X., Li, W., Liu, D., Chen, R., Sugang, R.S., and Pan, X. (2013) A functional variomics tool for discovering drug-resistance genes and drug targets, *Cell Rep.*, **3**, 577–585, doi: 10.1016/j.celrep.2013.01.019.
 38. Holmes, D.L., Lancaster, A.K., Lindquist, S., and Halfmann, R. (2013) Heritable remodeling of yeast multicellularity by an environmentally responsive prion, *Cell*, **153**, 153–165, doi: 10.1016/j.cell.2013.02.026.
 39. Cox, B. (1994) Cytoplasmic inheritance: prion-like factors in yeast, *Curr. Biol.*, **4**, 744–748, doi: 10.1016/S0960-9822(00)00167-6.
 40. Inge-Vechtomov, S.G. (2013) The template principle: paradigm of modern genetics, *Genetika*, **49**, 9–15, doi: 10.1134/S1022795413010055.
 41. Wickner, R.B. (2011) Prion diseases: infectivity versus toxicity, *Nature*, **470**, 470–471, doi: 10.1038/470470a.
 42. Liebman, S.W., and Derkatch, I.L. (1999) The yeast [PSI⁺] prion: making sense of nonsense, *J. Biol. Chem.*, **274**, 1181–1184, doi: 10.1074/jbc.274.3.1181.
 43. Bertram, P.G., Choi, J.H., Carvalho, J., Ai, W., Zeng, C., Chan, T.F., and Zheng, X.F.S. (2000) Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p, and phosphatases, *J. Biol. Chem.*, **275**, 35727–35733, doi: 10.1074/jbc.M004235200.
 44. Eisenberg, D., and Jucker, M. (2012) The amyloid state of proteins in human diseases, *Cell*, **148**, 1188–1203, doi: 10.1016/j.cell.2012.02.022.
 45. Chernova, T.A., Kiktev, D.A., Romanyuk, A.V., Shanks, J.R., Laur, O., Ali, M., Ghosh, A., Kim, D., Yang, Z., Mang, M., Chernoff, Y.O., and Wilkinson, K.D. (2017) Yeast short-lived actin-associated protein forms a metastable prion in response to thermal stress, *Cell Rep.*, **18**, 751–761, doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.082.

46. Sopko, R., Huang, D., Preston, N., Chua, G., Papp, B., Kafadar, K., Snyder, M., Oliver, S.G., Cyert, M., Hughes, T.R., Boone, C., and Andrews, B. (2006) Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression, *Mol. Cell*, **21**, 319–330, doi: 10.1016/j.molcel.2005.12.011.
47. Osherovich, L.Z., Cox, B.S., Tuite, M.F., and Weissman, J.S. (2004) Dissection and design of yeast prions, *PLoS Biol.*, **2**, e86, doi: 10.1371/journal.pbio.0020086.
48. Crist, C.G., Nakayashiki, T., Kurahashi, H., and Nakamura, Y. (2003) [*PHI*⁺], a novel Sup35-prion variant propagated with non-Gln/Asn oligopeptide repeats in the absence of the chaperone protein Hsp104, *Genes Cells*, **8**, 603–618, doi: 10.1046/j.1365-2443.2003.00661.x.
49. Chong, Y.T., Koh, J.L.Y., Friesen, H., Duffy, K., Cox, M.J., Moses, A., Moffat, J., Boone, C., and Andrews, B.J. (2015) Yeast proteome dynamics from single cell imaging and automated analysis, *Cell*, **161**, 1413–1424, doi: 10.1016/j.cell.2015.04.051.
50. Wickner, R.B., Masison, D.C., and Edskes, H.K. (1995) [*PSI*] and [*URE3*] as yeast prions, *Yeast*, **11**, 1671–1685, doi: 10.1002/yea.320111609.
51. Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, **122**, 19–27, doi: 0378111995000377.
52. Chernoff, Y.O., Newnam, G.P., Kumar, J., Allen, K., and Zink, A.D. (1999) Evidence for a protein mutator in yeast: role of the Hsp70-related chaperone Ssb in formation, stability, and toxicity of the [*PSI*] prion, *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 8103–8112, doi: 10.1128/MCB.19.12.8103.

THE Gln3 TRANSCRIPTIONAL REGULATOR OF *Saccharomyces cerevisiae* MANIFESTS PRION-LIKE PROPERTIES WHEN OVERPRODUCED

K. S. Antonets^{1,2}, M. V. Belousov^{1,2}, M. E. Belousova²,
and A. A. Nizhnikov^{1,2*}

¹ *St. Petersburg State University, 199034 St. Petersburg, Russia;*
E-mail: ant.nizhnikov@gmail.com

² *All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology,*
196608 Pushkin, St. Petersburg, Russia

Received June 9, 2018
Revised November 24, 2018
Accepted November 24, 2018

Prions are proteins that can exist under the same conditions in two or more conformations, and at least one of them has infectious properties. Typically, acquisition of such infectious prion conformation is associated with the formation of amyloids, i.e., protein aggregates with a characteristic spatial structure. To date, about 10 prions have been identified in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. One of the key regulators of nitrogen metabolism in *S. cerevisiae*, Gln3, contains amyloidogenic region manifesting prion-like properties. Prion properties of the full-length Gln3 have not been analyzed before. In this study, we demonstrated that amyloidogenic region of Gln3 is able to act as a template initiating aggregation of the overproduced full-length Gln3 protein in the presence of the [*PIN*⁺] prion. The aggregated state of the full-length Gln3 has prion-like properties, including infectivity and curability by anti-prion agent guanidine hydrochloride, but propagates only when overproduced. We propose term «conditional prions» for such proteins, whose prion state is maintained exclusively under non-physiological conditions.

Keywords: prion, Gln3, amyloid, [*PIN*⁺], infectivity, yeast, *S. cerevisiae*