

ВПЛИВ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ПОЗАКЛІТИННОЇ ГЛЮКОЗИ НА ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ α -СИНУКЛЕЇНУ ЛЮДИНИ У МОДЕЛЬНИХ ШТАМАХ ДРІЖДЖІВ *HANSENULA POLYMORPHA*

О. Стасик^{1,2}, О. Романишин¹, І. Денега¹, Н. Климишин¹, О. Стасик²

¹ Львівський національний університет імені Івана Франка

вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

² Інститут біології клітини НАН України

вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна

e-mail: olenastasyk@gmail.com

Для моделювання процесів, притаманних нейронам за хвороби Паркінсона, було сконструйовано вектор rGLG61-*SNCA* для експресії у клітинах дріжджів *Hansenula polymorpha* химерного конструкту *SNCA-GFP*, який складався з послідовності гена людського α -синуклеїну (*SNCA*), злитого з геном зеленого флуоресцентного білка (*yEGFP*). Оскільки патологія дофамінергічних нейронів чорної субстанції середнього мозку у разі хвороби Паркінсона часто розвивається на тлі надсинтезу α -синуклеїну, в роботі використовували штами – мультикопійні інтегранти, відібрані за стійкістю до генетицину, що характеризувалися підвищеною флуоресценцією міченого GFP α -синуклеїну в цитозолі. Встановлено, що у середовищі з 1 % глюкози (фізіологічні умови культивування дріжджів) частка мертвих клітин штаму NCYC 495 / *SNCA* була помітно вищою порівняно зі штамом дикого типу, що свідчить про токсичний ефект гетерологічної експресії гена α -синуклеїну. Отримані результати були підтверджені кінетиками росту досліджуваних штамів у рідкій культурі. Для моделювання умов гіпоглікемії у клітинах *H. polymorpha* використовували середовище із 0,1 % глюкози. Встановлено, що кількість клітин штаму NCYC 495 / *SNCA*, в яких детектувався флуоресцентно-мічений α -синуклеїн, у перші 18 год культивування швидше зменшувалася на середовищі з низькою концентрацією глюкози (0,1 %) порівняно з клітинами, вирощеними на середовищі з високою концентрацією глюкози (1 %), що супроводжувалося прогресивною загибеллю клітин. Отримані дані свідчать про ефективність вибраної моделі для дослідження впливу різних екзогенних чинників і цитотоксичності α -синуклеїну людини.

Ключові слова: α -синуклеїн, *Hansenula polymorpha*, хвороба Паркінсона.

Хвороба Паркінсона (ХП) – одне із найпоширеніших нейродегенеративних захворювань нервової системи, яке займає друге місце після хвороби Альцгеймера. Зазвичай хворіють люди похилого віку. Найчастіше перші симптоми захворювання з'являються у віці 55-60 років. Проте в окремих випадках хвороба може розвинутиися й у віці до 40 років (ХП з раннім початком) або до 20 років (ювенільна форма захворювання).

Сучасна медицина досягнула певного прогресу в розумінні молекулярних і біохімічних механізмів ХП. Проте залишається невідомою істинна етіологія спорадичних форм цього захворювання. Велике значення мають генетична схильність і фактори зовнішнього середовища (екологія, вплив гербіцидів і пестицидів, іонів важких металів, інфекції, тривале вживання деяких лікарських препаратів (наприклад, нейролептиків), енцефаліт тощо). Поєднання та взаємодія цих факторів ініціюють процес дегенерації нейронів у стовбурі головного мозку. Такий процес, одного разу виникнувши, стає незворотним і починає експансивне поширення по всьому мозку. На клітинному рівні цей про-

пес супроводжується недостатністю дихальних функцій мітохондрій, а також оксидативним стресом – основною причиною апоптозу нейронів [2]. Однак у патогенезі ХП беруть участь й інші чинники, функції яких залишаються не розкритими й досі.

Як модельні об'єкти для дослідження ХП сьогодні використовують не лише багатоклітинні організми, але й одноклітинні еукаріоти (наприклад, дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* [9], або, як нещодавно описано нами, *Hansenula polymorpha* [4]). Дріжджі як модельний об'єкт нейродегенеративних захворювань людини мають свої обмеження, оскільки їхні клітини не беруть участі у складних міжклітинних взаємодіях, що характерно для нейронів у людському мозку. У них також немає деяких регуляторних шляхів, задіяних у розвитку багатоклітинних організмів, зокрема, нейроноспецифічних. Проте деякі клітинні механізми та їхні впливи є консервативними в усіх еукаріотів: мембранний транспорт, деградація білків, дисфункція мітохондрій, оксидативний стрес, регуляція транскрипції та забезпечення балансу між новосинтезованим білком і білком, який зазнає деградації [10]. Незважаючи на сотні мільйонів років незалежної еволюції, приблизно 44 % геному *S. cerevisiae* є гомологічним до людського [8]. Крім того, геном дріжджів добре вивчений і створено багато методів, які дають змогу індукувати надекспресію певного гена або, навпаки, виключити цей ген. Дріжджові культури, які розмножуються брунькуванням, демонструють швидкий ріст і час подвоєння біомаси у проміжку від 1,5 до 3 годин. Дріжджі легко піддаються різним генетичним маніпуляціям. Простий метод трансформації ДНК і наявність значної кількості селективних маркерів дає можливість інтегрувати складні самовідтворювальні вектори в геном дріжджів. Крім того, високоспецифічні гени, стабільні генетичні модифікації та маркери, введені в геном шляхом гомологічної рекомбінації послідовностей ДНК, є ефективними підходами до регуляції експресії геному дріжджів. І, нарешті, те, що робить дріжджі особливо привабливими як модельний об'єкт для дослідження різних патологічних процесів на рівні клітини, – це великий набір молекулярних інструментів, котрі дають змогу здійснювати систематичний генетичний аналіз окремих клітинних процесів, проводити скринінг фенотипів сконструйованих модельних штамів. До таких переваг належать не лише колекції дріжджових мутантів з делеціями генів, гіпоморфними алелями та частково репресованими промоторами, а й колекції плазмід, за допомогою яких можна досліджувати надекспресію або визначати локалізацію молекул, використовуючи штами дріжджів із GFP-колекцій (GFP – зелений флуоресцентний білок). За допомогою цих методів у поєднанні з процесами рекомбінантної експресії генів, які кодують компоненти, задіяні у розвитку ХП, дріжджові моделі можна використовувати для ідентифікації генів, які певним чином регулюють процеси, пов'язані з цим захворюванням, зокрема, агрегацію білка, його цитотоксичність і деградацію [3].

Для дослідження молекулярних механізмів, притаманних ХП, нами було вперше отримано модельні штами метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* [4], у яких експресується рекомбінантний ген *SNCA*, що кодує людський білок α -синуклеїн. Для цього виду еукаріотичних мікроорганізмів властива низка специфічних характеристик: ці дріжджі ростуть при 37 °C, що є ближчим до фізіологічних показників температури тіла людини, порівняно з температурним оптимумом для *S. cerevisiae* у 30 °C; при збільшенні концентрації глюкози (джерела карбону) у культуральному середовищі *H. polymorpha* не змінює аеробний метаболізм на бродіння, як це властиво для пекарських дріжджів; легкість у культивуванні та здатність рости на багатьох джерелах карбону, в тому числі й на метанолі. Геном *H. polymorpha* добре вивчений, що дає змогу проводити різні молекулярні маніпуляції.

Тому метою нашої роботи було з'ясувати можливість використання сконструйованих нами модельних штамів *H. polymorpha*, в яких продукується людський білок α -синуклеїн, для дослідження впливу деяких екзогенних чинників, таких як низький рівень позаклітинної глюкози, на агрегацію цього білка.

Матеріали та методи

Умови культивування та ростові середовища. Штами *H. polymorpha* вирощували за 37 °С у багатому середовищі YPS (1 % дріжджовий екстракт, 1 % бактопептон, 1 % сахароза). Мінеральні середовища з різними джерелами карбону містили 1,7 г/л YNB (Yeast Nitrogen Base without amino acids), 2,5 г/л (NH₄)₂SO₄, джерела карбону додавалися до кінцевої концентрації 1 %, якщо умови досліджу не передбачали іншого. При потребі у середовище вносили амінокислоти до кінцевої концентрації 80 мг/л. Для твердих середовищ агар додавали у 2 % концентрації. Штами *Escherichia coli* DH5α вирощували при 37 °С на середовищі LB (1,5 % бактопептон, 0,5 % дріжджовий екстракт, 0,5-1,0 % NaCl). Для селекції плазмідомісних бактерій додавали ампіцилін у концентрації 100 мг/л. Температура культивування для дріжджів і бактерій становила 37 °С, умови аерації – перемішування на шейкері (220 об./хв).

Визначення оптичної густини клітин. Оптичну густину суспензії дріжджів визначали на спектрофотометрі СФ-46, за довжини хвилі 600 нм у 10 мм кюветі за оптичною густиною розведеної в кілька разів культури клітин проти води як контролю. Оптичну густину суспензії бактерій визначали на спектрофотометрі СФ-46, за довжини хвилі 540 нм в 5 мм кюветі за оптичною густиною розведеної в кілька разів культури клітин проти води як контролю.

Конструювання плазмідних векторів. Для конструювання рекомбінантних плазмід, необхідних для виконання роботи, використовували низку методів, описаних у [11]. Метод гідролітичного розщеплення ДНК базується на здатності ендонуклеаз рестрикції класу II розщеплювати ДНК в певних специфічних сайтах. У нашій роботі користувалися методикою описаною раніше [11], та інструкціями виробників ферментів: «Fermentas» (Литва), «NEB» (США), «Promega» (США). Лігування лінеаризованих фрагментів ДНК здійснювали за методикою, описаною раніше [11] з деякими змінами. У реакції лігування використовували ДНК-лігазу бактеріофага T4. Реакцію проводили в буфері, що був у комплекті з фірмовим препаратом лігази («Promega», США) згідно з інструкціями виробника. Для виділення рекомбінантних плазмід лігаційну суміш після преципітації етанолом або очищення на колонії фірми «Qiagen» (США) (Qiagen PCR purification Kit) трансформували у клітини *E. coli* методом електропорації.

Трансформація дріжджів *H. polymorpha* та бактерій *E. coli*. Електротрансформацію бактерій і дріжджів здійснювали за допомогою електропоратора ЕСМ600 фірми «ВТХ» (США), згідно з інструкціями виробника. Метод базується на здатності екзогенної ДНК проникати під впливом електричного імпульсу у клітини мікроорганізмів. Компетентні клітини для електропорації готували згідно з методикою, описаною в [6, 11]. Мітотичну стабільність дріжджових трансформантів визначали шляхом інкубації клітин трансформантів у неселективних умовах (середовище YPD) протягом не менше десяти генерацій і подальшого аналізу фенотипу колоній у селективних умовах.

Виділення плазмідної ДНК з клітин *E. coli*. Виділення плазмідної ДНК у препаративних кількостях проводили методом лужного лізису [11] або використовуючи набір реагентів фірми «Qiagen» (США), згідно з методикою виробника.

Отримання безклітинних екстрактів дріжджів. Для приготування безклітинних екстрактів з використанням трихлороцтової кислоти (ТХО) до осаду відмитих від культурального середовища клітин додавали 0,4 мл 12,5 % ТХО. Отриману суспензію клітин витримували не менше 2 год при –70 °С і осаджували центрифугуванням протягом 3 хв при 14000 об./хв. Осад двічі промивали 0,5 мл 80 % охолодженого до –20 °С розчину ацетону, підсушували при кімнатній температурі та ресуспендували в 0,1 мл лізуючого буферу (1 % SDS + 0,1 М NaOH). До одержаного лізату додавали рівний об'єм двократного буферу Лемлі (62,5 мМ *tris*-HCl (рН 6,8), 1 мМ ЕДТА, 2 % SDS, 5 % β-меркаптоетанол, 10 %

гліцерол, 0,4 % бромфеноловий синій). Біомаса штамів (кількість клітин), яку відбирали для Вестерн дот-блот аналізу, була однаковою для усіх штамів і становила 3,0 одиниці оптичної густини.

Вестерн дот-блот аналіз. За допомогою імуноферментного дот-блот аналізу визначали наявність гетерологічного α -синуклеїну в модельних штамів дріжджів. Для індукції синтезу білка модельні штами вирощували у рідкому мінеральному середовищі з 1 % глюкози, відбираючи рівні аліквоти культури для ТХО екстракції. На нітроцелюлозну мембрану білкові екстракти наносили у порядку: без розведення, 5-кратне розведення, 20-кратне розведення. Вільні центри зв'язування на мембрані блокували протягом 1 год розчином 5 % BSA (bovine serum albumin) або 5 % сухого знежиреного молока в PBS-T (*Phosphate buffered saline*: 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 9 % NaCl, 0,1 % Твін-20). У подальшому протягом ночі мембрану інкубували з первинними анти- α -синуклеїновими антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому. Після інкубації з антитілами, мембрани тричі промивали буфером PBS-T протягом 10-15 хв. ECL детекцію імунореактивних білків на мембрані проводили як описано [1]. Час експозиції оброблених мембран на рентгенівській плівці залежав від інтенсивності хемілюмінесценції і тривав 1-15 хв. Рентгенівські плівки проявляли у стандартному фенідон-гідрохіноновому проявнику та фіксували кислим фіксажем.

Флуоресцентна мікроскопія. Для отримання флуоресцентних мікрофотографій модельних штамів дріжджів використовували флуоресцентний мікроскоп Axio Imager A1 (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Germany) та цифрову фотокамеру AxioCamMRm (Carl Zeiss MicroImaging). Фотографії робили із 600-кратним збільшенням. Отримані фотографії обробляли за допомогою комп'ютерних програм Axio Vision 4.5 (Carl Zeiss MicroImaging) та Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems, Mountain View, CA).

Візуалізація мертвих клітин дріжджів за допомогою етидію броміду. Для виявлення мертвих клітин дріжджів за допомогою флуоресцентної мікроскопії використовували розчин етидію броміду в кінцевій концентрації 1 мкг/мл. Барвник вносили в 1 мл культури клітин безпосередньо перед аналізом. Фотографії робили із 600-кратним збільшенням і обробляли за допомогою комп'ютерних програм Axio Vision 4.5 та Adobe Photoshop CS5.

Результати і їхнє обговорення

Відомо, що однією з причин ХП є порушення функції білка α -синуклеїну, який у разі патології є основним компонентом аномальних включень у чорній субстанції середнього мозку, так званих тілець Леві. Утворення таких тілець може відбуватись у разі підвищеного рівня експресії гена *SNCA*, який кодує цей білок, точкових мутацій у цьому гені, які впливають на третинну структуру α -синуклеїну, його аномальної оліго- та полімеризації та ін. [14].

Для моделювання таких процесів у клітинах дріжджів *H. polymorpha* нами було сконструйовано вектор pGLG61-*SNCA* (рис. 1), який містив касету експресії химерного конструкту *SNCA-GFP*, що складалася з послідовності гена людського α -синуклеїну (*SNCA*), злитого з геном зеленого флуоресцентного білка (*yEGFP*). Такий химерний конструкт є зручним для моніторингу посттрансляційної локалізації α -синуклеїну і дослідження процесів агрегації та деградації цього білка у клітинах модельних штамів методом флуоресцентної мікроскопії.

Фрагмент сконструйованого нами раніше вектора pKF48-*SNCA* [4], який містив касету для експресії гена α -синуклеїну, злитого з відкритою рамкою зчитування гена *EGFP*, отримували після обробки ендонуклеазою рестрикції *PvuII*. Елюйований фрагмент клонували у плазмиду pGLG61, у складі якої є послідовність *TEL188*, гомологічна до відповідних багаторазово повторюваних послідовностей теломер хромосом дріжджів (рис. 1). Така гомологія забезпечувала інтеграцію кількох копій сконструйованого вектора у геном модельних

штамів. Позитивним маркером селекції трансформантів слугував ген резистентності до генетицину, *APH*, під вкороченим конститутивним промотором гена гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (*P_{GAPDH}*). Після трансформації клітини дріжджів висівали на селективне середовище YPS з різними концентраціями генетицину (200 мг, 500 мг, 1 г і 2 г на 1 л) з метою отримання трансформантів, у геном яких інтегрувалася різна кількість копій вектора.

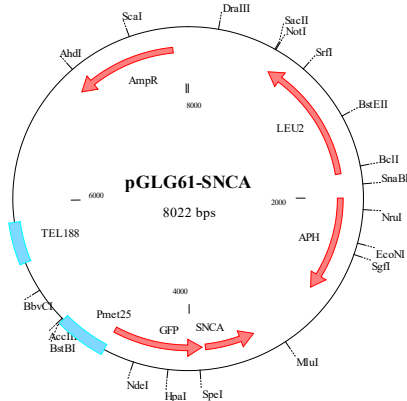


Рис. 1. Рестрикційна карта вектора pGLG61-SNCA для експресії химерного конструкту SNCA-EGFP

Наявність химерної форми α -синуклеїну, злитого з GFP, у клітинах штамів-трансформантів детектували за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Аналіз усіх модельних штамів не виявив агрегатів флуоресцентно міченого α -синуклеїну. Проте була добре помітною цитозольна локалізація розчинного химерного білка, імовірно за все, в олігомерній формі (рис. 2).

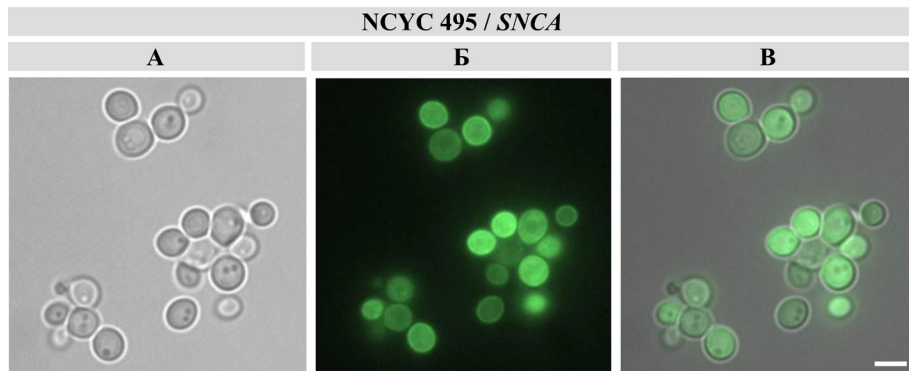


Рис. 2. Візуалізація α -синуклеїну людини, злитого із зеленим флуоресцентним білком (GFP), у рекомбінатного штаму *H. polymorpha* NCYC 495 / SNCA: **А** – світлова мікроскопія; **Б** – флуоресцентна мікроскопія; **В** – накладання зображень світлової та флуоресцентної мікроскопії. Відрізок на рисунку відповідає 2 мкм. Умови мікроскопічних досліджень описано у розділі «Матеріали та методи»

Трансформанти були поділені на умовні групи, відповідно до інтенсивності флуоресцентного сигналу (дані не наведено). Оскільки патологія дофамінергічних нейронів чорної субстанції середнього мозку у разі хвороби Паркінсона розвивається на тлі надсинтезу α -синуклеїну, в подальшій роботі використовували штами, отримані на середовищі з високою (2 г/л) концентрацією генетицину, які характеризувалися підвищеною флуоресценцією химерного α -синуклеїну в цитозолі (рис. 2).

Наявність білка α -синуклеїну людини у клітинах дріжджів також була підтверджена методом Вестерн-блот аналізу (рис. 3). Використовуючи антитіла до α -синуклеїну,

було встановлено, що рівні синтезу цього гетерологічного білка в отриманих нами трансформантів, резистентних до високих концентрацій генетицину, практично не відрізнялися.

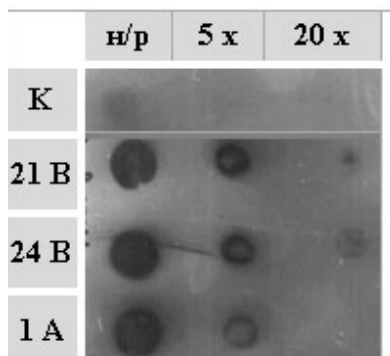


Рис. 3. Вестерн дот-блот аналіз ТХО-екстрактів вибірки трансформантів вектором pGLG61-SNCA. Умовні позначення: н/р – нерозведений безклітинний екстракт, 10× – 10-кратне розведення; 50× – 50-кратне розведення; К – штаму NCYC 495 pr; 1 А, 21 В, 24 В – трансформанти штаму NCYC 495 pr

Культуру відібраного модельного штаму *H. polymorpha* (24 В (далі NCYC 495 / SNCA), який гетерологічно експресував ген людського α -синуклеїну, для подальших експериментів синхронізували шляхом серійних пасажів (кожні 12 год культивування) у рідкому багатому середовищі YPS.

Вплив α -синуклеїну людини на ростові характеристики штамів *H. polymorpha* на середовищах із різною концентрацією глюкози

Перше моделювання молекулярних процесів, притаманних хворобі Паркінсона, у клітинах дріжджів було здійснено на *S. cerevisiae* [13, 15]. Саме в цій гетерологічній системі вперше було з'ясовано, що, залежно від генотипу штамів, які використовували для експресії SNCA, α -синуклеїн міг перебувати в різних станах: розчинному, асоційованому з мембранами та у вигляді цитозольних агрегатів. Окрім цього, було встановлено, що синтез α -синуклеїну у клітинах модельних штамів дріжджів міг негативно впливати на ростові характеристики культури або зовсім не чинити токсичного ефекту на клітини штаму-хазіяна [7].

З огляду на це нами було проведено аналіз життєздатності отриманих модельних штамів *H. polymorpha*, які гетерологічно експресують ген α -синуклеїну людини, на мінеральному середовищі з 1 % глюкози як джерелом карбону. Життєздатність клітин оцінювали за допомогою етидію броміду (BrEt), який додавали до суспензії клітин (рис. 4).

Відомо, що під дією ультрафіолету BrEt яскраво флуоресцює в червоно-оранжевому діапазоні. При зв'язуванні цієї сполуки з ДНК інтенсивність флуоресценції збільшується приблизно у 20 разів. У разі загибелі клітини ядро руйнується і ДНК опиняється в цитозолі, де легко може взаємодіяти з барвником, який проникає крізь плазматичну мембрану. Нами встановлено, що на 18 год культивування модельного та контрольного штамів у середовищі з 1 % глюкозою частка клітин штаму NCYC 495 / SNCA, у яких бромистий етидій зв'язувався з ДНК, була значно вищою порівняно зі штамом дикого типу, що свідчить про виражений токсичний ефект α -синуклеїну. Отримані результати були підтверджені кінетиками росту рідких культур досліджуваних штамів. Штаму NCYC 495 / SNCA трохи відставав у логарифмічній фазі росту порівняно з культурою штаму дикого типу (рис. 5).

Відомо, що гіпо- та гіперглікемія є негативними чинниками щодо функціонування головного мозку людини. Дослідження, проведені на початку 1990-х, виявили, що у хворих із набутою хворобою Альцгеймера глюкозозалежний синтез АТФ і метаболізм глюкози пригнічуються на 50 %, тоді як дефіцит енергії становить приблизно 20 % [12]. Таке зниження інтенсивності метаболізму глюкози прогресивно відбувається упродовж розвитку цього нейродегенеративного захворювання. Є дані, що нестача глюкози зменшує внутрішньоклітинний рівень НАДФН у культурі астроцитів і продукування оксиду

нітрогену (NO). НАДФН є головним відновним еквівалентом, задіяним в антиоксидантному захисті, тому дефіцит цієї сполуки підвищує ризик розвитку оксидативного стресу і, як наслідок, аномальну посттрансляційну модифікацію α -синуклеїну, що призводить до його агрегації й утворення амілоїдів [5]. Тому одним із наших завдань було дослідити вплив дефіциту глюкози на фізіологічний стан клітин *H. polymorpha*, в яких продукується α -синуклеїн людини.

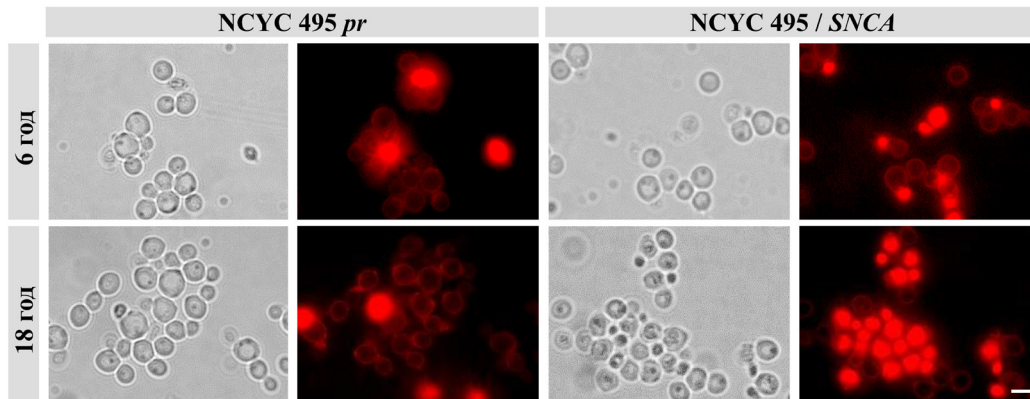


Рис. 4. Флуоресцентні мікрофотографії вирощених на середовищі з 1 % глюкози клітин *H. polymorpha* NCYC 495 *pr* (дикого типу) та модельного штаму NCYC 495 / *SNCA*, інкубованих з етидієм бромідом, як описано у розділі «Матеріали та методи». Відрізок на рисунку відповідає 2 мкм

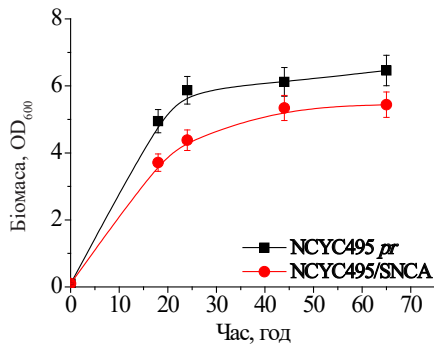


Рис. 5. Кінетики росту штамів *H. polymorpha* NCYC 495 *pr* і NCYC 495 / *SNCA* на середовищі з 1 % глюкози як джерелом карбону

Для моделювання умов гіпоглікемії та зниженого рівня глюкозозалежного синтезу АТФ у клітинах модельних штамів *H. polymorpha* було використане середовище із 0,1 % глюкози. Додавання 1 % глюкози у культуральне середовище відповідало стандартним умовам культивуванням дріжджів і забезпечувало фізіологічні умови для модельних штамів – продуцентів α -синуклеїну. Попередньо синхронізовані на багатому культуральному середовищі (YPS) клітини контрольного і модельного штамів перенесли у мінеральне середовище з 0,1 і 1 % глюкози. В умовах культивування на YPS у клітин штаму NCYC 495 / *SNCA* флуоресцентний сигнал химерного білка GFP- α -синуклеїн не детектувався, тоді як через 6 год росту на мінеральному середовищі з 0,1 і 1 % глюкози практично в усіх клітинах модельного штаму можна було візуалізувати цільовий білок. Встановлено, що на 18 год інкубації кількість клітин штаму NCYC 495 / *SNCA*, в яких детектувався флуоресцентно-мічений α -синуклеїн, зменшувалася в умовах росту як на середовищі з низькою концентрацією глюкози (0,1 %), так і на середовищі з 1 % глюкози, однак більш виражено за низької концентрації карбонового субстрату (рис. 6). Слід зазначити, що у разі вирощування модельного штаму в середовищі з низькою концентрацією глюкози значно зменшувалася не лише кількість клітин, у яких візуалізувався α -синуклеїн, але й кіль-

кість живих клітин загалом. Для NCYC 495 / *SNCA* було також характерне відставання в рості (дані не наведені) порівняно з контрольним штамом NCYC 495 *pr*, подібно до того, як це відбувалось у разі вирощування цих штамів на середовищі з 1 % глюкози (рис. 5). Зменшення кількості клітин штаму NCYC 495 / *SNCA* та втрата флуоресцентного сигналу вказує на одночасний перебіг двох процесів: загибель клітин модельного штаму внаслідок цитотоксичного впливу людського білка α -синуклеїну та деградацію цього білка в живих клітинах. Низький приріст біомаси на середовищі з 0,1 % глюкози спостерігався в обох штамів (контрольного та модельного).

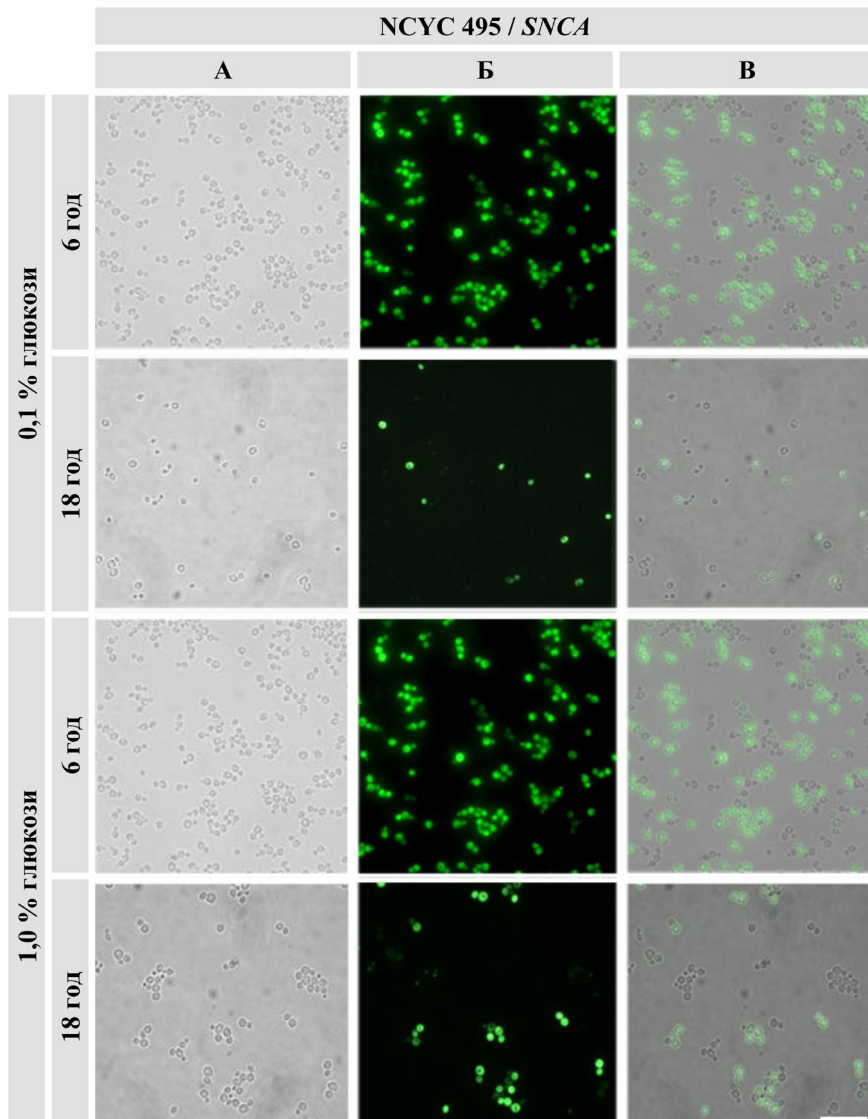


Рис. 6. Вплив різних концентрацій (0,1 та 1 %) глюкози в культуральному середовищі на проліферативну активність модельного штаму *H. polymorpha* NCYC495 / *SNCA*: А – світлова мікроскопія; Б – флуоресцентна мікроскопія; В – накладання мікрофотографій світлової та флуоресцентної мікроскопії. Відрізок на рисунку відповідає 10 мкм

Отримані результати попередньо свідчать про подібний цитотоксичний вплив людського α -синуклеїну на клітини модельних штамів дріжджів за умов культивування в середовищі з нормальним і низьким вмістом глюкози. Варто зазначити, що кумулятивний ефект дефіциту глюкози та наявності α -синуклеїну у клітинах дріжджів був не настільки вираженим, як очікувалось. Ймовірно, короткотривале культивування модельного штаму *H. polymorpha* NCYC 495 / *SNCA* в умовах дефіциту глюкози було недостатнім для вираженого ефекту. У наших подальших дослідженнях буде вивчено вплив дефіциту екзогенної глюкози на клітини NCYC 495 / *SNCA* при триваліших експозиціях і за умов альтернативних способів модуляції енергетичного метаболізму клітин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system Product Booklet Codes: RPN2106/8/9 RPN2209 RPN2134.
2. Blesa J., Trigo-Damas I., Quiroga-Varela A., Jackson-Lewis V. R. Oxidative stress and Parkinson's disease // *Front. Neuroanat.* 2015. doi: 10.3389/fnana.2015.00091.
3. Chong Y. T., Cox M. J., Andrews B. Proteome-wide screens in *Saccharomyces cerevisiae* using the yeast GFP collection // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012. Vol. 736. P. 169-178. doi: 10.1007/978-1-4419-7210-1_8.
4. Denega I. O., Klymyshyn N. I., Sybirna N. O., et al. Modeling of molecular processes underlying Parkinson's disease in cells of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // *Біологічні студії/Studia Biologica.* 2014. Vol. 8. N 2. P. 5-16.
5. Dias V., Junn E., and Mouradian M. M. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease // *J. Parkinsons Dis.* 2013. V. 3. N 4. P. 461-491. doi: 10.3233/JPD-130230.
6. Faber K. N., Haima P., Harder W., et al. Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha* // *Curr. Genet.* 1994. Vol. 25. P. 305-310.
7. Franssens V., Boelen E., Anandhakumar J., et al. Yeast unfolds the road map toward alpha-synuclein-induced cell death // *Cell Death Differ.* 2010. Vol. 17. N 5. P. 746-153. doi: 10.1038/cdd.2009.203.
8. Kachroo A. H., Laurent J. M., Yellman C. M., et al. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity // *Science.* 2015. Vol. 348. I. 6237. P. 921-925. doi: 10.1126/science.aaa0769.
9. Menezes R., Tenreiro S., Macedo D., et al. From the baker to the bedside: yeast models of Parkinson's disease // *Microbial Cell.* 2015. Vol. 2. No. 8. P. 262 - 279. 2.
10. Mohammadi S., Saberidokht B., Subramaniam S., Grama A. Scope and limitations of yeast as a model organism for studying human tissue-specific pathways // *BMC Systems Biology.* 2015. doi: 10.1186/s12918-015-0253-0.
11. Sambrook J., Russel D. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. // Cold Spring Harb. Labor. 2001. Vol. 3. 510 p.
12. Schubert D. Glucose metabolism and Alzheimer's disease // *Ageing Research Reviews.* 2005. Vol. 4. I. 2. P. 240-257.
13. Sharma N., Brandis K. A., Herrera S. K., et al. alpha-Synuclein budding yeast model: toxicity enhanced by impaired proteasome and oxidative stress // *J. Mol. Neurosci.* 2006. Vol. 28. N 2. P. 161-178.
14. Stefanis L. α -Synuclein in Parkinson's Disease // *Cold Spring. Perspect. Med.* 2012. V. 2. N 2. a009399. doi: 10.1101/cshperspect.a009399.
15. Witt S. N., Flower T. R. alpha-Synuclein, oxidative stress and apoptosis from the perspective of a yeast model of Parkinson's disease // *FEMS Yeast Res.* 2006. Vol. 6. N 8. P. 1107-1116.

**ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ГЛЮКОЗЫ
НА ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ А-СИНУКЛЕИНА ЧЕЛОВЕКА В МОДЕЛЬНЫХ
ШТАММАХ ДРОЖЖЕЙ *HANSENULA POLYMORPHA*****О. Стасык^{1,2}, О. Романишин¹, И. Денега¹, Н. Клымышин¹, О. Стасык²**¹ Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина² Институт биологии клетки НАН Украины
ул. Драгоманова, 14/16, Львов 79005, Украина
e-mail: olenastasyk@gmail.com

Для моделирования процессов, характерных нейронам при болезни Паркинсона, был сконструирован вектор pGLG61-*SNCA* для экспрессии в клетках дрожжей *Hansenula polymorpha* химерного конструкта *SNCA-GFP*, состоящий из последовательности гена человеческого α -синуклеина (*SNCA*), слитого с геном зеленого флуоресцентного белка (*yEGFP*). Поскольку патология дофаминергических нейронов черной субстанции среднего мозга при болезни Паркинсона часто развивается на фоне избыточного синтеза α -синуклеина, в работе использовали штаммы – мультикопийные интегранты, отобранные по устойчивости к генетицину, которые характеризовались повышенной флуоресценцией меченого GFP α -синуклеина в цитозоле. Установлено, что в среде с 1 % глюкозы (физиологические условия культивирования дрожжей) доля мертвых клеток штамма NCYC495 / *SNCA* была заметно выше по сравнению со штаммом дикого типа, что свидетельствует о токсическом эффекте гетерологической экспрессии гена α -синуклеина. Полученные результаты были подтверждены кинетиками роста исследуемых штаммов в жидкой культуре. Для моделирования условий гипогликемии в клетках *H. polymorpha* использовали среду с 0,1 % глюкозы. Установлено, что количество клеток штамма NCYC495 / *SNCA*, в которых детектировался флуоресцентно-меченый α -синуклеин, в первые 18 ч культивирования быстрее уменьшалась на среде с низкой концентрацией глюкозы (0,1 %) по сравнению с клетками, выращенными на среде с высокой концентрацией глюкозы (1 %), что сопровождалось прогрессивной гибелью клеток. Полученные данные свидетельствуют об эффективности избранной модели для исследования влияния различных экзогенных факторов и цитотоксичности α -синуклеина человека.

Ключевые слова: α -синуклеин, *Hansenula polymorpha*, болезнь Паркинсона.

**INFLUENCE OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF EXTRACELLULAR
GLUCOSE ON CYTOTOXICITY OF HUMAN α -SYNUCLEIN IN MODEL
STRAINS OF THE YEAST *HANSENULA POLYMORPHA***

O. Stasyk^{1,2}, A. Romanyshyn¹, I. Denega^{1,2}, N. Klymyshyn¹, O. Stasyk²

¹ *Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine*

² *Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine
14/16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: olenastasyk@gmail.com*

For modeling of typical for neurons processes underlying Parkinson's disease, vector pGLG61-*SNCA* for expression of hybrid construct *SNCA-GFP* in yeast cells *Hansenula polymorpha* was designed. This construct consists of the gene sequence of the human α -synuclein (*SNCA*) fused with gene of green fluorescent protein (*yEGFP*). The pathology of dopaminergic neurons of the *substantia nigra* in the midbrain of patients with Parkinson's disease frequently results from α -synuclein oversynthesis. Therefore, in our study we used multicopy yeast transformants, isolated on the medium with high concentration of geneticine as a selectable marker and exhibiting elevated fluorescence of GFP-tagged α -synuclein in the cytosol. It was found that in a medium with 1 % glucose (physiological conditions for yeast culture), the proportion of dead cells of the strain NCYC495 / *SNCA* was significantly higher compared to the wild-type strain, indicating the toxic effect of α -synuclein. These results were confirmed by growth kinetics of the tested strains in liquid culture. To simulate the conditions of a hypoglycemia in the cells of *H. polymorpha* model strains, medium with 0.1 % glucose was used. It was observed that the number of cells of the strain NCYC 495 / *SNCA*, in which the fluorescently-labeled α -synuclein was detected, decreased more significantly in the first 18 hours of cultivation in the medium with low glucose concentrations (0.1 %) relative to cells grown in the medium with 1 % glucose, what was concomitantly accompanied by progressive cell death. The obtained results suggest the suitability of the chosen cell model for the studies on the effect of various exogenous factors on cytotoxicity of α -synuclein.

Keywords: α -synuclein, *Hansenula polymorpha*, Parkinson's disease.