

ВЛИЯНИЕ КРАСНОГО ПИГМЕНТА ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* НА ПРОЯВЛЕНИЕ КЛОНИРОВАННОГО α -СИНУКЛЕИНА ЧЕЛОВЕКА

**© О. В. Невзглядова, А. В. Артемов, Е. В. Михайлова, О. Г. Люблинская,
Ю. Э. Озерова, П. А. Иванова, Е. И. Костылева, Т. Р. Сойдла¹**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

¹ электронный адрес: soidla39@gmail.com

На модели двух трансгенных штаммов дрожжей с разными формами α -синуклеина человека изучали влияние красного пигмента, который, как было нами ранее показано, обладает противоамилоидным действием. Эндогенный пигмент, вырабатываемый в определенных условиях непосредственно в клетках изучаемых штаммов благодаря мутации *ade1*, подавляет проявление гибридного белка α -синуклеин-GFP. Это выражается в понижении средней величины флуоресценции GFP, а также доли клеток, накапливающих α -синуклеиновые цитоплазматические включения. Все формы выделенного и очищенного экзогенного пигмента, а именно природная, гидролизованная природная и синтетическая, отличаются от эндогенного по своему воздействию на α -синуклеин. Экзогенный пигмент вызывает увеличение доли клеток, флуоресцирующих за счет GFP, и количества клеток с цитоплазматическими включениями. Однако как эндогенный, так и экзогенный пигменты снижают токсичность α -синуклеина и приводят к перераспределению его содержания в клетке — количество α -синуклеина становится меньше в осадках клеточных лизатов и увеличивается в супернатанте.

Ключевые слова: амилоид, α -синуклеин, красный пигмент дрожжей.

Принятые сокращения: Pig⁺ и Pig⁻ — наличие и отсутствие красного пигмента соответственно, г и w — красные и белые клетки соответственно, GFP⁺ — наличие флуоресценции за счет GFP (green fluorescent protein), PI⁺ — наличие окраски иодистым пропидием, Mn — средняя величина флуоресценции GFP⁺-клеток, MeAIR — синтетический красный пигмент, P0 и P1 — фракции экзогенного красного пигмента, RHyd — гидролизованная форма пигмента P1.

Актуальной проблемой в медицине является борьба с неправильной укладкой белков и их агрегацией. Отложение в тканях амилоидных агрегатов — диагностический признак ряда патологий, в том числе болезней Альцгеймера и Паркинсона (Alberti, 2012). Это наиболее распространенная группа заболеваний в Европе и США, доля которой в общей картине заболеваний со временем только увеличивается. Наибольшая проблема состоит в том, что в настоящее время эффективных препаратов, способных предотвратить накопление амилоидных отложений, еще нет, а лечение носит чисто паллиативный характер.

По распространенности болезнь Паркинсона находится на втором месте после болезни Альцгеймера. Ею страдает около 1—2 % популяции людей в возрасте свыше 65 лет в промышленно развитых странах (Вишневская и др., 2007; Corti et al., 2011). Но и в популяции людей в целом эта доля достаточно высока (0.3 %), а среди людей, достигших 80-летнего возраста, доходит до 3—4 %. Болезнь Паркинсона приводит к ограничению моторной активности (бронхикизия), ригидности скелетных мышц лица и рук и их дрожанию в состоянии покоя. Болезнь была известна еще в древней Индии под названием Кампавата. В 1817 г. Джемс Паркинсон описал 6 случаев этой болезни. После длительного забвения его работа была за-

мечена известным неврологом Шарко, который и присвоил этому заболеванию название болезни Паркинсона.

При данном заболевании происходит преимущественная гибель дофаминергических нейронов черного тела (substantia nigra), а точнее, substantia nigra pars compacta (SNpc) (Wales et al., 2013). В оставшихся нейронах происходит накопление цитоплазматических включений, или «тельца Леви», названных так К. Т. Третьяковым в честь д-ра Фрица Леви (сотрудника проф. Альцгеймера), впервые описавшего эти структуры (Goedert et al., 2013). Показано, что в тельцах Леви у больных паркинсонизмом накапливается большое количество белка α -синуклеина в агрегированной фибриллярной форме (Spillantini et al., 1997, 1998; Baba et al., 1998). Кроме того, передача α -синуклеиновой патологии между нейронами позволяет говорить о том, что болезнь Паркинсона обладает некоторыми признаками прионового заболевания (Prusiner, 2013; Goedert, 2015).

В неагрегированном состоянии, т. е. в норме, этот 140-аминокислотный белок обладает нейропротекторными свойствами. Он локализован в пресинаптических нервных окончаниях, а в ряде случаях и в ядрах нейронов. Основная его функция состоит в регуляции освобождения нейромедиаторов, обеспечивающих нейронную трансмиссию, прохождение нервного сигнала. Агрегация

α -синуклеина играет важную роль в патогенезе болезни Паркинсона (нервные клетки, в которых индуцируется нейромедиатор дофамин, повреждаются накоплением амилоидного α -синуклеина) и подробно рассмотрена в авторитетных обзорных работах (Breydo et al., 2012; Stefanis, 2012; Wales et al., 2013).

В результате многочисленных исследований достигнут консенсус относительно патогенеза заболевания: α -синуклеин образует сначала растворимые олигомеры разной формы (протофибриллы), которые затем теряют растворимость и сливаются в амилоидные фибрillы структур Леви. Этот процесс является основным патогенным фактором, обусловленным α -синуклеином, и считается самой перспективной мишенью для терапевтических агентов, разрабатываемых против болезни Паркинсона (Stefanis, 2012).

Так, многочисленными исследованиями показано, что прием L-дофамина (леводопы) помогает больным Паркинсона, что, однако, не останавливает развития болезни. Клинические испытания нескольких десятков веществ также не обнаружили среди них ни одного перспективного с точки зрения медицинской практики (Racette, Willis, 2015).

Одной из популярных моделей для отбора агентов, влияющих на агрегирование и амилоидизацию α -синуклеина, являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* с клонированным геном α -синуклеина человека (Outeiro, Lindquist, 2003). Экспрессированный в дрожжах α -синуклеин формирует цитоплазматические включения, похожие на тельца Леви у высших. Показано, что образование и агрегация цитоплазматических везикул под действие α -синуклеина действительно аналогичны образованию телец Леви у высших организмов, страдающих болезнью Паркинсона (Soper et al., 2008). Дрожжевая модель паркинсонизма считается одной из самых адекватных и перспективных (Franssens et al., 2010; Breydo et al., 2013).

Основой создания используемой в нашей работе модели послужил тот факт, что в ряде наследуемых случаев мультипликация локуса α -синуклеина и, следовательно, его сверхпродукция вызывает болезнь Паркинсона. Это явление используется для изучения механизмов патогенеза. В качестве модельного организма выбраны дрожжи *S. cerevisiae*, в которые была интегрирована плазмида с двумя рекомбинантными генами α Syn-GFP, ответственными за синтез как α -синуклеина, так и флуоресцирующего зеленого белка (GFP) (Outeiro, Lindquist, 2003; Miller-Fleming et al., 2008; Tenreiro, Outeiro, 2010; Tenreiro et al., 2013). В результате синтеза гибридного белка α Syn-GFP есть возможность отслеживать накопление и состояние α -синуклеина в живой клетке под люминесцентным микроскопом. Генам, отвечающим за синтез гибридного белка, предшествует индуцильный галактозный промотор (GAL1p), благодаря чему синтез гибридного белка запускается в присутствии галактозы, и отсутствует, когда дрожжи выращиваются на других источниках углерода, рафинозе или глукозе.

Авторы сконструированных таким образом штаммов предоставили их нам для дальнейшей работы. Ранее в группе генетики митоза при Лаборатории структурной динамики, стабильности и фолдинга белков Института цитологии РАН изучали действие на амилоидогенез красного пигmenta, который вырабатывался в дрожжевых клетках при наличии мутаций в генах *ADE1* и *ADE2*. Хотя красный пигмент был выделен и химически охарактери-

зован как полимер аминоамидалориботида еще в 1967 г. (Smirnov et al., 1967), его чрезвычайно полезное и важное с точки зрения воздействия на амилоиды свойство исследовано только в последние годы. В нашей лаборатории показано, что красный пигмент способен тормозить агрегирование и амилоидизацию целого ряда клеточных белков как *in vitro*, так и *in vivo*, в частности дрожжевого приона [PSI⁺], а также экспрессируемого в дрожжах β -амилоида человека, играющего важную роль в патогенезе болезни Альцгеймера (Михайлова и др., 2011; Nevzglyadova et al., 2011; Амен и др., 2012). Было показано также, что красный пигмент снижает нейродегенеративные изменения, нормализует поведенческие реакции и улучшает память у трансгенных линий дрозофил, получающих в пищу красные дрожжи (Nevzglyadova et al., 2015).

В настоящей работе мы применили модель дрожжевых клеток, трансформированных α -синуклеином человека, сшитого с GFP (α Syn-GFP), для изучения экспрессии и агрегации этого рекомбинантного белка при воздействии эндогенного или экзогенного красного пигmenta.

Материал и методика

Дрожжевые штаммы и условия их культивирования. Линии VSY71, VSY72 и VSY73 любезно предоставлены д-ром Тиаго Оутерио из Института молекулярной медицины медицинского факультета Лиссабонского университета (Португалия). Они сконструированы на основе штамма W303-1A (*MAT a can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 ade2-1*). Штамм VSY71 (W303-1A *trp1-1::pRS304 TRP1+ ura3-1::pRS306 URA3+*) содержит две интегрированные копии вектора pRS304. Он служит контролем к штаммам VSY72 и VSY73. Штамм VSY72 несет две копии клонированной нуклеотидной последовательности, кодирующей α -синуклеин человека, или синуклеин дикого типа (W303-1A *trp1-1::pRS304 GAL1pr-SNCA(WT)-GFP TRP1+ ura3-1::pRS306 GAL1pr-SNCA(WT)-GFP::URA3+*). Штамм VSY73 имеет мутацию S129A, приводящую к дефосфорилированию аминокислоты в положении 129 (W303-1A *trp1-1::pRS304 GAL1pr-SNCA(S129A)-GFP TRP1+ ura3-1::pRS306 GAL1pr-SNCA(S129A)-GFP::URA3+*). Ген α -синуклеина в обоих случаях находится под контролем промотора GAL1 и слит с последовательностью, кодирующей GFP. Использованы описанные среды для культивирования и методы манипулирования с дрожжами (Sherman et al., 1986). Для индукции α -синуклеина использовали селективную среду, содержащую 2 % галактозы. Среда, на которой α -синуклеин не индуцировался, содержала 2 % рафинозы.

Выделение и модификация красного пигmenta дрожжей. Пигмент выделяли из штамма 23S (*MATa ade2*), любезно предоставленного А. Зехновым (С.-Петербургский государственный университет). Выделение производили по описанной методике (Smirnov et al., 1967) с модификациями (Nevzglyadova et al., 2011). В разных экспериментах к штаммам с клонированным α -синуклеином добавляли либо природный пигмент P, точнее его модифицированные варианты — формы P0 и P1, полученные при элюции пигmenta 0.1 M HCl с DEAE-сепарозой (сначала выходит более щелочная фракция P0, не нуждающаяся в последующей нейтрализации, а затем

фракция P1 с пониженным значением pH, которую мы нейтрализуем перед тем, как очищать на колонке с сефадексом). Кроме того, использовали пигмент Phyd, полученный в результате кислотного гидролиза P, и его синтетический аналог MeAIR. Подробно получение разных форм красного пигмента описано ранее (Амен и др., 2012). Чтобы иметь возможность сравнивать действие разных форм пигмента, мы приблизительно выравнивали их по концентрации и использовали в опытах 0.05 М водные растворы. Выровнять точно их не удается, так как пигмент представляет собой набор гетерогенных по величине полимеров AIR с присоединенными к ним аминокислотами. Рост культуры контролировали с помощью спектрофотометра по изменению оптической плотности при 660 нм (ОД₆₆₀).

Проточная цитофлуорометрия. Оценивали 3 параметра: долю GFP⁺-клеток, среднюю интенсивность флуоресценции GFP⁺-клеток (величину Mn) и долю погибших (PI⁺) клеток. Анализ проводили на цитометре Coulter EPICS XL (Beckman Coulter, США), оснащенном аргоновым лазером (длина волны излучения 488 нм), при максимальной скорости подачи образца 1 мкл/с. Для выявления погибших клеток использовали иодистый пропидий (PI) — флуоресцентный краситель, проникающий в мертвые клетки и не окрашивающий живые (Tenreiro et al., 2014b). Долю (%) погибших клеток оценивали при анализе двухмерных гистограмм, отображающих флуоресценцию GFP против флуоресценции PI.

Микроскопия. Количество клеток с цитоплазматическими включениями гибридного белка α Syn-GFP подсчитывали под люминесцентным микроскопом Axiovert Zoom (Zeiss, Германия), используя объектив 40×/0.75, фильтр E10 и камеру DFC 420c, 2592 × 1944. В каждом независимом эксперименте (4—8 повторностей) просчитывали около 500 клеток.

Получение фракций осадочных и супернатантных белков из клеточных лизатов. Дрожжевые культуры выращивали на агаризованной или жидкой селективной среде в течение 5 или 2.5 сут соответственно. Методы получения грубых клеточных лизатов и разделения фракций после центрифugирования лизатов при 1000 g подробно изложен ранее (Nevzglyadova et al., 2015). После получения двух фракций лизатов супернатант переосаждали этиловым спиртом при -20 °C в течение 12 ч. Для экстракции белков из фракций использовали разные буферы в зависимости от цели эксперимента. Для количественного измерения амилоида по интенсивности флуоресценции тиофлавина Т осадки ресуспендировали в натриево-глициновом буфере (70 mM NaOH и 130 mM глицина). Тиофлавин Т добавляли, как описано ранее (Nevzglyadova et al., 2009). Для подготовки проб к Вестерн-блотингу осадки ресуспендировали в буфере, содержащем 5 % SDS, 0.15 M ТрисHCl и 50 mM DTT, pH 6.8 (Laemmli, 1970).

Электрофорез и Вестерн-блотинг. Белки из разных фракций грубых лизатов разделяли в 10%-ном SDS-ПААГ (Laemmli, 1970) и переносили на мембрану PVDF (Biorad, Hercules, США), смоченную буфером Тобутина (25 mM Трис-HCl, 192 mM глицина и 20 % метанола, pH 8.3) (Towbin et al., 1979), одновременно с предокрашенными маркерными белками BLUeye (GeneDireX, США). α -Синуклеин детектировали с помощью первичных (Anti-alpha synuclein antibody MJFR1) и вторичных (Goat anti-rabbit IgG H&L (HRP) антител (ab138501 и ab6721 соответственно; Abcam, США)).

Все эксперименты проводили не менее чем в трех повторностях. Результаты выражали средними значениями с доверительным интервалом при уровне значимости $p < 0.05$.

Результаты

Влияние эндогенного пигмента дрожжей на проявление α -синуклеина в штаммах VSY72 и VSY73. Для изучения действия эндогенного красного пигмента использовали селективные агаризованные среды, содержащие аденин в разной концентрации. При концентрации 10 мг/л в дрожжах в течение нескольких суток накапливается красный пигмент. Контролем служили производные тех же штаммов, выращенные на средах с концентрацией аденинина 100 мг/л.

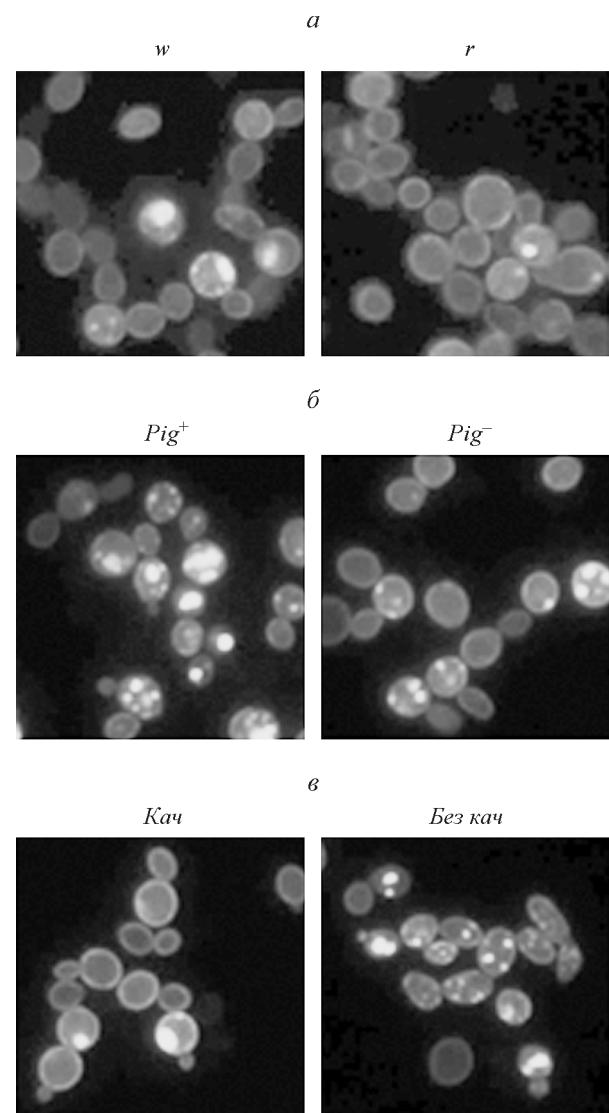


Рис. 1. Формирование клеточных включений α -синуклеина у дрожжей штамма VSY73 под действием эндогенного пигмента (a), экзогенного пигмента P1 (b) и при росте без качания (c). Здесь и на рис. 1 и 3: r — клетки, накапливающие красный пигмент; w — клетки белого цвета; Pig^+ — клетки, при росте которых в среду добавили производное красного пигмента P1; Pig^- — контрольные клетки, росшие без добавления красного пигмента; Кач и Без кач — контрольные клетки, росшие при качании и без качания соответственно.

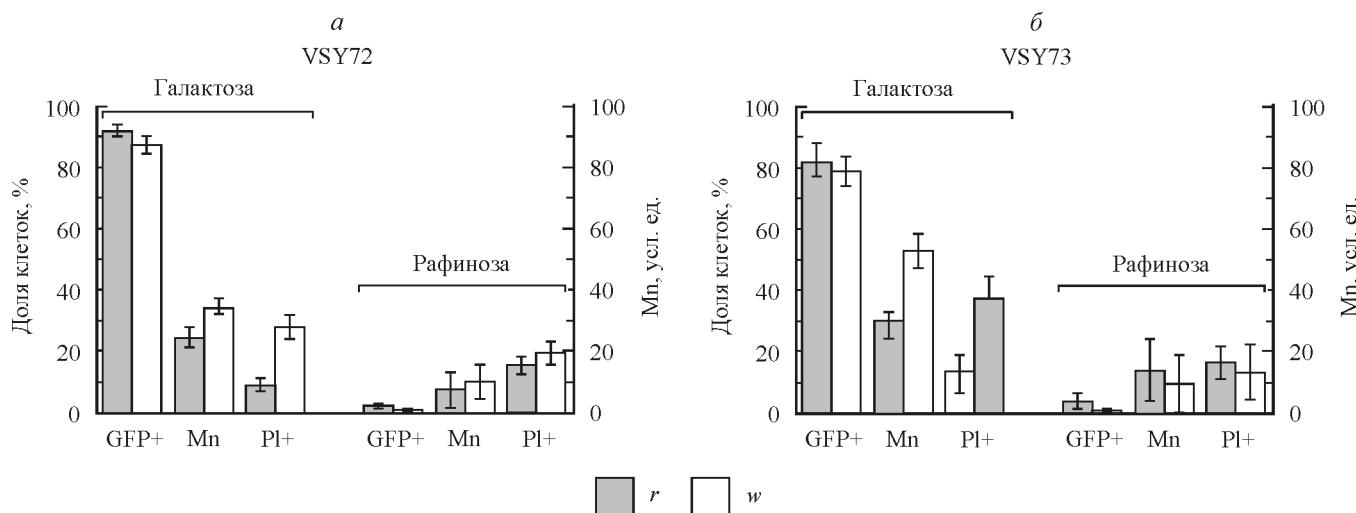


Рис. 2. Влияние эндогенного пигмента на средний уровень флуоресценции (Mn), долю флуоресцирующих (GFP⁺) и мертвых (PI⁺) клеток у штаммов VSY72 (а) и VSY73 (б) при росте на селективных средах в течение 5 сут.

Выращенные на агаризованных селективных средах с разной концентрацией аденина культуры VSY72 и VSY73 спустя несколько суток образуют клоны белого и красного цветов. За 5–6 сут на чашках со сниженной концентрацией аденина клетки накапливают красный пигмент, в то время как при повышенной концентрации аденина клетки остаются белыми. Это дает возможность сравнить красные клетки Pig⁺ (r) и белые клетки Pig⁻ (w) по количеству видимых под люминесцентным микроскопом цитоплазматических α -синуклеиновых включений (агрегатов). Метод проточной цитофлуорометрии позволяет оценить долю GFP⁺-клеток, среднюю величину их флуоресценции (Mn) и долю погибших клеток (PI⁺).

Оказалось, что красный пигмент препятствует образованию агрегатов α -синуклеина у обоих штаммов. Если в условиях индукции α -синуклеина (при росте на галактозе) белые производные штаммов спустя 5–6 сут формируют включения в 10 и 20 % клеток (для VSY72 и VSY73 соответственно), то для красных производных доля клеток с включениями снижается до 0.5 и 3 % соответственно (рис. 1, а).

Для штаммов VSY72 и VSY73, выращенных в условиях индукции α -синуклеина, показаны различия между клетками Pig⁺ и Pig⁻ по среднему уровню флуоресценции GFP и по доле погибших клеток (рис. 2, а). Накопление пигмента у дрожжевых клеток, вступивших в стационарную fazу роста, снижает оба показателя. Если же сравнивать клетки r и w, выращенные на рафинозе в отсутствие индукции α -синуклеина, значение Mn и доля мертвых клеток оказываются сниженными и при этом не различаются (рис. 2).

Сравнение белых производных штаммов VSY72 и VSY73 в условиях индукции α -синуклеина показывает, что в штамме VSY73 значения Mn и доли мертвых PI⁺-клеток значительно выше. Если же сравнивать штаммы по Pig⁺-клеткам, то у обоих штаммов значения Mn и доля мертвых клеток одинаковы.

Мы постарались выяснить, как оказывается присутствие пигмента на размере агрегатов, который мы оцениваем по перераспределению клеточного амилоида между осадком и супернатантом, полученными из грубых лиза-

тов в условиях, когда α -синуклеин индуцируется и когда его индукция отсутствует.

Клетки обоих штаммов выращивали в течение 5 сут на селективной среде с галактозой или рафинозой. Клеточные грубые лизаты выравнивали по белку и центрифугировали при 1000 g в течение 30 мин. Далее изучали две полученные таким образом фракции: осадочные белки, включающие в себя агрегированные молекулы, и надосадочные белки сравнительно небольшой молекулярной массы. Окрашивание белков этих двух фракций флуоресцентным красителем тиофлавином T, специфически связывающимся с амилоидами, позволяет оценить их количество (рис. 3, а–г). У штамма VSY72 интенсивность флуоресценции осадочных белков из красных клеток оказалась ниже, чем у белых клеток, в то время как белки супернатантов различались противоположным образом (рис. 3, а). В клетках, выращенных на рафинозе (рис. 3, б), ни в одной из фракций белков различий между производными r и w не обнаружено. Аналогичные результаты получены на клетках штамма VSY73 (рис. 3, в, г). Это говорит о том, что количество амилоидов у производных r и w штаммов VSY72 и VSY73 в большой мере зависит от количества амилоидной формы клонированного α -синуклеина.

Более прямые данные о количестве α -синуклеина в присутствии и в отсутствие красного пигмента были получены в экспериментах с блот-гибридизацией. Белки из осадочной и супернатантной фракций, выделенные из красных и белых производных VSY72 и VSY73 и разделенные в ПААГ, гибридизировали с антителами к α -синуклеину. На рис. 3, д видно, что в обоих штаммах количество α -синуклеина в осадках (т. е. агрегированного α -синуклеина) в присутствии красного пигмента становится меньше, а неагрегированного (или агрегированного в слабой степени) и соответственно оказавшегося в супернатанте больше (рис. 3, е).

Влияние условий культивирования и действие экзогенного пигмента дрожжей на α -синуклеин. Мы постарались выяснить, как экзогенный красный пигмент влияет на проявление α -синуклеина в штаммах VSY72 и VSY73. Основная работа велась с природным пигментом, выделенным и охарактеризован-

ным, как описано ранее (Nevzglyadova et al., 2011). Однако представляло интерес сравнить его действие с двумя другими формами красного пигмента, молекулярная масса которых значительно меньше. Одну из этих форм получали с помощью кислотного гидролиза, а другая представляла собой синтетический красный пигмент, результат полимеризации аминоимидазолриботида (Амен и др., 2012).

Пигмент добавляли в жидкую синтетическую среду с галактозой одновременно с инокулятом. Предварительно мы отработали условия роста культур, при которых доля α -синуклеиновых включений была оптимальной для наших экспериментов. Для этого мы выращивали культуры в жидкой среде, которая образует монослой на дне флакона при 30 °C без качания. Спустя 12–20 ч в штамме VSY72 около 30 % клеток имеют α -синуклеиновые включения, в то время как у VSY73 их доля может превышать 60 % (рис. 1, б). Существенным при этом является количество клеток, внесенных при заражении. Клетки, сложившие инокулятом, выращивали на рафинозо- или глюкозосодержащей агаризованной среде в течение ночи. Значение ОД₆₆₀ инокулята приводили к 30 усл. ед. и брали по 3 мкл инокулята на 250 мкл галактозосодержащей синтетической среды.

На рис. 4 видно, что при наросте в монослое с качанием к 24 ч клетки всех трех штаммов практически достигают стационарной фазы роста. При этом культура VSY71, которая содержит векторную молекулу без последовательности, кодирующей α -синуклеин, растет почти одинаково с качанием и без качания. В то же время нарост у культур VSY72 и VSY73 идет значительно интенсивнее при качании, причем скорость роста этих штаммов отличается от контрольного VSY71 и различается между собой. Можно предположить, что эти различия связаны с разной способностью VSY72 и VSY73 накапливать α -синуклеиновые включения.

Мы постарались ответить на вопрос о том, есть ли положительная корреляция между накоплением включений и гибелю клеток в условиях роста штаммов VSY72 и VSY73 с качанием и без качания. Кроме того, с помощью проточной цитофлуорометрии оценивали экспрессию α -синуклеина, т. е. долю GFP⁺-клеток, а также величину Mn. Культуры выращивали в объеме синтетической жидкой среды 750 мкл с качанием и без качания. Показатели снимали через 6, 12, 24, 36 и 48 ч, отбирая по 60 мкл культур. Средние значения из 4 повторов эксперимента представлены графически на рис. 5. Сравнение по показателю Mn у штамма VSY72 свидетельствует о том, что в условиях качания несколько снижается среднее значение Mn в период роста 6–24 ч, а затем различия исчезают. Интересно, что в начале и в конце роста клетки обнаруживают практически одинаковое среднее свечение (около 40 усл. ед.). У штамма VSY73 расхождение выявляется только после 36 ч выращивания, причем качание, как и в случае VSY72, снижает показатель Mn (рис. 5, а, б). Следует отметить, что максимальная величина этого показателя у VSY73 значительно выше, чем у VSY72, при любых условиях роста.

Графики, отражающие временную динамику доли GFP⁺-клеток у штаммов VSY72 и VSY73, показывают, что доля таких клеток в целом больше у VSY72, чем у VSY73, в случае роста как с качанием, так и без качания (рис. 5, в, г). При этом начиная с 12 ч эта величина оказывается больше у клеток, растущих с качанием.

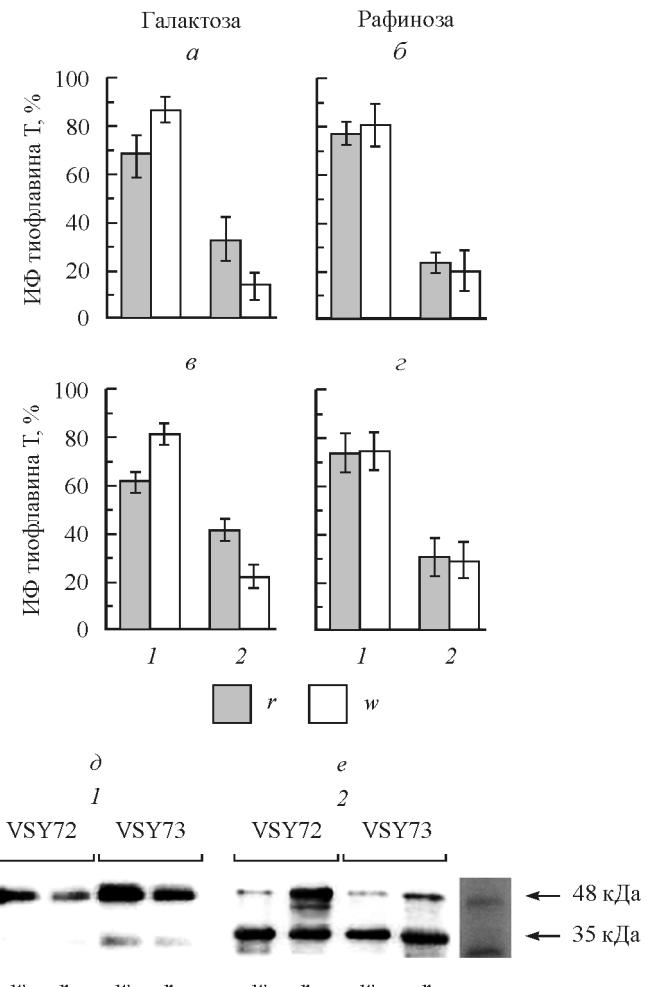


Рис. 3. Распределение амилоидов в осадках (1) и супернатантах (2) клеточных лизатов из r- и w-производных штаммов VSY72 (а, б) и VSY73 (в, г).
а — интенсивность флуоресценции (ИФ) тиофлавина Т при росте VSY72 на галактозе; б — то же на рафинозе; в — ИФ тиофлавина Т при росте VSY73 на галактозе; г — то же на рафинозе. Во всех вариантах доли осадка и супернатанта вычисляли относительно общего количества клеточных амилоидов; д, е — Вестерн-блотинг с антителами к α -синуклеину белков из фракций осадков (д) и супернатантов (е). Справа указаны маркеры молекулярных масс.

а — интенсивность флуоресценции (ИФ) тиофлавина Т при росте VSY72 на галактозе; б — то же на рафинозе; в — ИФ тиофлавина Т при росте VSY73 на галактозе; г — то же на рафинозе. Во всех вариантах доли осадка и супернатанта вычисляли относительно общего количества клеточных амилоидов; д, е — Вестерн-блотинг с антителами к α -синуклеину белков из фракций осадков (д) и супернатантов (е). Справа указаны маркеры молекулярных масс.

Доля клеток с агрегатами у VSY73 оказывается выше, чем VSY72 (рис. 5, д, е). В обоих штаммах доля клеток с агрегатами выше, когда культуры росли без качания.

Графики, иллюстрирующие изменение доли погибших клеток (рис. 5, ж, з), выявляют значительные различия между клетками, выращенными в разных условиях. В обоих штаммах рост без качания приводит к большей гибели клеток. Между собой клетки разных штаммов также различаются — клетки VSY73 гибнут чаще независимо от условий выращивания.

Интересно сопоставить, есть ли соответствие между постепенным возрастанием гибели клеток (рис. 5, ж, з) и доли включений (рис. 5, д, е), определяемой визуально через те же временные интервалы. Видно, что соответствие между повышением доли клеток с α -синуклеиновыми включениями и долей мертвых клеток наблюдается примерно до 12 ч, а далее доля включе-

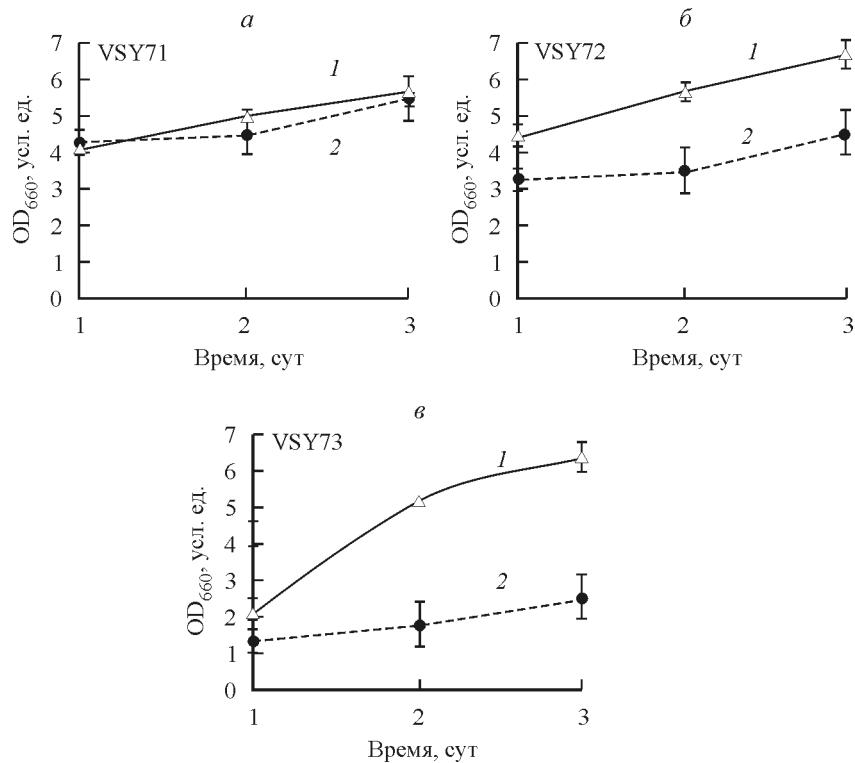


Рис. 4. Кривые роста клеток разных штаммов дрожжей в синтетической галактозо-содержащей жидкой среде в течение 3 сут с качанием (кривые 1) и без качания (кривые 2).

OD₆₆₀ — оптическая плотность суспензий.

ний падает, в то время как доля погибших клеток увеличивается.

Далее мы выясняли, сказываются ли условия выращивания клеток на накоплении ими амилоидов. Для этого клетки штамма VSY73 выращивали в течение 2.5 сут в жидкой галактозосодержащей селективной среде с качанием и без качания. После получения, выравнивания по белку и центрифугирования клеточных лизатов к суспендированным белкам осадков и супернатантов добавляли тиофлавин Т. Оценивали интенсивность флуоресценции красителя, связанного с амилоидными белками в обеих фракциях, а также долю амилоидов в процентах. Полученные результаты представлены на рис. 6, а, б. Доля амилоида в осадке лизата клеток VSY73, выращенных без качания, выше, чем у VSY73, выращенного с качанием. Можно предположить, что этот результат является следствием того, что качание препятствует накоплению агрегатов α -синуклеина (рис. 5, ж, з). Для подтверждения этого предположения мы провели blot-гибридизацию белков осадочной и супернатантной фракций с антителами к α -синуклеину. Как видно на рис. 6, б, качание уменьшает количество α -синуклеина в осадке и увеличивает в супернатанте.

Для изучения действия разных форм экзогенного красного пигмента (P0, P1, MeAIR) на агрегацию, экспрессию и токсичность клонированного α -синуклеина человека мы выращивали культуру в синтетической галактозосодержащей среде без качания в течение 2.5—3 сут. При этом пигмент добавляли в момент заражения. На рис. 7, а, б показано, как разные формы пигмента действуют на Mn α -Syn-GFP в штаммах VSY72 и VSY73. Об отличиях от контроля клеток VSY72 можно говорить в

двух случаях: P0 понижает, а MeAIR повышает Mn. У штамма VSY73 различий между контролем и пигментом разных форм нет, при этом уровень Mn несколько выше, чем в штамме VSY72.

Мы охарактеризовали экспрессию α -синуклеина цитофлуорометрически по доле GFP⁺-клеток (рис. 7, в, г). По этому признаку у VSY72 и VSY73 наблюдаются различия между контролем и всеми другими пигментными пробами. Доля GFP⁺-клеток под действием пигментов разных форм повышается, причем по этому признаку штаммы между собой не различаются. Что касается количества агрегатов (рис. 7, д, е), то оно определенно зависит от формы пигмента. У штамма VSY72 только пигмент P1 вызывает повышение доли включений по сравнению с контролем, в то время как у штамма VSY73 превышения по сравнению с контролем вызывают P0, P1 и PHyd. При этом величина этого показателя во всех случаях у VSY73 выше, чем у VSY72.

Наибольший интерес представляет влияние экзогенного пигмента на токсичность α -синуклеина. Оказалось, что все формы пигмента значительно снижают долю мертвых P1⁺-клеток (рис. 7, ж, з). Для штамма VSY72 наиболее активны такие формы красного пигмента, как P0 и P1, а для VSY73 — P0 и MeAIR.

Влияние экзогенного пигмента P1 на количество амилоидов изучали на клетках штамма VSY73, выращиваемых в течение 2.5—3 сут без качания. Проверяли интенсивность флуоресценции тиофлавина Т, связанного с амилоидом осадка в случае, когда клетки росли на галактозе и рафинозе. В первом случае индуцировался синтез α -синуклеина, а во втором синтез отсутствовал. Как видно из рис. 8, а, в присутствии P1 количество амилоидов в

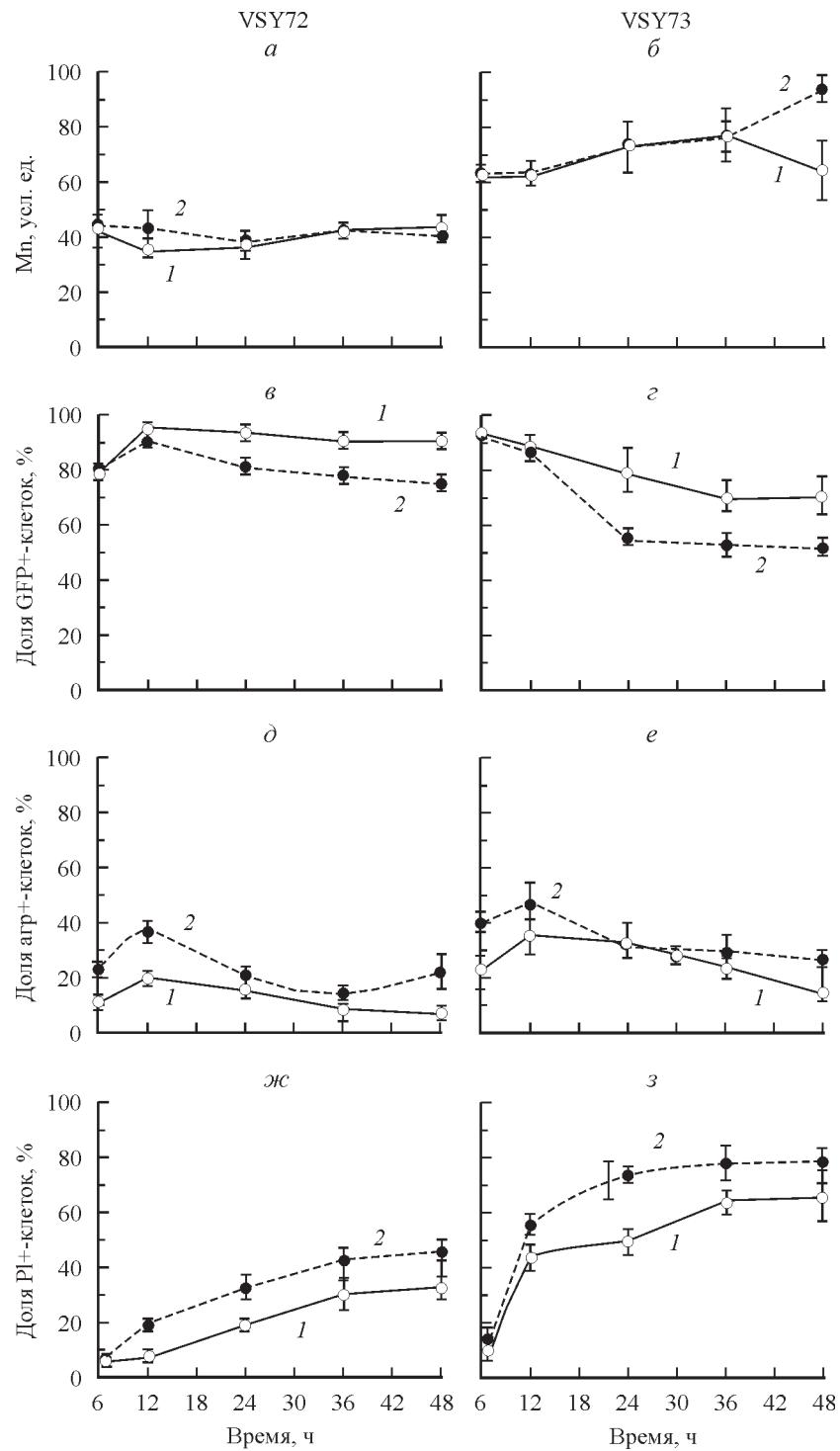


Рис. 5. Временна́я зависимость проявлений α -синуклеина у штаммов VSY72 и VSY73 при росте с качанием (кривые 1) и без качания (кривые 2).

а, б — значения Mn для VSY72 и VSY73 соответственно; в, г — доля GFP⁺-клеток у VSY72 и VSY73; д, е — доля клеток с агрегатами (здесь и на рис. 7 агр⁺) у VSY72 и VSY73; ж, з — доля PI⁺-клеток у VSY72 и VSY73.

клетке снижалось, только если синтез α -синуклеина индуцировался галактозой. Это говорит в пользу значительного вклада α -синуклеиновых агрегатов в суммарное количество клеточного амилоида.

Как именно красный пигмент влияет на накопление α -синуклеина в клетке, видно на рис. 8, б, на котором представлены результаты blot-гибридизации

клеточных белков с антителами к α -синуклеину. Количество α -синуклеина в осадочной фракции лизатов, содержащей крупные агрегаты, под воздействием красного пигмента становится меньше за счет фракции супернатанта. Это относится к обоим штаммам, независимо от того, в каких условиях (с качанием или без) наращивались клетки.

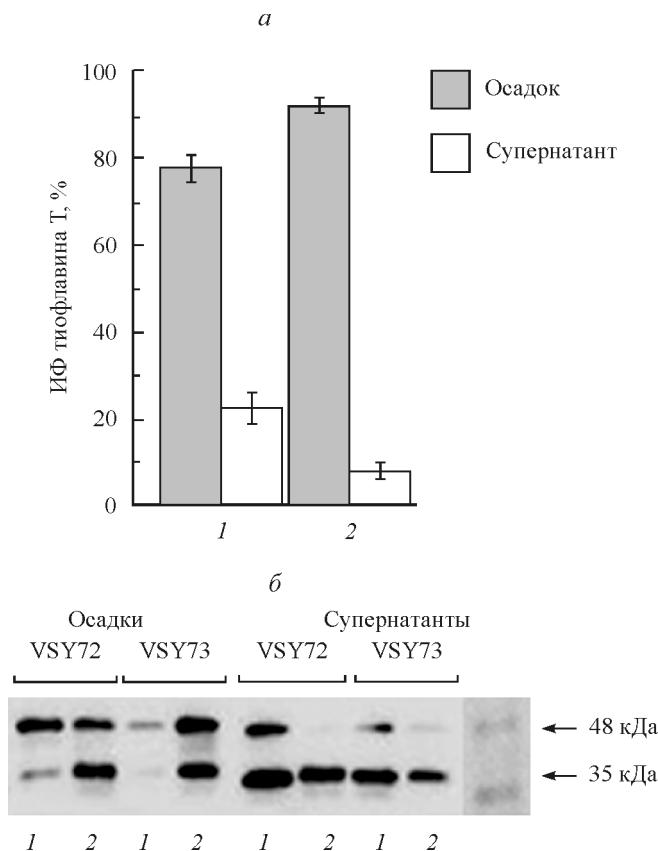


Рис. 6. Влияние условий выращивания с качанием (столбцы 1) и без качания (столбцы 2) на долю амилоида (*a*) и количество α -синуклеина в осадке и супернатанте лизата клеток VSY72 и VSY73 (*б*).

a — ИФ тиофлавина Т для 2 фракций, полученных из штамма VSY73; *б* — Вестерн-блотинг с антителами к α -синуклеину белков из осадочной фракции и супернатантов, полученных из грубых лизатов штаммов VSY72 и VSY73. Справа указаны маркеры молекулярных масс.

Обсуждение

В настоящей работе изучали влияние эндогенного и экзогенного красного пигмента на флуоресценцию и токсичность гибридного α -синуклеина в двух штаммах дрожжей. Исследовали как VSY72, несущий α -синуклеин дикого типа, так и VSY73 с аминокислотной заменой S129A, приводящей к отсутствию фосфорилирования в этом положении (Sancenon et al., 2012; Tenreiro et al., 2014b).

Посттрансляционные модификации имеют большое значение в укладке, агрегации и функционировании белков и соответственно играют большую, хотя и противоречивую роль при нейродегенеративных заболеваниях. Важными отличительными чертами болезни Паркинсона является то, что α -синуклеин у больных накапливается в тельцах Леви (Spillantini et al., 1997, 1998) и фосфорилируется по 129-му положению (Anderson et al., 2006). Влияние такого фосфорилирования на агрегацию и токсичность α -синуклеина исследовали при помощи мутантов, затрагивающих серин, расположенный в этом положении в норме. Однако результаты, полученные в разных модельных системах, оказались крайне противоречивыми (Sato et al., 2013; Tenreiro et al., 2014a).

В наших экспериментах мутация, приводящая к дефосфорилированию в штамме VSY73, не оказывается на

действии красного пигмента, когда он синтезируется внутри клетки. В штаммах VSY72 и VSY73 у красных клеток величина Mn оказывается около 25—30 усл. ед., а доля мертвых клеток колеблется около 10 %. В то же время в отсутствие красного пигмента (у белых клеток) различия между штаммами по обоим признакам достоверны (рис. 2). Как и в других экспериментах на данной системе (Sancenon et al., 2012; Tenreiro et al., 2014b), мутантный α -синуклеин оказался более токсичным. Однако под действием красного пигмента эта разница практически исчезает. Поскольку показано, что разница между диким типом и мутантом S129A зависит от неспособности мутанта активировать пути контроля качества белка (Sontag et al., 2014), в частности аутофагию (Rubinsztein et al., 2007), красный пигмент явно влияет на этот путь.

Сравнивая между собой влияние эндогенного и экзогенного пигментов на показатели флуоресценции, следует отметить, что первый из них (рис. 2) подавляет величину Mn, в то время как почти все изученные нами формы экзогенного пигмента на этот показатель практически не влияют (рис. 7, *a*, *б*). Другой признак, доля GFP⁺-клеток, наоборот, подвержен влиянию экзогенного пигмента — все формы экзогенного красного пигмента ее увеличивают, в то время как эндогенный пигмент на нее не влияет (ср. рис. 2 и рис. 7, *в*, *г*).

Особого внимания заслуживают связь между токсичностью α -синуклеина и частотой синуклеиновых цитоплазматических включений, а также влияние красного пигмента (экзогенного и эндогенного) на эти показатели. О токсичности известно, что на всех этапах агрегации и амилоидизации α -синуклеина от мономера к димеру, затем к разным линейным и закольцованным олигомерам, к протофибриллам и наконец, к амилоидным фибриллам и агрегатам встречаются токсичные молекулы (Tenreiro et al., 2013). Но даже если основным токсичным продуктом является олигомер, как это показано в ряде работ (Outeiro et al., 2008; Brown, 2010; Winner et al., 2011), это не значит, что корреляции между токсичностью и наличием агрегатов не должно быть. Тем более что многие исследователи сталкиваются с подобной связью (Sancenon et al., 2012; Tenreiro et al., 2014a).

Наличие многочисленных агрегатов в клетке говорит о том, что какое-то время назад в клетке накопилось достаточно много олигомеров. Токсичные олигомеры в ходе накопления запускают процесс гибели клеток, но этот процесс, как и образование агрегатов, растянут во времени. И следовательно, если вчера было много токсичных олигомеров, то сегодня можно наблюдать много мертвых клеток. В результате количество агрегатов и количество мертвых клеток могут казаться взаимосвязанными величинами, хотя на самом деле они оба зависят от количества олигомеров. Так как между этими показателями нет прямой связи, соответствие между токсичностью и долей клеток с агрегатами зависит от постановки эксперимента. Так, в нашей работе при сравнении клеток штаммов VSY72 и VSY73 на первых этапах роста на галактозосодержащей среде мы видим соответствие между накоплением агрегатов и токсичностью (Sancenon et al., 2012; Tenreiro et al., 2014a). Однако если следить за динамикой изменения обоих показателей, оказывается, что со временем это соответствие нарушается.

Условия выращивания достаточно сильно влияют на показатели обоих штаммов: увеличивается доля клеток с агрегатами при росте без качания (рис. 1, *в*) с последую-

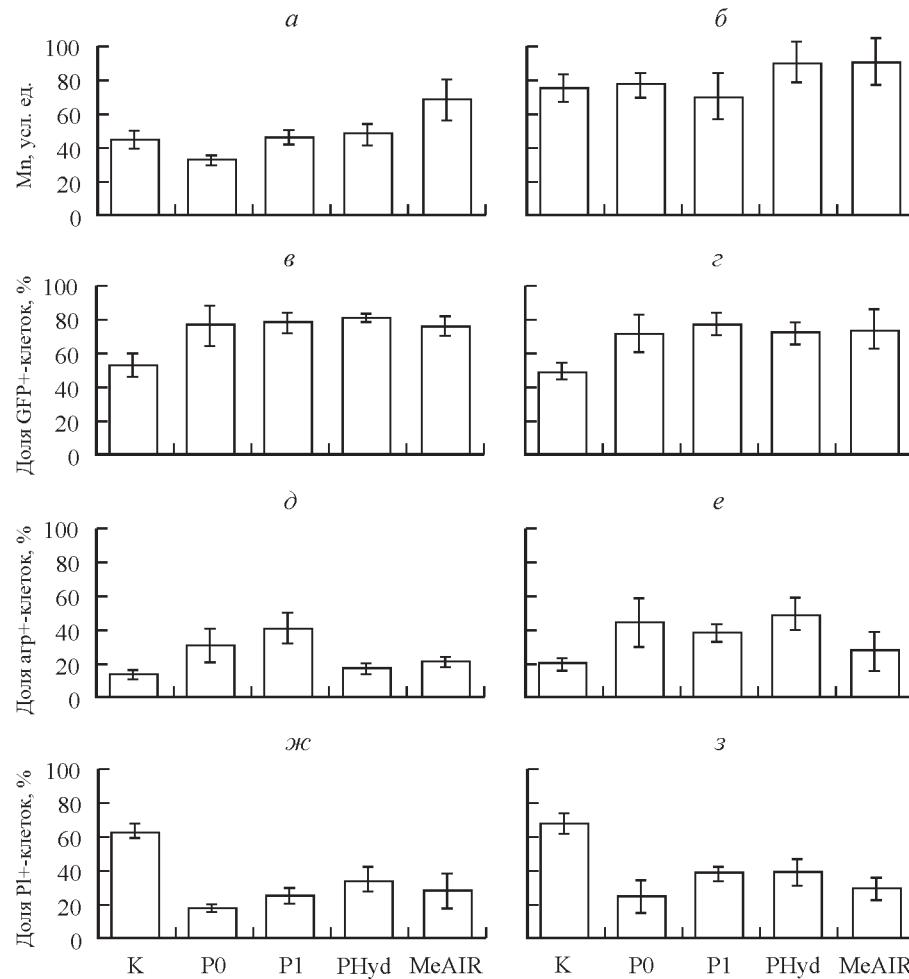


Рис. 7. Влияние разных форм экзогенного красного пигмента (P0, P1, PHyd и MeAIR) на проявления α -синуклеина у штаммов VSY72 (a, в, д, жс) и VSY73 (б, г, е, з).

а, б — величина Mn ; в, г — доля GFP^+ -клеток; д, е — доля агр⁺-клеток; жс, з — доля мертвых (PI^+) клеток.

щим увеличением доли мертвых клеток (рис. 5, жс, з). При действии эндогенного красного пигмента в обоих штаммах также наблюдается соответствие между долей клеток с агрегатами и долей мертвых клеток, правда, сама частота клеток с включениями на агаризованной селективной среде значительно снижена (рис. 1, а).

Об эндогенном красном пигменте мы знаем, что он сконцентрирован в вакуоли. Образование (полимеризация) пигмента происходит в ходе транспорта аминоимиазолориботида в вакуоль (Chaudhuri et al., 1997; Sharma et al., 2003). В то же время известно, что амилоиды накапливаются в сайте IPOD (insoluble protein deposit — отложение нерастворимых белков), расположенному на вакуоли (Kaganovich et al., 2008). Создается впечатление, что эндогенный красный пигмент в вакуоли обменивается с α -синуклеиновым материалом из IPOD. В результате пигмент может тормозить формирование агрегатов либо приводить к их ремоделированию или растворению. При этом уменьшается количество мертвых клеток. Возможны два объяснения этого явления: во-первых, то, что токсичными являются сами крупные агрегаты; во-вторых, что более вероятно, при воздействии эндогенного пигмента уменьшается количество токсичных олигомеров. В последнем случае IPOD играет регуляторную роль при выборе пути олигомеризации амилоида. Кроме того,

можно предположить, что эндогенный пигмент присутствует в малых количествах в цитоплазме дрожжевых клеток и там влияет на первые этапы агрегирования α -синуклеина, направляя этот процесс не по токсичному пути. Агрегирование α -синуклеина по нетоксичному пути было показано для воздействия галлата эпигаллокатехина (Ehrnhoefer et al., 2008). При этом уменьшалось количество амилоида, богатого β -структурными, при фибрillогенезе α -синуклеина.

Была также показана конверсия уже сформированных α -синуклеиновых агрегатов в аморфную нетоксичную форму (Bieschke et al., 2010). Такая модель может быть приложима и к нашим данным, хотя считается, что в отличие от некоторых других сайтов, таких как стрессовые гранулы и JUNQ (juxtanuclear quality control compartment) (на своих ранних стадиях), цитоплазматические сайты типа IPOD являются необратимыми терминалными «могильниками» амилоидных агрегатов (Kaganovich et al., 2008; Amen, Kaganovich, 2015). Правда, у данных авторов не было в руках такого агента, как красный пигмент, для воздействия на IPOD «изнутри», со стороны вакуоли. Возможно, что красный пигмент позволит пересмотреть роль IPOD.

Стоит иметь в виду и альтернативную интерпретацию. Если, как принято считать, особой токсичностью облада-

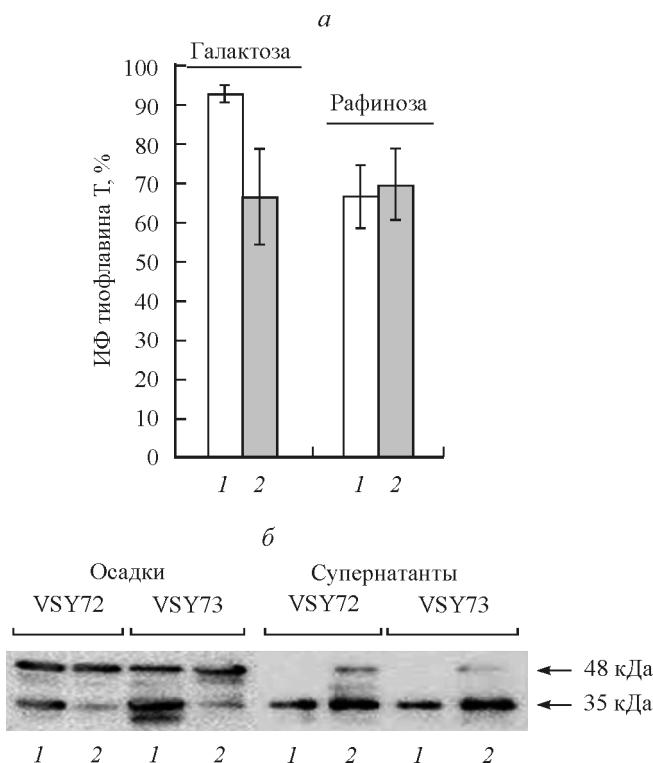


Рис. 8. Влияние экзогенного пигмента на долю амилоида (а) и количество α -синуклеина (б) во фракциях клеточных лизатов. а—доля амилоида в осадочной фракции лизатов клеток штамма VSY73, выросших на среде с галактозой и рафиноzą без пигмента (1) и с P1 (2), определенная по ИФ тиофлавина T; б—Вестерн-блотинг с антителами к α -синуклеину белков из осадков и супернатантов грубых лизатов без пигмента (1) и в присутствии P1 (2). Справа указаны маркеры молекулярных масс.

ют неправильно уложенные относительно подвижные пептиды, попадающие в JUNQ (Weisberg et al., 2012), оказавшиеся в IPOD молекулы α -синуклеина не столь опасны для клетки. Тогда основную нагрузку в действии красного пигмента на амилоиды несут молекулы пигмента, находящиеся вне вакуоли. Эта альтернатива напрашивается для объяснения действия экзогенного пигмента.

Мы показали, что экзогенный красный пигмент, как и эндогенный, снижает токсичность α -синуклеина для дрожжей. Скорее всего, при этом снижается количество токсичного интермедиата. Но при действии эндогенного и экзогенного красного пигмента нами выявлены и некоторые различия. Если эндогенный красный пигмент снижает количество видимых агрегатов, то экзогенный пигмент влияет на этот показатель противоположным образом, увеличивая число клеток с цитоплазматическими включениями. Создается впечатление, что красный пигмент склеивает мелкие α -синуклеиновые олигомеры и (или) протофибриллы, увеличивая таким образом количество видимых агрегатов. Действительно, ранее при помощи трансмиссионной электронной микроскопии мы наблюдали «склеивание» фибрилл амилоида- β под действием красного пигмента, хотя в этой системе действие красного пигмента не приводило к увеличению количества видимых в световом микроскопе агрегатов (Nevzglyadova et al., 2015).

Остается невыясненным, где происходит контакт между экзогенным красным пигментом и α -синуклеином. Если экзогенный пигмент и рекрутируется в вакуоль, то не слишком эффективно. Мы наблюдали проникновение красного пигмента в клетку, но проникновение в вакуоль не было явным (Nevzglyadova et al., 2015). Скорее всего, эффективная концентрация экзогенного красного пигмента в цитоплазме выше, а количество в вакуоли ниже, чем в случае эндогенного красного пигмента. В то же время снижение токсичности α -синуклеина при действии экзогенного пигмента говорит о том, что он воздействует на токсичную форму α -синуклеина. Поскольку это происходит в отсутствие подавления количества клеток с видимыми агрегатами, можно предположить, что такой токсичной формой, скорее всего, являются олигомеры. На уровне агрегатов, не видимых под микроскопом, но выявляемых в осадках лизатов Вестерн-блотингом, разницы между действием экзогенного и эндогенного пигментов нет.

Существенно, что анализ осадочной и супернатантной фракций клеточных лизатов показывает одинаковое перераспределение α -синуклеина в клетке при действии как эндогенного (рис. 3), так и экзогенного (рис. 8) пигментов. Оценка количества амилоидов тиофлавином T и данные Вестерн-блотинга демонстрируют, что амилоидная фракция α -синуклеина в осадке становится меньше, а супернатантная, включающая в себя меньшие агрегаты и олигомеры, становится больше. Так как действие обоих пигментов снижает токсичность, можно предположить, что возрастание супернатантной фракции не приводит к обогащению ее токсичными формами α -синуклеина (олигомерами или мелкими фибриллами). А это значит, что красный пигмент способен эти формы модифицировать и нейтрализовать их токсичное действие.

Изучение супернатантных и осадочных фракций лизатов у клеток, выращенных в отсутствие пигмента с качанием и без качания, также выявляет перераспределение α -синуклеина. В случае роста без качания клетки накапливают значительное количество цитоплазматических включений (рис. 5, *d, e*), и кажется неудивительным, что у них увеличивается количество α -синуклеина в осадочной фракции лизатов (рис. 6). В клетках, выращенных без качания, гибель клеток повышена.

Качание в некотором роде моделирует действие красного пигмента: оно уменьшает долю α -синуклеина в осадке и снижает его токсичность. Однако в то время как качание препятствует накоплению агрегатов, экзогенный пигмент этому способствует. Можно предположить, что цитоплазматические включения, наблюдавшиеся в присутствии и в отсутствие пигмента, различаются по своему составу. Предварительные данные FRAP-анализа штамма VSY73 подтверждают наличие изменения подвижности молекул, входящих в состав агрегатов, при действии красного пигмента (данные не приводятся).

Таким образом, нами показано потенциальное терапевтическое действие красного пигмента на моделях клонированных в дрожжах β -амилоида (Nevzglyadova et al., 2015) и α -синуклеина. В последнем случае красный пигмент снижает как токсичность, так и количество амилоида в клетке. В случае β -амилоида, который на дрожжевой модели не проявляет токсичности, красный пигмент подавлял его суммарное количество в клетке и его агрегирование.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-01558а). Частично работу проводили на оборудо-

довании аналитического центра нано- и биотехнологий СПбГПУ (при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ) и ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ.

Список литературы

- Amen T. R., Mikhailova E. V., Aleinin B. B., Artemov A. B., Dement'ev P. A., Khodorkovskii M. A., Artamonova T. A., Kuznetsova I. M., Soidla T. R., Nevzglyadova O. V. 2012. Сравнительная структурная и функциональная характеристика разных форм красного пигмента дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и его синтетического аналога. Цитология. 54 (11) : 853—861. (Amen T. R., Mikhailova E. V., Aleinin V. V., Artyomov A. V., Dement'ev P. A., Khodorkovskii M. A., Artamonova T. O., Kuznetsova I. M., Soidla T. R., Nevzglyadova O. V. 2012. Structural and functional characteristics of various forms of red pigment of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its synthetic analog. Cell Tissue. Biol. (Tsitologiya). 7 (1) : 86—94.)
- Бишиневская А. Б., Кушниров В. В., Тер-Аванесян М. Д. 2007. Нейродегенеративные амилоидозы: дрожжевая модель. Молекулар. биол. 41 (2) : 346—354. (Wishnevskaya A. B., Kushnir V. V., Ter-Avanesyan M. D. 2007. Neurodegenerative amyloidoses: yeast model. Mol. biol. 41 (2) : 346—354.)
- Михайлова Е. В., Артемов А. В., Снигиревская Е. С., Артамонова Т. О., Ходорковский М. А., Сойдла Т. Р., Невзгладова О. В. 2011. Влияние красного пигмента *Saccharomyces cerevisiae* на образование инсулиновых фибрилл *in vitro*. Цитология. 53 (10) : 808—814. (Mikhailova E. V., Artemov A. V., Snigirevskaya E. S., Artamonova T. O., Khodorkovskii M. A., Soidla T. R., Nevzglyadova O. V. 2011. The effect of red pigment on insulin fibril formation *in vitro*. Cell Tissue. Biol. (Tsitologiya). 5 (6) : 580—585.)
- Alberti S. 2012. Molecular mechanisms of spatial protein quality control. Prion. 6 : 437—442.
- Amen T., Kaganovich D. 2015. Dynamic droplets: the role of cytoplasmic inclusions in stress, function, and disease. Cell. Mol. Life Sci. 72 : 401—415.
- Anderson J. P., Walker D. E., Goldstein J. M., de Laat R., Bannducci K., Caccavello R. J., Barbour R., Huang J., Kling K., Lee M., Diep L., Keim P. S., Shen X., Chataway T., Schlossmacher M. G., Seubert P., Schenk D., Sinha S., Gai W. P., Chilcote T. J. 2006. Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. J. Biol. Chem. 281 : 29 739—29 752.
- Baba M., Nakajo S., Tu P. H., Tomita T., Nakaya K., Lee V. M., Trojanowski J. Q., Iwatsubo T. 1998. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. Amer. J. Pathol. 152 : 879—890.
- Bieschke J., Russ J., Friedrich R. P., Ehrnhoefer D. E., Wobst H., Neugebauer K., Wanker E. E. 2010. EGCG remodels mature α -synuclein and amyloid- β fibrils and reduces cellular toxicity. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 107 : 7710—7715.
- Breydo L., Wu J. W., Uversky V. N. 2012. α -Synuclein misfolding and Parkinson's disease. Biochim. biophys. acta. 1822 : 261—285.
- Brown D. R. 2010. Oligomeric alpha-synuclein and its role in neuronal death. IUBMB Life. 62 : 334—339.
- Chaudhuri B., Ingavale S., Bachhawat A. K. 1997. Apd1+, a gene required for red pigment formation in ade6 mutants of *Schizosaccharomyces pombe*, encodes an enzyme required for glutathione biosynthesis: a role for glutathione and a glutathione-conjugate pump. Genetics. 145 : 75—83.
- Corti O., Lesage S., Brice A. 2011. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. Physiol. Rev. 91 : 1161—1218.
- Ehrnhoefer D. E., Bieschke J., Boeddrich A., Herbst M., Masino L., Lurz R., Engemann S., Pastore A., Wanker E. E. 2008. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. Nat. Struct. Mol. Biol. 15 : 558—566.
- Franssens V., Boelen E., Anandhakumar J., Vanhelmont T., Büttner S., Windrich J. 2010. Yeast unfolds the road map toward α -synuclein-induced cell death. Cell Death and Diff. 17 : 746—753.
- Goedert M. 2015. Alzheimer's and Parkinson's diseases: the prion concept in relation to assembled $\text{A}\beta$, tau, and α -synuclein. Science. 349 : 1255555.
- Goedert M., Spillantini M. G., Del Tredici K., Braak H. 2013. 100 years of Lewy pathology. Nature Rev. Neurol. 9 : 13—24.
- Kaganovich D., Kopito R., Frydman J. 2008. Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. Nature. 454 : 1088—1095.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
- Miller-Fleming L., Giorgini F., Outeiro T. F. 2008. Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders. Biotechnol. J. 3 : 325—338.
- Nevzglyadova O. V., Artemov A. V., Mittenberg A. G., Solovyov K. V., Kostyleva E. I., Mikhailova E. V., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Soidla T. R. 2009. Prion-associated proteins in yeast: comparative analysis of isogenic [PSI⁺] and [psi⁻] strains. Yeast. 26 : 611—631.
- Nevzglyadova O. V., Kuznetsova I. M., Mikhailova E. V., Artamonova T. O., Artemov A. V., Mittenberg A. G., Kostyleva E. I., Turoverov K. K., Khodorkovskii M. A., Soidla T. R. 2011. The effect of red pigment on amyloidization of yeast proteins. Yeast. 28 : 505—526.
- Nevzglyadova O. V., Mikhailova E. V., Amen T. R., Zelin V. V., Artemov A. V., Kostyleva E. I., Mezhenskaya D. A., Rodin D. I., Saifitdinova A. F., Khodorkovskii M. A., Sarantseva S. V., Soidla T. R. 2015. Yeast red pigment modifies Amyloid beta growth in Alzheimer disease models in both *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila melanogaster*. Amyloid. 22 : 100—111.
- Outeiro T. F., Lindquist S. 2003. Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. Science. 302 : 1772—1775.
- Outeiro T. F., Putcha P., Tetzlaff J. E., Spoelgen R., Koker M., Carvalho F., Hyman B. T., McLean P. J. 2008. Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells. PLoS ONE. 3 : e1867.
- Prusiner S. B. 2013. Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. Annu. Rev. Genet. 47 : 601—623.
- Racette B. A., Willis A. W. 2015. Time to change the blind men and the elephant approach to Parkinson disease? Neurology. 85 : 190—196.
- Rubinsztein D. C., Gestwicki J. E., Murphy L. O., Klionsky D. J. 2007. Potential therapeutic applications of autophagy. Nature Rev. Drug Discovery. 6 : 304—312.
- Sancenon V., Lee S. A., Patrick C., Griffith J., Paulino A., Outeiro T. F., Reggioli F., Masliah E., Muchowski P. J. 2012. Suppression of alpha-synuclein toxicity and vesicle trafficking defects by phosphorylation at Ser-129 in yeast depends on genetic context. Hum. Mol. Genet. 21 : 2432—2449.
- Sato H., Kato T., Arawaka S. 2013. The role of Ser129 phosphorylation of alphasynuclein in neurodegeneration of Parkinson's disease: a review of *in vivo* models. Rev. Neurosci. 24 : 115—123.
- Sharma K. G., Kaur R., Bachhawat A. K. 2003. The glutathione-mediated detoxification pathway in yeast: an analysis using the red pigment that accumulates in certain adenine biosynthetic mutants of yeasts reveals the involvement of novel genes. Arch. Microbiol. 180 : 108—117.
- Sherman F., Fink G. R., Hicks J. B. 1986. Laboratory course manual for methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. 186 p.
- Smirnov M. N., Smirnov V. N., Budowsky E. I., Inge-Vechtomov S. G., Serebrjakov N. G. 1967. Red pigment of adenine-deficient yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 27 : 299—304.
- Sontag E. M., Vonk W. I., Frydman J. 2014. Sorting out the trash: the spatial nature of eukaryotic protein quality control. Curr. Opin. Cell Biol. 26 : 139—146.

- Soper J. H., Roy S., Stieber A., Lee E., Wilson R. B., Trojanowski J. Q., Burd C. G., Lee V. M. Y. 2008. α -Synuclein-induced aggregation of cytoplasmic vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell. 19 : 1093—1103.
- Spillantini M. G., Crowther R. A., Jakes R., Cairns N. J., Lantos P. L., Goedert M. 1998. Filamentous α -synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. Neurosci. Lett. 251 : 205—208.
- Spillantini M. G., Schmidt M. L., Lee V. M. Y., Trojanowski J. Q., Jakes R., Goedert M. 1997. α -Synuclein in Lewy bodies. Nature. 388 : 839—840.
- Stefanis L. 2012. α -Synuclein in Parkinson's disease. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 4 : a009399.
- Tenreiro S., Eckermann K., Outeiro T. F. 2014a. Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe? Frontiers Mol. Neurosci. 7 : 1—121.
- Tenreiro S., Munder M. C., Alberti S., Outeiro T. F. 2013. Harnessing the power of yeast to unravel the molecular basis of neurodegeneration. J. Neurochem. 127 : 438—452.
- Tenreiro S., Outeiro T. F. 2010. Simple is good: yeast models of neurodegeneration. FEMS Yeast Res. 10 : 970—979.
- Tenreiro S., Reimao-Pinto M. M., Antas P., Rino J., Wawrzyncka D., Macedo D., Rosado-Ramos R., Amen T., Waiss M., Magalhaes F., Gomes A., Santos C.N., Kaganovich D., Outeiro T. F. 2014b. Phosphorylation modulates clearance of alpha-synuclein inclusions in a yeast model of Parkinson's disease. PLoS Genet. 10 : e1004302.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 76 : 4350—4354.
- Wales P., Pinho R., Lázaro D. F., Outeiro T. F. 2013. Lime-light on alpha-synuclein: pathological and mechanistic implications in neurodegeneration. J. Parkins. Dis. 3 : 415—459.
- Weisberg S. J., Lyakhovetsky R., Werdiger A. C., Gitler A. D., Soen Y., Kaganovich D. 2012. Compartmentalization of superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) aggregates determines their toxicity. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 109 : 15 811—15 816.
- Winner B., Jappelli R., Maji S. K., Desplats P. A., Boyer L., Aigner S., Hetzer C., Loher T., Vilar M., Campioni S., Tzitzilinis C., Soragni A., Jessberger S., Mira H., Consiglio A., Pham E., Masliah E., Gage F. H., Riek R. 2011. *In vivo* demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 108 : 4194—4199.

Поступила 28 IX 2015

THE EFFECT OF YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* RED PIGMENT ON THE EXPRESSION OF THE CLONED HUMAN α -SYNUCLEIN

*O. V. Nevzglyadova, A. V. Artemov, E. V. Mikhailova, O. G. Lyublinskaya,
Yu. E. Ozerova, P. A. Ivanova, E. I. Kostyleva, T. R. Soidla¹*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

¹ e-mail: soidla39@gmail.com

Two transgenic yeast strains expressing human α -synuclein were used to study the effects of yeast red pigment which, as we have shown earlier, exhibits antiamyloid properties. It has been demonstrated that endogenous red pigment produced in special conditions by strains carrying ade1 mutation inhibits expression of the hybrid protein α -synuclein-GFP. This is witnessed by a decrease in the mean value of GFP fluorescence and in the per cent of cells exhibiting cytoplasmic inclusions of α -synuclein-GFP. Exogenous red pigment was used in a form of purified natural pigment, its hydrolyzed derivative and a synthetic red pigment. All they differ from the endogenous pigment by their effect on α -synuclein. Exogenous red pigments lead to increase of both the number of cells expressing GFP fluorescence and the number of cytoplasmic inclusions. Both endogenous and exogenous red pigment lead to drop of toxicity of the cloned α -synuclein and redistribution of the α -synuclein in cells. The content of α -synuclein decreases in cell lysate pellets and increases in supernatants.

Key words: amyloid, α -synuclein, red pigment, yeast.