

Ольга Володимирівна Васьків,

магістр

Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна

orcid.org/0009-0002-4415-2957, e-mail: vaskiv.olga@gmail.com

Галина Миколаївна Клепач,

кандидат біологічних наук, доцент кафедри біології та хімії

Дрогобицький державний педагогічний університет імені Івана Франка, Україна

orcid.org/0000-0003-0784-8373, e-mail: h.klepach@dspu.edu.ua

Олег Володимирович Стасик,

доктор біологічних наук, старший дослідник

Інститут біології клітини Національної академії наук України, Україна

Науково-дослідний інститут епідеміології та гігієни Львівського національного

медичного університету імені Данила Галицького, Україна

orcid.org/0000-0001-8135-6102, e-mail: olehst11@gmail.com

Олена Георгіївна Стасик,

кандидат біологічних наук, доцент кафедри біохімії

Львівський національний університет імені Івана Франка

Інститут біології клітини Національної академії наук України, Україна

orcid.org/0000-0002-0253-2372, e-mail: olena.stasyk@lnu.edu.ua

ІОНИ КУПРУМУ (II) ПІДВИЩУЮТЬ ЦИТОТОКСИЧНИЙ ВПЛИВ РЕКОМБІНАНТНОГО АЛЬФА-СИНУКЛЕЇНУ ЛЮДИНИ НА КЛІТИНИ ДРІЖДЖІВ *OGATAEA POLYMORPHA*

Анотація. Відомо, що в білкових агрегатах нейронів людей, які страждають на хворобу Паркінсона (ХП), можна виявити підвищені рівні певних іонів металів (як-от цинк, залізо та купрум). Взаємодіючи з білками, ці метали впливають на властивості окремих ділянок мозку та призводять до нейродегенеративних змін. На сьогодні існує широкий спектр моделей для дослідження різних аспектів етіопатогенезу ХП *in vivo*, які базуються на використанні різних модельних організмів – від одноклітинних еукаріотів до приматів. Як штучну модель ХП в нашій роботі ми використовували дріжджі *Ogataea polymorpha* з конститутивною експресією рекомбінантного білка альфа-синуклеїну людини, головного токсичного чинника ХП. Метою роботи було дослідити вплив надлишку іонів купруму в ростовому середовищі на фізіологічні властивості клітин дріжджів *O. polymorpha* з конститутивною експресією альфа-синуклеїну. Штами дріжджів вирощували в багатому середовищі YPS (1% дріжджовий екстракт, 1% бактопептон, 1% сахароза), мінеральному середовищі YNB (0,67% Yeast Nitrogen Base (Difco), 0,5% амонію сульфат, 2% сахароза). Для твердих середовищ додавали агар у концентрації 2%. Температура культивування становила 37 °С, умови аерації – перемішування на термостатованому орбітальному шейкері (200 об/хв). Усі експерименти повторювали принаймні тричі. Статистичний аналіз проводили за допомогою Т-тесту Стьюдента. Результати представлені у вигляді середніх значень зі стандартними помилками. Враховували значення за $P \leq 0,05$.

Під час дослідження було встановлено, що збільшення концентрації Cu^{2+} у ростовому середовищі до 500 та 750 мкМ CuCl_2 спричиняло помітний токсичний ефект на клітини

модельного штаму (NCYC495/*SNCA-GFP*), порівнюючи зі штамом дикого типу (NCYC495 pr). Також було з'ясовано, що в модельного штаму дріжджів за таких умов культивування рівень АФО, а саме гідрогену пероксиду, був нижчим, ніж у штаму дикого типу. Імовірно, завдяки хелаторним властивостям білка альфа-синуклеїну щодо іонів купруму участь цього металу в ініціації оксидативного стресу обмежувалася і, як наслідок, знижувалася продукція АФО. Оскільки гідрогену пероксид є основним субстратом каталази, ферменту системи антиоксидантного захисту, було проаналізовано активність цього ферменту на тлі надлишку іонів купруму в ростовому середовищі. За концентрації Cu^{2+} 250 мкМ активність каталази в обох досліджуваних штамів дріжджів була найвищою, однак за 500 мкМ вона знижувалася. Такий ефект можна пояснити тим, що за високих концентрацій купрум діє як денатуруючий агент щодо білка каталази, призводячи до її інактивації. Слід зазначити, що надлишок іонів Cu^{2+} не викликав агрегації альфа-синуклеїну, проте підвищував цитотоксичний ефект цього білка на клітини модельного штаму.

Ключові слова: альфа-синуклеїн, хвороба Паркінсона (ХП), купрум, дріжджі *Ogataea polymorpha*.

ВСТУП

Хвороба Паркінсона (ХП) є поширеним прогресуючим нейродегенеративним захворюванням, яке вражає 1–3% населення похилого віку. До клінічних симптомів ХП належать тремор у спокої, ригідність, брадикінезія та постуральна нестабільність. Однією з нейропатологічних ознак ХП є зменшення кількості дофамінергійних нейронів у чорній субстанції мозку, що спричиняє дефіцит дофаміну. Іншою патологічною ознакою є внутрішньонейронні включення, як-от тільця Леві та нейрити Леві в залишкових дофамінергійних нейронах. Основним компонентом тілець Леві є агрегований альфа-синуклеїн [1]. Альфа-синуклеїн – пресинаптичний нейронний білок, який генетично та нейропатологічно пов'язаний із ХП [2]. Це нативно розгорнутий білок, здатний взаємодіяти з мембранами, приймаючи альфа-спірально конформацію. За патологічних умов альфа-синуклеїн агрегує в олігомери та фібрили, утворюючи токсичні амілоїдогенні конформації, збагачені бета-листовими структурами. Більш ранні дослідження *in vitro* довели, що наявність мілімолярних концентрацій різних іонів металів, серед яких купрум, сприяє утворенню частково згорнутих амілоїдогенних конформацій, які більш схильні до агрегації [3]. Купрум (Cu) – життєво важливий метал, необхідний для багатьох біологічних процесів. Переважна більшість загального купруму в організмі здорової людини пов'язана з простетичними групами ферментів або зв'язана з білками. Гомеостаз купруму строго регулюється складною системою транспортерів і білків-шаперонів. Надлишок і токсичність цього металу, які пов'язані з патогенезом печінкових розладів, нейродегенеративних змін та інших захворювань, можуть виникати в разі порушення гомеостазу купруму. Здатність ініціювати окислювальне пошкодження найчастіше пов'язують із купрум-індукованою клітинною токсичністю [4].

На сьогодні розроблено дуже великий арсенал моделей для вивчення різних аспектів етіопатогенезу ХП *in vivo* з використанням різних модельних організмів – від одноклітинних еукаріотів до приматів [5]. Як штучну модель ХП в нашій роботі ми використовували дріжджі *Ogataea polymorpha* з конститутивною експресією рекомбінантного білка альфа-синуклеїну людини. Цей модельний штам було сконструйовано на основі штаму дикого типу NCYC 495 pr шляхом введення касети експресії, яка складається з промотора гена *MET25 Saccharomyces cerevisiae*,

кодуючої послідовності альфа-синуклеїну людини, кон'югованої з геном зеленого флуоресцентного білка (GFP), та термінатора гена *CYC1 S. cerevisiae*. Наявність у клітинах модельного штаму химерного білка альфа-синуклеїну, кон'югованого із зеленим флуоресцентним білком, була підтверджена методом Вестерн-блотингу з антитілами до альфа-синуклеїну. За допомогою флуоресцентної мікроскопії було візуалізовано цитозольну локалізацію цього рекомбінантного білка [6]. У наших попередніх роботах також було сконструйовано модельний штам *S. cerevisiae* з використанням цієї ж касети експресії та охарактеризовано вплив альфа-синуклеїну людини на клітини пекарських дріжджів [7]. Метою нашої роботи було дослідити вплив надлишку іонів купруму на фізіологічні властивості модельного штаму дріжджів *Ogataea polymorpha* з конститутивною експресією рекомбінантного білка альфа-синуклеїну людини.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Штами, середовища та мікробіологічні методи

У роботі були використані штами термотолерантних дріжджів *O. polymorpha*, перелічені в таблиці 1.

Таблиця 1

Назва штаму	Опис генотипу
<i>Ogataea polymorpha</i>	
NCYC 495 pr (WT, штам дикого типу)	<i>leu1-1 HpLEU2</i>
NCYC 495/ <i>SNCA-GFP</i>	<i>APH, P_{MET25} - yEGFP3 - SNCA - T_{CYC1}</i>

Штами *O. polymorpha* вирощували в багатому середовищі YPS (1% дріжджовий екстракт, 1% бактопептон, 1% сахароза), мінеральному середовищі YNB (0,67% Yeast Nitrogen Base (Difco), 0,5% амонію сульфат, 2% сахароза). Для твердих середовищ додавали агар у концентрації 2%. Температура культивування становила 37 °С, умови аерації – перемішування на шейкері (200 об/хв). Оптичну густину суспензії клітин дріжджів, розведеної в декілька разів, визначали на електрофотокolorиметрі КФК-3 за довжини хвилі 600 нм у 5 мм проти води як контролю. Флуоресцентні мікрофотографії клітин дріжджів отримували за допомогою флуоресцентного мікроскопа Axio Imager A1 (Carl Zeiss Micro Imaging, Jena, Germany) та цифрової фотокамери Axio Cam MRm (Carl Zeiss Micro Imaging). Фотографії були зроблені із 600-кратним збільшенням. Обробку отриманих фотографій виконували за допомогою комп'ютерних програм AxioVision 4.5 (Carl Zeiss MicroImaging) та Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems, Mountain View, CA). Для виявлення мертвих клітин дріжджів методом флуоресцентної мікроскопії використовували розчин етидію броміду в кінцевій концентрації 1 мкг/мл. Перед аналізом у 200 мкл культури клітин вносили 1 мкл барвника. Для визначення вмісту активних форм кисню (АФО) в живих клітинах дріжджів відбирали по 1 мл культури з оптичною густиною $OD_{600} = 5,0$, до якої додавали по 10 мкл 2,7-дихлородигідрофлуоресцеїн діацетат (DCFH-DA) до кожного зразка. Після додавання DCFH-DA клітини інкубували впродовж 30 хвилин у темряві за температури 37 °С. Після цього клітини двічі відмивали дистильованою водою та ресуспендували в дистильованій воді до кінцевого об'єму 1 мл і проводили

флуоресцентну мікроскопію. Флуоресцентні мікрофотографії досліджуваних штамів дріжджів отримували за допомогою флуоресцентного мікроскопа Axio Imager A1 (Carl Zeiss Micro Imaging, Jena, Germany) та цифрової фотокамери Axi Cam MRm (Carl Zeiss Micro Imaging). Фотографії були зроблені зі 600-кратним збільшенням з тривалістю експозиції 50 мс. Аналізували 2–3 поля зору в середньому по 100 клітин у кожному полі зору. Оцінювання клітин, у яких є надлишок АФО, здійснювали за допомогою комп'ютерної програми Gel-Pro Analyzer.

Отримання безклітинних екстрактів

Для отримання безклітинних екстрактів використовували скляні кульки Баллотіні. До клітин, відмитих від ростового середовища, додавали 50 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,5) з 1 мМ PMSF (фенілметансульфонілфторид – інгібітор вакуолярних протеаз). У пластикові мікропробірки типу Ependorf переносили отриману суспензію, після чого додавали скляні кульки Баллотіні (діаметр 0,45–0,5 мм) у кількості $\frac{3}{4}$ від об'єму суспензії клітин і охолоджували, або заморожували за температури $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ для тривалого зберігання. Протягом 15 хв клітини руйнували методом струшування на вортексі за температури $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ з охолодженням на льоді через кожні 5 хв. Далі гомогенізували центрифугували протягом 20 хв у мікроцентрифузі Ependorf 5417R з радіусом ротора 8,25 см, за швидкості 13 500 об/хв (rpm), відносно центрифужне прискорення в цих умовах становить 16 800 g, за температури $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, а до отриманого безклітинного екстракту дріжджів додавали додаткову порцію PMSF. Концентрацію білка визначали методом Лоурі [8].

Визначення активності каталази [9]

Активність каталази (КФК 1.11.1.6) визначали за інтенсивністю забарвлення комплексу, утвореного H_2O_2 із солями молібдену. 1 мл реакційної суміші складався з 0,05 М трис-НСІ буферу (рН 7,8), 0,03% розчину H_2O_2 та досліджуваного зразка (безклітинний екстракт дріжджів) з кінцевою концентрацією білка 50 мкг/мл у реакційній суміші. Реакцію зупиняли додаванням 0,5 мл 4%-го розчину молібдату амонію після 10 хв інкубації. Вимірювання проводили методом спектрофотометрії за довжини хвилі $\lambda = 410\text{ нм}$. Одиниці активності каталази виражали в $\text{нмоль H}_2\text{O}_2 \times \text{хв}^{-1} \times \text{мг}^{-1}$ білка.

Визначення вмісту карбонільних груп білків [9]

У процесі окиснювальної модифікації білків у радикалах залишків аліфатичних амінокислот утворюються альдегідні й кетонні групи. Останні взаємодіють з 2,4-динітрофенілгідразиним (ДНФГ) з утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів, що мають характерний спектр поглинання. Альдегідо- і кетопохідні нейтрального характеру реєстрували за 370 нм, а основного характеру – за 430 нм.

До 0,005 мл зразків додавали по 0,5 мл 0,85%-го розчину NaCl. У контрольну пробу додавали 0,5 мл 2 н HCl, а в дослідні – 0,5 мл 0,1 М розчину 2,4-ДНФГ, розчиненого в 2 н HCl. Після цього до всіх зразків додавали по 0,5 мл 10%-ї трихлороцтової кислоти (ТХО) й інкубували протягом 1 години за температури $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Після інкубації проби центрифугували протягом 10 хвилин за 3000 об/хв, осад промивали тричі по 1 мл 5%-го ТХО. До осаду додавали 2,5 мл 8 М розчину сечовини та інкубували протягом 5 хвилин на киплячій водянній бані до повного розчинення осаду. Екстинкцію зразків вимірювали за довжини хвилі 370 нм та 430 нм протягом 10 хвилин. Отримані результати виражали в мкмоль карбонільних груп $\times \text{мг}^{-1}$ білка.

Віртуальний аналіз амінокислотної послідовності білків

Пошук амінокислотної послідовності альфа-синуклеїну (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P37840/entry#sequences>) здійснювали на онлайн ресурсі <https://www.uniprot.org/>. Віртуальне моделювання взаємодії альфа-синуклеїну з іонами Cu^{2+} здійснювали, послуговуючись вебресурсом MIB: Metal Ion-Binding site prediction server (<http://combio.life.nctu.edu.tw/MIB2/>).

Статистична обробка результатів

Усі експерименти повторювали принаймні тричі. Статистичний аналіз проводили за допомогою Т-тесту Стьюдента. Результати представлені у вигляді середніх значень зі стандартними помилками. Враховували значення за $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

Вплив іонів Cu^{2+} на життєздатність модельних штамів *Ogataea polymorpha*, у яких гетерологічно продукується альфа-синуклеїн людини

Відомо, що іони металів можуть ініціювати агрегацію білків в олігомери та відігравати певну роль у формуванні токсичних структур альфа-синуклеїну, основного патологічного чинника ХП. Вважається, що зв'язування іонів металів запускає структурні зміни білка в бік більш компактного стану через нейтралізацію заряду, що призводить до його агрегації та прогресування нейродегенеративних процесів [10].

Для з'ясування ролі іонів купруму в можливому цитотоксичному ефекті рекомбінантного альфа-синуклеїну людини на клітини модельного штаму дріжджів *O. polymorpha* було здійснено порівняльний аналіз швидкості росту культури штаму дикого типу та модельного штаму (рис. 1). Було встановлено, що збільшення концентрації Cu^{2+} у середовищі культивування чинить помітний дозозалежний токсичний ефект на клітини штаму NCYC 495/*SNCA-GFP*, особливо в концентраціях 500 та 750 мкМ.

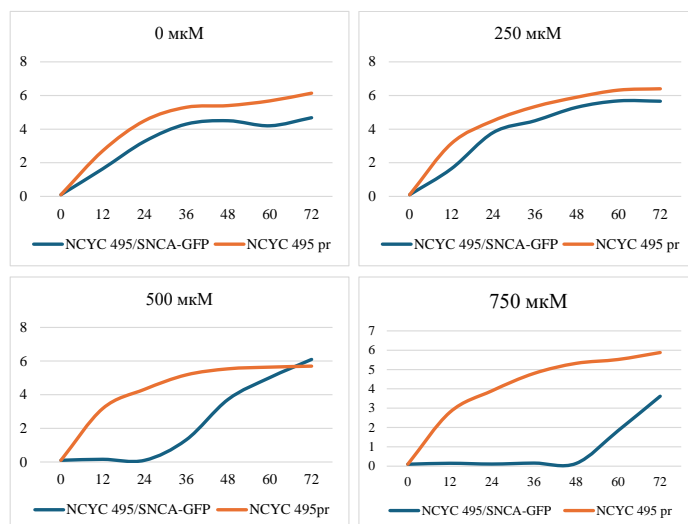


Рис. 1. Кінетики росту штаму дикого типу (NCYC 495 pr) та модельного штаму (NCYC 495/*SNCA-GFP*) дріжджів *O. polymorpha* на середовищах з різними концентраціями CuCl_2

Ріст культури модельного штаму на середовищі з високими концентраціями купрум (II) хлориду характеризувався тривалою лаг-фазою, що свідчило про адаптацію клітин дріжджів до надлишку іонів купруму. На відміну від клітин штаму дикого типу, клітини модельного штаму починали ділитися на 24-ту годину за концентрації іонів купруму 500 мкМ, тоді як за концентрації іонів цього металу 750 мкМ поділ клітин розпочинався на 48-му годину культивування. Імовірно, це пов'язано з тим, що високі концентрації іонів купрум підсилювали токсичний ефект альфа-синуклеїну на клітини NCYC 495/SNCA-GFP.

Підрахунок відсотка мертвих клітин у культурі виявив, що за концентрації 500 мкМ CuCl_2 у ростовому середовищі спостерігався найбільш виражений цитотоксичний ефект для обох досліджуваних штамів, тоді як за концентрації 250 мкМ CuCl_2 такого ефекту не спостерігалося (рис. 2). Оскільки під час вирощування модельного штаму на середовищі з 750 мкМ CuCl_2 приріст біомаси був дуже незначним, така культура була вилучена з аналізу і в подальших дослідженнях не використовувалася.

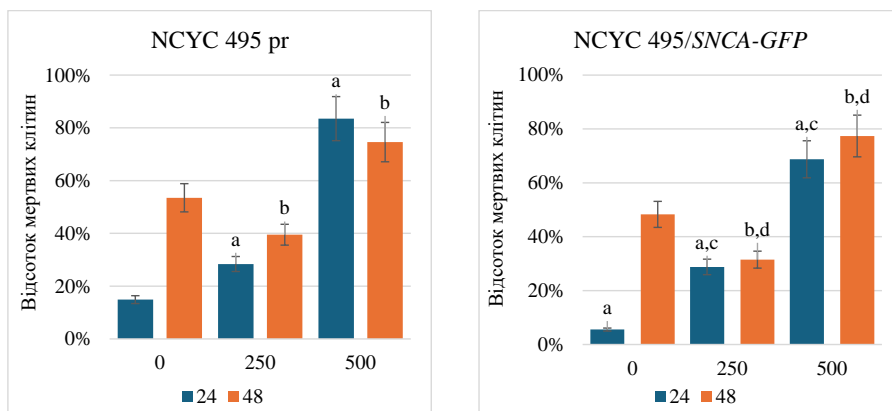


Рис. 2. Відсоток мертвих клітин у культурі штаму дикого типу (NCYC 495 pr) та модельного штаму (NCYC 495/SNCA-GFP) дріжджів *O. polymorpha*, культивованих на мінеральних середовищах без додавання та з додаванням 250 і 500 мкМ CuCl_2

Примітка: тут і в наступних рисунках $p \geq 0,95$, $P \leq 0,05$, а – різниця достовірна порівняно з NCYC 495 pr, вирощеним на середовищі без CuCl_2 на 24-ту годину, b – різниця достовірна порівняно з NCYC495 pr, вирощеним на середовищі без CuCl_2 на 48-му годину, c – різниця достовірна порівняно з NCYC 495/SNCA-GFP, вирощеним на середовищі без CuCl_2 на 24-ту год, d – різниця достовірна порівняно з NCYC 495/SNCA-GFP, вирощеним на середовищі без CuCl_2 на 48-му годину.

Вміст АФО та активність каталази в клітинах штамів *O. polymorpha* за умов надлишку Cu^{2+} в культуральному середовищі

Раніше в експериментах *in vitro* та *in vivo* було з'ясовано, що оксидативний стрес у дофамінергійних нейронах мозку може сприяти агрегації альфа-синуклеїну. Крім того, надекспресія або аномальний фолдинг цього білка, особливо його мутантних форм, також пов'язані зі збільшенням продукції АФО [11]. Оскільки купрум належить до когорти металів, асоційованих із розвитком оксидативного стресу, наступним завданням нашої роботи було дослідити кумулятивний ефект надлишку іонів цього металу та надекспресії альфа-синуклеїну на продукцію АФО в клітинах модельного штаму дріжджів (рис. 3).

Зокрема, було з'ясовано, що на 48-му годину росту штаму NCYC 495/*SNCA-GFP* за умов надлишку іонів купруму (250 мкМ) кількість клітин, у яких детектується АФО, є нижчою, ніж у штаму дикого типу (рис. 3А). Імовірно, це зумовлено хелаторними властивостями білка альфа-синуклеїну щодо іонів купруму. Таким чином, можна припустити, що завдяки альфа-синуклеїну внутрішньоклітинна концентрація іонів цього металу є меншою, ніж у штаму дикого типу, культивованого за тих самих умов, що і є причиною нижчого рівня АФО у клітинах модельного штаму.

Слід зазначити, що в модельного штаму максимальне накопичення АФО спостерігалось на 48-му годину культивування за концентрації 500 мкМ іонів купруму в ростовому середовищі. Можна припустити, що тривале вирощування модельного штаму в умовах надлишку купрум (II) хлориду призводить до зростання рівня АФО внаслідок виснаження сайтів зв'язування іонів купруму в альфа-синуклеїні.

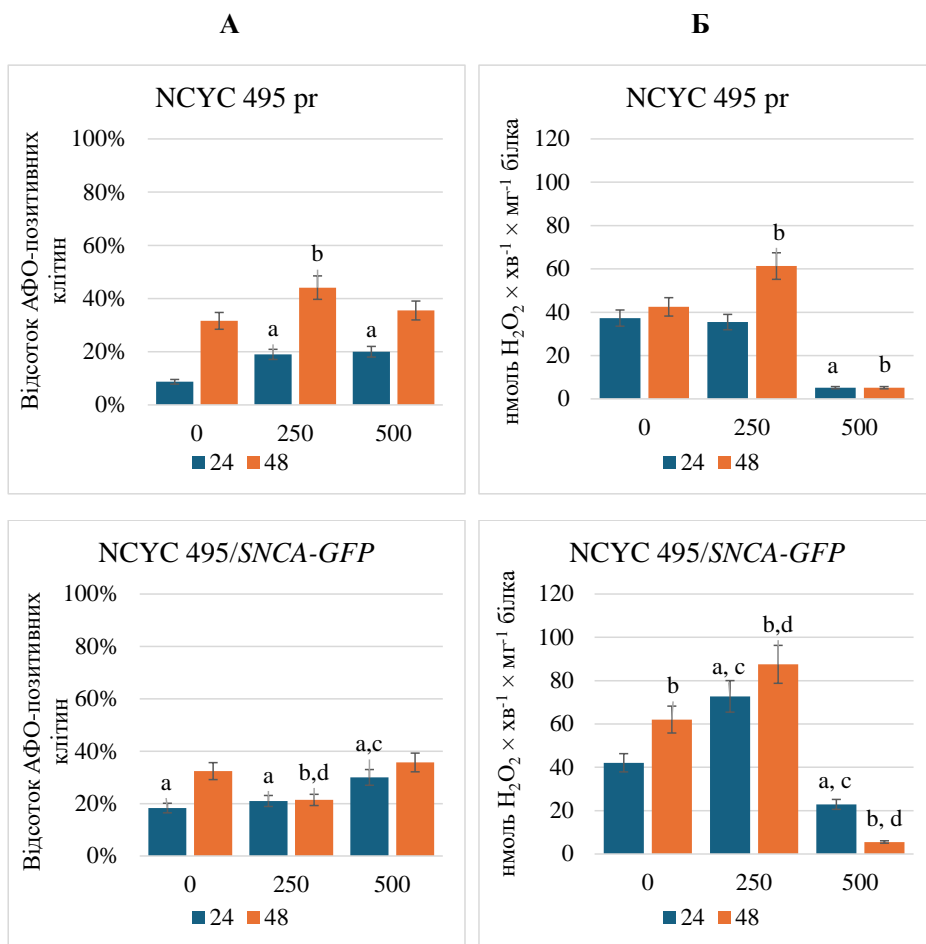


Рис. 3. DCFH-DA-детекція АФО (А) та активність каталази (Б) у клітинах штаму дикого типу (NCYC 495 pr) та модельного штаму (NCYC 495/*SNCA-GFP*) дріжджів *O. polymorpha* на 24-ту, 48-му годину культивування в мінеральному середовищі з додаванням 0, 250 та 500 мкМ CuCl₂

Оскільки в клітинах штаму дикого типу та модельного штаму дріжджів спостерігалось накопичення АФО за умов культивування на середовищі з надлишком іонів купруму, було проведено аналіз активності каталази, як ферменту, субстратом для якого є гідрогену пероксид, а продуктами реакції – вода та молекулярний кисень [12]. Нами було встановлено, що активність каталази є вищою у модельного штаму, ніж у штаму дикого типу. Найвища активність каталази спостерігалася на 48-му годину вирощування штаму NCYC 495/*SNCA-GFP* в умовах надлишку CuCl_2 (250 мкМ) в ростовому середовищі (рис. 3Б). Зниження рівня активності каталази в обох штамів відбувалося на 24-ту і 48-му годину за концентрації 500 мкМ, що може бути спричинено інгібуючим впливом іонів купруму.

Аналіз рівня карбонільних груп білків основного та нейтрального характеру у клітинах за умов надлишку CuCl_2

Окислювальне пошкодження та мітохондріальна дисфункція сприяють каскаду подій, що призводять до дегенерації дофамінергійних нейронів [11]. Однією з таких подій є АФО-опосередковане окиснення білків, що призводить до втрати їхньої фізіологічних функцій, набуття патологічних властивостей, сповільнення їхньої деградації та накопичення всередині нейрона з подальшою агрегацією та утворенням олігомерів і тілець Леві. Тому наступним нашим завданням було проаналізувати, чи призводить зростання рівня АФО на тлі надлишку іонів купруму в середовищі культивування до підвищення вмісту окиснених білків у клітинах модельного штаму та штаму дикого типу.

Проаналізувавши отримані дані, ми встановили, що в разі вирощування досліджуваних штамів на середовищі з надлишковим вмістом купрум хлориду (250 і 500 мкМ) вміст карбонільних груп у білках модельного штаму дріжджів є вищим порівняно зі штамом дикого типу (рис. 4).

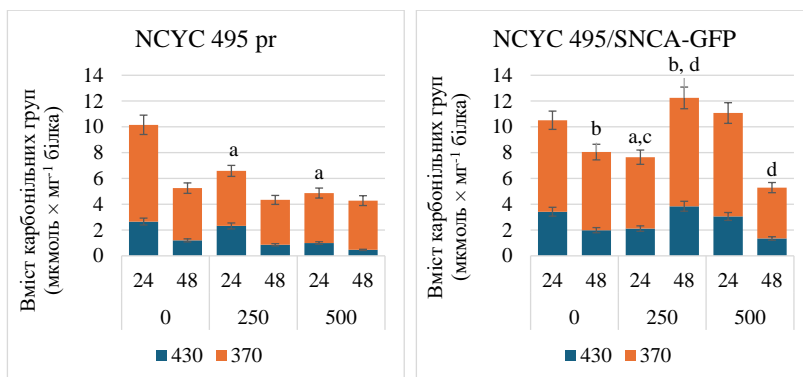


Рис. 4. Вміст карбонільних груп білків у безклітинних екстрактах штаму дикого типу (NCYC 495 pr) та модельного штаму (NCYC 495/*SNCA-GFP*) дріжджів *O. polymorpha* на 24-ту та 48-му годину культивування в середовищі без додавання та з додаванням 250 мкМ та 500 мкМ Cu^{2+}

Зростання вмісту карбонільних груп у білках модельного штаму можна пояснити тим, що в клітинах NCYC 495/*SNCA-GFP* у великій кількості наявний білок альфа-синуклеїн, багатий на пролін, лізин, аргінін і треонін, які за взаємодії з АФО утворюють додаткові карбонільні групи.

Вплив різних концентрацій іонів Cu^{2+} на агрегацію альфа-синуклеїну

Відомо, що за патологічних умов білки можуть утворювати олігомери та фібрили, формуючи токсичні амілоїдогенні конформації, особливо багаті на бета-листові структури. Дослідження *in vitro* довели, що наявність купруму в мілімолярних концентраціях спричиняє утворення частково згорнутих амілоїдогенних конформацій білка, які є більш схильними до агрегації [13].

Методом флуоресцентної мікроскопії в клітинах модельного штаму дріжджів *O. polymorpha* було досліджено властивості альфа-синуклеїну, кон'югованого із зеленим флуоресцентним білком. У нашому дослідженні GFP слугував міткою для візуалізації внутрішньоклітинної локалізації людського білка. Було з'ясовано, що іони купруму в модельного штаму дріжджів не впливають на здатність альфа-синуклеїну до агрегації, оскільки утворення видимих агрегатів цього білка не спостерігалось впродовж усього періоду вирощування культури (рис. 5).

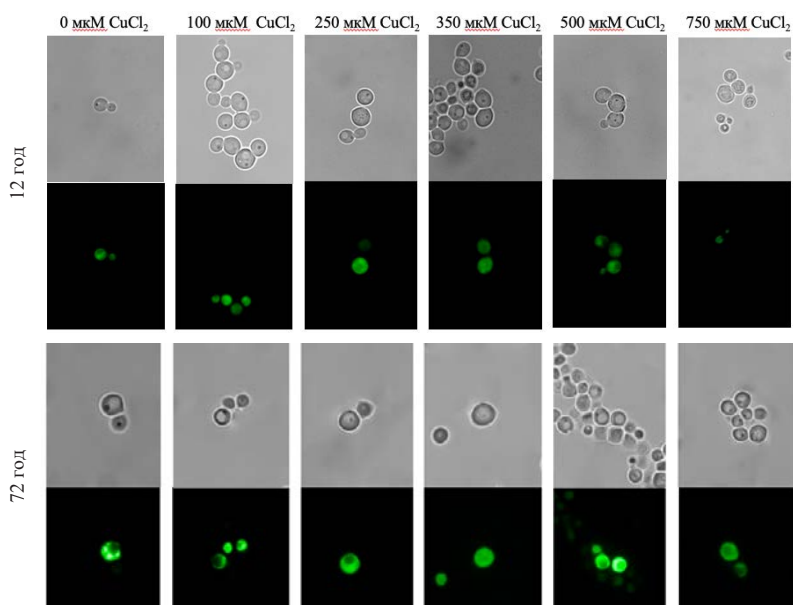


Рис. 5. Флуоресцентні мікрофотографії клітин модельного штаму *O. polymorpha* NCYC 495/*SNCA-GFP*, вирощеного в середовищі з додаванням різних концентрацій Cu^{2+} на 12-ту та 72-гу годину культивування

Однією з можливих причин відсутності візуалізованих агрегатів є те, що іони купруму можуть викликати олігомеризацію альфа-синуклеїну, без утворення фібрил і великих білкових агрегатів. У деяких дослідженнях було з'ясовано, що альфа-синуклеїнові олігомери мають більш виражений цитотоксичний ефект порівняно з великими агрегатами цього білка [14]. Саме тому, за нашим припущенням, модельний штам є більш чутливим до підвищених концентрацій купруму в ростовому середовищі порівняно зі штамом дикого типу, у якого не синтезується людський альфа-синуклеїн.

Прогнозування сайтів зв'язування Cu^{2+} з альфа-синуклеїном людини

У наших попередніх дослідженнях було отримано опосередковане підтвердження здатності надлишку CuCl_2 підсилювати цитотоксичний ефект альфа-синуклеїну на

клітини модельного штаму дріжджів завдяки потенційним хелаторним властивостям цього білка щодо іонів купруму. З огляду на це, було проведено віртуальне моделювання взаємодії альфа-синуклеїну з іонами Cu^{2+} . За допомогою онлайн-платформи MIB: Metal Ion-Binding site prediction server (<http://combio.life.nctu.edu.tw/MIB2/>, рис. 6) було прогнозовано потенційні сайти зв'язування Cu^{2+} в молекулі альфа-синуклеїну.

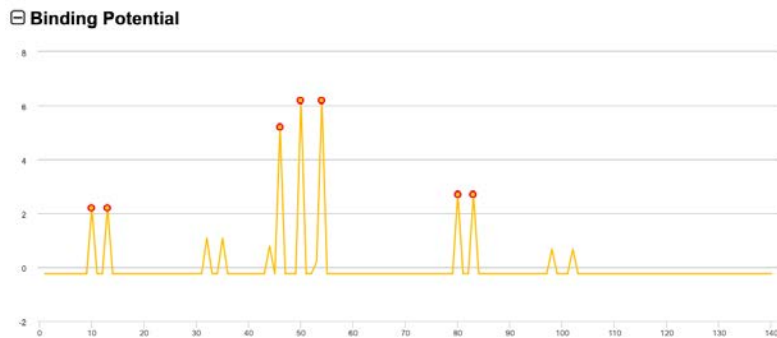


Рис. 6. Потенційні сайти зв'язування Cu^{2+} в молекулі альфа-синуклеїну. Локалізація сайтів зв'язування Cu^{2+} в поліпептидному ланцюзі альфа-синуклеїну

Зокрема, було виявлено 5 сайтів зв'язування Cu^{2+} в С-кінцевій ділянці альфа-синуклеїну та 2 сайти зв'язування в ділянці неамілоїдного компонента (НАС) цього білка. Вважається, що взаємодія між С-кінцевим доменом і НАС-ділянкою альфа-синуклеїну відповідає за інгібування його агрегації [15]. Оскільки в обох цих ділянках виявлено потенційні сайти зв'язування купруму, який нейтралізує заряд амінокислот, що вступають із ним у взаємодію, це може сприяти агрегації альфа-синуклеїну й утворенню олігомерів і більш складних структур цього білка, підвищуючи його токсичний вплив на клітини.

ВИСНОВКИ

Опираючись на отримані дані, було з'ясовано, що збільшення концентрації Cu^{2+} у середовищі культивування чинить помітний токсичний ефект на клітини штаму NCYC 495/*SNCA-GFP* порівняно зі штамом NCYC 495 pr. Найбільш виражений цитотоксичний ефект спостерігався на середовищі з 500 і 750 мкМ CuCl_2 , тоді як за 250 мкМ CuCl_2 такого ефекту не було. У модельного штаму дріжджів кількість клітин, у яких детектувалися АФО, була нижчою за впливу всіх досліджуваних концентрацій іонів купруму порівняно зі штамом дикого типу. Імовірно, це пов'язано з хелаторними властивостями білка альфа-синуклеїну щодо іонів цього металу. У рекомбінантного штаму NCYC 495/*SNCA-GFP*, культивованого на середовищі з CuCl_2 у концентрації 250 мкМ, активність каталази була найвищою. Рівень активності цього ферменту в обох штамів зменшувався за концентрації 500 мкМ, що може бути спричинено інгібуючим впливом іонів купруму, які є в надлишку. Слід зазначити, що надлишок іонів купруму впливав на зростання рівня карбонільних груп у білках штаму NCYC 495/*SNCA-GFP* порівняно зі штамом дикого типу. Іони купруму не впливали на здатність альфа-синуклеїну до агрегації, хоча *in silico* в структурі альфа-синуклеїну було виявлено

потенційні сайти зв'язування з іонами цього металу, із чого можна припустити, що така взаємодія може підвищувати цитотоксичний вплив людського альфа-синуклеїну на клітини модельного штаму дріжджів *O. polymorpha* NCYC 495/*SNCA-GFP*, не призводячи до утворення помітних агрегатів цього білка. Закономірності впливу іонів купруму на цитотоксичність гетерологічного альфа-синуклеїну людини будуть предметом наших подальших досліджень.

ПОДЯКА

Це дослідження було підтримано Фондом Саймонса (Simons Foundation), грант (award) № 1030281.

ЛІТЕРАТУРА

1. Han D., Zheng W., Wang X., Chen Z. Proteostasis of α -Synuclein and Its Role in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2020. Vol. 14. P. 45. URL: <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00045>.
2. Stefanis L. α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012. Vol. 2, No. 2. P. a009399. URL: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>.
3. Bisaglia M., Bubacco L. Copper Ions and Parkinson's Disease: Why Is Homeostasis So Relevant? *Biomolecules*. 2020. Vol. 10, No. 2. P. 195. URL: <https://doi.org/10.3390/biom10020195>.
4. Gaetke L. M., Chow-Johnson H. S., Chow C. K. Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Archives of toxicology*. 2014. Vol. 88, No. 11. P. 1929–1938. URL: <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1355-y>.
5. Shadrina M., Slominsky P. Modeling Parkinson's Disease: Not Only Rodents? *Frontiers in aging neuroscience*. 2021. Vol. 13. P. 695718. URL: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.695718>.
6. Denega I.O., Klymyshyn N.I., Sybirna N.O., Stasyk O.V., Stasyk O.G. Modeling of molecular processes underlying Parkinson's disease in cells of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Studia Biologica*. 2014. Vol. 8, No. 2. P. 5–16.
7. Hrushanyk N.V., Fedorko Y.I., Stasyk O.V., Stasyk O.G. Construction of model strain of yeast *Saccharomyces cerevisiae* with regulated expression of recombinant human alpha-synuclein.
8. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. L., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951. Vol. 193, No. 1. P. 265–275. DOI: 10.1016/s0021-9258(19)52451-6.
9. Мосійчук Н. М., Семчишин Г. М., Байляк М. М., Кубрак О. І., Гусак В. В., Ровенко Б. М., Абраг О. Б. Дослідження вільнорадикальних процесів у живих організмах. 2014. 32 с.
10. Brown D.R. Metal binding to alpha-synuclein peptides and its contribution to toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009. Vol. 380, No. 2. P. 377–381. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.01.103.
11. Dias V., Junn E., Mouradian M.M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease*. 2013. Vol. 3, No. 4. P. 461–491. URL: <https://doi.org/10.3233/JPD-130230>.
12. Shields H.J., Traa A., Van Raamsdonk J.M. Beneficial and Detrimental Effects of Reactive Oxygen Species on Lifespan: A Comprehensive Review of Comparative and Experimental Studies. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2021. Vol. 9. P. 628157. URL: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.628157>.
13. Gromadzka G., Tarnacka B., Flaga A., Adamczyk A. Copper Dyshomeostasis in Neurodegenerative Diseases—Therapeutic Implications. *International journal of molecular sciences*. 2020. Vol. 21, No. 23. P. 9259. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms21239259>.

14. Wan O.W., Chung K.K. The role of alpha-synuclein oligomerization and aggregation in cellular and animal models of Parkinson's disease. *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7, No. 6. P. e38545. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038545>.
15. Emamzadeh F.N. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2016. Vol. 21. P. 29. URL: <https://doi.org/10.4103/1735-1995.181989>.

REFERENCES

1. Han, D., Zheng, W., Wang, X., & Chen, Z. (2020). Proteostasis of альфа-Synuclein and Its Role in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 45. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00045>.
2. Stefanis, L. (2012). α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2 (2), a009399. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>.
3. Bisaglia, M., & Bubacco, L. (2020). Copper Ions and Parkinson's Disease: Why Is Homeostasis So Relevant? *Biomolecules*, 10 (2), 195. <https://doi.org/10.3390/biom10020195>.
4. Gaetke, L.M., Chow-Johnson, H.S., & Chow, C.K. (2014). Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Archives of toxicology*, 88 (11), 1929–1938. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1355-y>.
5. Shadrina, M., & Slominsky, P. (2021). Modeling Parkinson's Disease: Not Only Rodents? *Frontiers in aging neuroscience*, 13, 695718. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.695718>.
6. Denega, I.O., Klymyshyn, N.I., Sybirna, N.O., Stasyk, O.V., & Stasyk, O.G. (2014). Modeling of molecular processes underlying Parkinson's disease in cells of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Studia Biologica*, 8 (2), 5–16.
7. Hrushanyk, N.V., Fedorko, Y.I., Stasyk, O.V., & Stasyk, O.G. (n.d.). Construction of model strain of yeast *Saccharomyces cerevisiae* with regulated expression of recombinant human alpha-synuclein.
8. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A.L., Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1), 265–275. DOI: 10.1016/s0021-9258(19)52451-6.
9. Mosiychuk, N.M., Semchyshyn, G.M., Bailiak, M.M., Kubrak, O.I., Gusak, V.V., Rovenko, B.M., Abrat, O.B. (2014). Study of free radical processes in living organisms, 32 p.
10. Brown, D.R. (2009). Metal binding to alpha-synuclein peptides and its contribution to toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380 (2), 377–381. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.01.103.
11. Dias, V., Junn, E., & Mouradian, M.M. (2013). The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease*, 3 (4), 461–491. <https://doi.org/10.3233/JPD-130230>.
12. Shields, H.J., Traa, A., & Van Raamsdonk, J.M. (2021). Beneficial and Detrimental Effects of Reactive Oxygen Species on Lifespan: A Comprehensive Review of Comparative and Experimental Studies. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 628157. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.628157>.
13. Gromadzka, G., Tarnacka, B., Flaga, A., & Adamczyk, A. (2020). Copper Dyshomeostasis in Neurodegenerative Diseases-Therapeutic Implications. *International journal of molecular sciences*, 21 (23), 9259. <https://doi.org/10.3390/ijms21239259>.
14. Wan, O.W., & Chung, K.K. (2012). The role of alpha-synuclein oligomerization and aggregation in cellular and animal models of Parkinson's disease. *PLoS ONE*, 7 (6), e38545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038545>.
15. Emamzadeh, F.N. (2016). Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 21, 29. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.181989>.

ABSTRACT

COPPER (II) IONS ENHANCE THE CYTOTOXIC EFFECT OF RECOMBINANT HUMAN ALPHA-SYNUCLEIN ON *OGATAEA POLYMORPHA* YEAST CELLS

It is known that protein aggregates in the neurons of individuals suffering from Parkinson's disease (PD) contain elevated levels of certain metal ions, such as zinc, iron, and copper. By interacting with proteins, these metals affect the properties of brain regions and lead to neurodegenerative changes. Currently, a wide range of models is available for studying various aspects of PD pathogenesis *in vivo*, utilizing different model organisms – from unicellular eukaryotes to primates. As an artificial model of PD in our study, we used the yeast *Ogataea polymorpha* with constitutive expression of the recombinant human alpha-synuclein protein, the main toxic factor in PD. The aim of the study was to investigate the impact of excess copper ions in the growth medium on the physiological properties of *O. polymorpha* cells with constitutive expression of alpha-synuclein. Yeast strains were grown on YPS rich medium (1% yeast extract, 1% bactopectone, 1% sucrose), YNB mineral medium (0.67% yeast nitrogen base (Difco), 0.5% ammonium sulfate, and 2% sucrose). For solid media, agar was added at a concentration of 2%. The culture temperature was 37°C and the aeration conditions were shaking (200 rpm). All experiments were replicated at least three times. Statistical analysis was performed using the Student's t-test. Results are presented as means with standard errors. Values with $P \leq 0.05$ were considered.

During the study, it was established that increasing the concentration of Cu^{2+} in the growth medium to 500 and 750 μM CuCl_2 caused a significant toxic effect on the cells of the model strain (NCYC 495/*SNCA-GFP*) compared to the wild-type strain (NCYC 495 pr). It was also found that, under these cultivation conditions, the level of ROS, specifically hydrogen peroxide, was lower in the model yeast strain than in the wild-type strain. This is likely due to the chelating properties of the alpha-synuclein protein towards copper ions, which limited the involvement of this metal in initiating oxidative stress and, consequently, reduced ROS production.

Since hydrogen peroxide is the primary substrate of catalase, an enzyme in the antioxidant defense system, the activity of this enzyme was analyzed under excess copper ion conditions in the growth medium. At a Cu^{2+} concentration of 250 μM , catalase activity in both studied yeast strains was the highest, but it decreased at 500 μM . This effect can be explained by the fact that, at high concentrations, copper acts as a denaturing agent for the catalase protein, leading to its inactivation.

It should be noted that excess Cu^{2+} ions did not cause alpha-synuclein aggregation but did enhance the cytotoxic effect of this protein on the cells of the model strain.

Key words: alpha-synuclein, Parkinson's disease (PD), copper, yeast *Ogataea polymorpha*.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported in part by Simons Foundation, Award No 1030281.