

Received: 2011.01.29  
Accepted: 2011.04.28  
Published: 2011.06.02

## Drożdże jako model w badaniach chorób neurodegeneracyjnych\*

### Yeast as a model for studying neurodegeneration

Donata Wawrzycka

Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Biologii Roślin, Uniwersytet Wrocławski

#### Streszczenie

Drożdże piekarnicze *Saccharomyces cerevisiae* są najlepiej poznanymi na poziomie genetyki i fizjologii komórki organizmami eukariotycznymi. Konserwatywność molekularnych mechanizmów komórkowych między drożdżami a człowiekiem pozwala na użycie komórek *S. cerevisiae* jako modelu do badań mechanizmów doprowadzających do różnych chorób człowieka. Obecnie drożdże, choć pozbawione układu nerwowego, z powodzeniem używane są do badań schorzeń neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona czy choroba Huntingtona. Szeroki warsztat metod biologii molekularnej umożliwia zarówno badanie homologów ludzkich genów w komórkach drożdży, jak i heterologiczną ekspresję ludzkich białek. Przyczyny patologicznych zmian w ukształtowaniu białka, mutacje powodujące zmianę funkcji lub tworzenie toksycznych agregatów – wszystkie te aspekty mogą i z powodzeniem są badane z użyciem modelu drożdżowego. W pracy przedstawiono obecny stan wykorzystania modelu drożdżowego w badaniach nad wyjaśnieniem mechanizmów doprowadzających do schorzeń neurodegeneracyjnych.

#### Słowa kluczowe:

*Saccharomyces cerevisiae* • drożdże • choroby neurodegeneracyjne • choroba Alzheimera • choroba Parkinsona • choroba Huntingtona • amyloidozy

#### Summary

At the level of genetics and physiology the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the best characterized eukaryotic cells. The yeast cells can be used as a model to study the mechanisms involved in human disease. Yeast shares conserved cellular mechanisms with all eukaryotes including mammals and human. Nowadays, despite the lack of a neural system, yeasts are successfully used in the study of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease, Huntington's disease and Parkinson's disease. Exquisite genetics and molecular tools used in biology allow examination of the role of yeast homologues of human genes as well as heterologous expression of human genes in yeast. Yeasts have become a suitable model to study the causes of pathological changes in protein folding, mutations and formation of aggregates.

#### Key words:

*Saccharomyces cerevisiae* • yeast • neurodegenerative disease • Alzheimer's disease • Huntington's disease • amyloidosis

#### Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=945767>

\* Praca częściowo finansowana z 1014/5/IBR/2011.



**Word count:** 4382  
**Tables:** 1  
**Figures:** –  
**References:** 98

**Adres autorki:** dr Donata Wawrzycka, Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Biologii Roślin, Uniwersytet Wrocławski, ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław; e-mail: donata.wawrzycka@biol.uni.wroc.pl

**Wykaz skrótów:** **AD** – choroba Alzheimer; **APP** – białko prekursorowe APP; **A $\beta$**  – amyloid beta; **C99** – domena błonowa APP; **FAD** – postać rodzinna AD; **HD** – choroba Huntingtona; **Htt** – huntingtyna; **PD** – choroba Parkinsona; **poliQ** – N-terminalna domena Htt z powtórzeniami glutaminy; **SAD** – postać sporadyczna AD; **tau** – białko tau.

## WSTĘP

Drożdże piekarnicze *Saccharomyces cerevisiae* od wieków towarzyszą człowiekowi. Są modelowym organizmem biologii molekularnej eukariotów. Łatwe w hodowli, tanie w utrzymaniu, nietoksyczne, niepatogenne są dobrym materiałem w badaniach. Drożdże odegrały dużą rolę w poznaniu biologii komórki eukariotycznej, zwłaszcza w dziedzinie genetyki i biogenezy mitochondriów, a także dziedziczeniu mejotycznym. Sekwencja genomu drożdżowego została opublikowana w 1996 r. [32]. Znacznie ułatwiło to badania nad genomami różnych organizmów. Umożliwia to określenie homologii między genami drożdżowymi i pozostałych organizmów eukariotycznych, w tym człowieka. Łatwość wprowadzania pojedynczych mutacji w DNA lub wręcz usuwania całych genów pozwala na badanie bezpośredniej roli genów poprzez obserwacje wynikające z mutacji zmian fenotypowych komórki. Możliwa jest również heterologiczna ekspresja genów innych eukariotów w komórkach drożdży i obserwacje wpływu ich produktów na cykl życiowy, morfologię czy fizjologię drożdży. Możliwość dedukcji funkcji ludzkich białek na podstawie badania roli ich drożdżowych homologów zaowocowało pomysłem badania białek ludzkich przez ich bezpośrednie ekspresjonowanie w komórkach *Saccharomyces cerevisiae*. Możliwość heterologicznej ekspresji nabrała większego znaczenia kiedy okazało się, że wiele chorobotwórczych lub wręcz letalnych mutacji znajduje się w genach ludzkich, które mają ortologii w genomie drożdży. W obu przypadkach badania drożdżowych homologów genów ludzkich i badania bezpośredniej heterologicznej ekspresji są bardzo ważne i stanowią duży krok w kierunku zrozumienia mechanizmu transformacji nowotworowych.

Od prawie 30 lat drożdże z powodzeniem są używane jako mikrofabryki do produkcji leków np. hirudiny, szczepionek na wirusowe zapalenie wątroby typu B czy insuliny. Od kilku lat specjalnie uzdatnione szczepy drożdżowe używane są do produkcji małych molekuł np. hydrokortyzonu czy artemisyny [78]. W drożdżach upatruje się kandydatów do produkcji szczepionek antynowotworowych. Ponadto drożdże odegrały i nadal mają ogromne znaczenie w badaniach nad zjawiskiem wielolekowej oporności. Bezpośrednie badania na drożdżach pozwoliły na szeroką, szczegółową charakterystykę białek z rodziny ABC transporterów, głównych mediatorów wielolekowej oporności u prokariotów i eukariotów [9].

Obecnie w drożdżach upatruje się szansę na zrozumienie mechanizmów i opracowanie metod walki z chorobami

cywilizacyjnymi o ogromnym znaczeniu ekonomicznym i społecznym. W ciągu ostatnich kilku lat drożdże stały się doskonałym modelem badań molekularnych mechanizmów związanych z różnymi zaburzeniami neurodegeneracyjnymi spowodowanymi złym fałdowaniem patogennych białek: choroby Alzheimer (AD), choroby Huntingtona (HD), choroby Parkinsona czy chorób związanych z agregacją białka tau [2,90] (tabela 1). Poniżej podjęto próbę przedstawienia wykorzystania drożdży w badaniach chorób neurodegeneracyjnych.

## CHOROBY NEURODEGENERACYJNE JAKO WYNIK BŁĘDÓW W FAŁDOWANIU BIAŁEK

Choroby neurodegeneracyjne, takie jak PD, AD i HD należą do schorzeń spowodowanych nieprawidłowym fałdowaniem białek, amyloidoz. Uważa się, że głównym powodem tych chorób jest nieprawidłowe fałdowanie konkretnych białek, które zaczynają przyjmować anormalne konformacje sprzyjające agregacji i tworzeniu złogów amyloidowych. W wyniku utatwionej agregacji, białka te przybierają postać nierozpuszczalnych fibrylarnych struktur, które tworzą złogi wewnątrz komórek lub w przestrzeniach międzykomórkowych. Kompozycja złogów i ich umiejscowienie w tkankach lub organach jest swoista dla każdej choroby. Następstwem nieprawidłowego fałdowania białek jest utrata funkcji lub nabycie toksycznych właściwości, co w obu przypadkach może doprowadzić do śmierci organizmu [43,65]. Złogi amyloidowe przyjmują zawsze, bez względu jakie białko je tworzy, postać fibryli o strukturze  $\beta$ -kartki. Pojawianie się amyloidów, złogów białkowych, powiązane z pojawiającymi się zaburzeniami organów. Choć znamy już wiele białek tworzących złogi amyloidowe, w większości niewyjaśniona jest ich funkcja w komórce. Trudno więc określić co powoduje nagłą zmianę konformacji białka prowadzącą do utraty naturalnej funkcji lub nadającej białku nowej, acz toksycznej cechy. Początkowo uważano, że pojawienie się nierozpuszczalnych złogów w komórce zawsze wiązało się z działaniem cytotoksycznym. Obecne badania wykazują, że prawdopodobnie cytotoksyczne właściwości mają tylko małe agregaty (dimery i oligomery), podczas gdy duże złogi mogą mieć właściwości ochraniające komórkę [1,5,11,59,61].

Drożdże *S. cerevisiae*, to organizmy jednokomórkowe, choć pozbawione systemu nerwowego są doskonałym modelem do badania ludzkich chorób neurodegeneracyjnych, ponieważ większość ścieżek sygnałowych i białek związanych z chorobami neurologicznymi jest konserwatywna u eukariota.

Tabela 1. Przykłady wykorzystania *Saccharomyces cerevisiae* w badaniach mechanizmów wybranych chorób neurodegeneracyjnych

Typ choroby i czynniki chorobotwórcze	Wykorzystanie modelu drożdżowego	Przykładowe prace
<b>Choroba Alzheimerera</b>		
Proteoliza białka prekursorowego APP	<ul style="list-style-type: none"> <li>ekspresja ludzkiego APP w drożdżach</li> <li>koekspresja ludzkiego APP z <math>\gamma</math>- sekretazą</li> <li>badanie potranslacyjnych modyfikacji APP</li> <li>przeszukiwanie kolekcji mutantów delecyjnych w celu identyfikacji inhibitorów proteolizy APP</li> </ul>	[96] [25,76,92] [54] [97]
A $\beta$ oligomeryzacja	<ul style="list-style-type: none"> <li>badanie lokalizacji białka A<math>\beta</math>-GFP w komórkach drożdży</li> <li>badania <i>in vivo</i> dynamiki agregacji systemem 2-hybrydowego lub ekspresji A<math>\beta</math>-Sup35</li> </ul>	[8] [39,40,86]
Toksyczność zewnątrzkomórkowych form A $\beta$	<ul style="list-style-type: none"> <li>badania toksycznego charakteru postaci oligomerycznych i fibrylarnych A<math>\beta</math></li> </ul>	[3]
$\beta$ -sekretaza C99	<ul style="list-style-type: none"> <li>ekspresja ludzkiej <math>\beta</math>-sekretazy w drożdżach</li> <li>ekspresja C99 w komórkach drożdży i badanie warunków proteolizy</li> </ul>	[48] [73]
Tau	<ul style="list-style-type: none"> <li>ekspresja izoform 3R i 4R ludzkiego tau w komórkach drożdżowych</li> <li>badanie roli fosforylacji białka tau</li> </ul>	[81,82] [83]
<b>Choroba Huntingtona</b>		
Htt	<ul style="list-style-type: none"> <li>ekspresja ludzkiego Htt w komórkach drożdży</li> </ul>	[29]
PoliQ	<ul style="list-style-type: none"> <li>ekspresja poliQ w komórkach drożdży</li> <li>określenie lokalizacji poliQ w komórkach drożdży poprzez ekspresję poliQ-GFP</li> <li>wpływ sekwencji otaczających poliQ na toksyczność i agregację</li> <li>analiza kolekcji mutantów drożdżowych w celu wyszukania genów wpływających na toksyczność poliQ</li> <li>identyfikacja inhibitorów cytotoksyczności poliQ</li> </ul>	[44,53] [57] [13,19] [29,89,91] [29,98]
<b>Choroba Parkinsona</b>		
$\alpha$ -synukleina ( $\alpha$ -syn)	<ul style="list-style-type: none"> <li>ekspresja ludzkiej <math>\alpha</math>-synukleiny w komórkach drożdży</li> <li>badanie lokalizacji agregatów <math>\alpha</math>-syn poprzez ekspresję <math>\alpha</math>-syn-GFP w drożdżach</li> <li>wyznaczenie kofaktorów toksyczności (<math>\alpha</math>-syn)</li> <li>identyfikacja chemicznych inhibitorów <math>\alpha</math>-syn</li> </ul>	[60] [17,60,94] [12,34,69,85,89,93] [23,77]

### Drożdże w chorobie Alzheimerera

Szacuje się, że ponad 24 mln ludzi na świecie cierpi na demencje. Choroba Alzheimerera (Alzheimer's disease – AD) jest odpowiedzialna za prawie 60% przypadków demencji [22]. Choroba Alzheimerera to postępująca, degeneracyjna choroba ośrodkowego układu nerwowego związana z podszłym wiekiem. W chorobie Alzheimerera wyróżniamy postać wczesną (przed 65 rokiem życia) i późną (po 65 roku życia). Wyróżniamy postać rodzinną (familial Alzheimer's disease – FAD) i sporadyczną (sporadic Alzheimer's disease – SAD). Rodzinna postać choroby – FAD jest dziedziczona autosomalnie dominująco. Dowiedziono, że większość przypadków FAD wiązała się z mutacjami w genach *APP*, *PSEN1* i *PSEN2*. Postać FAD stanowi jednak tylko 5% przypadków AD, w 95% są to postaci SAD [30,46,70].

Mózg chorego na AD charakteryzuje się głębokim zaniemieniem komórek nerwowych, zwłaszcza neuronów i synaps w regionach mózgu odpowiedzialnych za uczenie i zapamiętywanie. Poza atrofią komórek nerwowych w mózgu

chorych na AD zidentyfikowano zewnątrzkomórkowe płytki amyloidowe zwane płytkami starczymi (senile plaques) i tzw. sploty neurofibrylarne (neurofibrillary tangles – NFT) [62]. Płytki starcze zbudowane są z 39–43 aminokwasowego białka amyloidu  $\beta$  (A $\beta$ ). Białko A $\beta$  jest naturalnym produktem powstałym z cięcia białka prekursorowego APP (amyloid precursor protein). Choć u zdrowych osób wytwarzanie peptydu A $\beta$  nie działa toksycznie, białko to jest głównym elementem wywołującym AD. Zwiększone wytwarzanie A $\beta$  jest powiązane z wczesną postacią AD. Zwiększenie ilości A $\beta$  w komórce wiąże się z mutacją w APP lub kompleksie  $\gamma$ -sekretazy. Kumulowanie się A $\beta$  w komórce lub powstawanie postaci o zwiększonej zdolności do agregacji powoduje powstawanie toksycznych oligomerów [2,42]. W przypadku późnych postaci AD zwiększenie ilości A $\beta$  związane jest raczej z zaburzeniami degradacji białka [15,19].

APP (białko prekursorowe amyloidu) jest białkiem transblonowym zidentyfikowanym w większości organów. Gen kodujący APP jest umiejscowiony na 21 chromosomie



[67]. Przypuszcza się, że białko APP bierze udział w adhezji komórek, migracji i przesyłaniu sygnału nerwowego [2,95]. Białko prekursorowe amyloidu ulega procesowaniu przez sekretazy. Proteoliza katalizowana przez  $\beta$ -sekretazy powoduje powstanie uwalnianej do cytoplazmy N-terminalnej domeny (sAPP $\beta$ ) i związanej z błoną domeny C99. Transbłonowa domena C99 jest następnie cięta przez  $\alpha$ -sekretazę i powstają krótkie fragmenty białek nieskupiających się do amyloidu. Domena C99 może być również cięta przez  $\gamma$ -sekretazę, które to cięcie prowadzi do powstania 40/42 aminokwasowych fragmentów (A $\beta$ 40/42). To właśnie fragmenty A $\beta$ 42 wykazują największą skłonność do agregacji i tworzenia płytek amyloidowych, stanowiących trzon płytek starczych w mózgu chorego na AD [2]. Regulacja i mechanizm katalizowanej przez sekretazy proteolizy białka APP jest wciąż niewyjaśniona. Szansę na wyjaśnienie tych procesów upatruje się w badaniach prowadzonych na komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

W początkowej fazie badań prowadzonych na modelu drożdżowym podjęto próby heterologicznej ekspresji ludzkiego białka APP w komórkach drożdży *S. cerevisiae*. Zhang i wsp. [96] wykazali, że ekspresja ludzkiego białka w komórkach drożdży jest możliwa, a uzyskane białko nie jest dla mikroorganizmu toksyczne. Okazało się jednak, że białko APP podlegało w komórkach drożdży dzieleniu na dwie części. Część odpowiadającą N-terminalnej rozpuszczalnej domenie była usuwana na zewnątrz komórki, natomiast C-terminalna domena pozostawała w cytoplazmie. Wskazywało to na obecność w komórkach drożdży białka o aktywności podobnej do  $\alpha$ -sekretazy ludzkiej [96]. Badania prowadzone na drożdżowych szczepach różnych mutantów delecyjnych wskazywały poszczególne geny i szlaki metaboliczne biorące udział w regulacji lub w procesowaniu APP. W ten sposób określono, że proteoliza APP jest niezależna od systemów transportu do wakuoli lub na powierzchnię komórki, ponieważ białko APP było cięte w mutantach *sec1* i *sec7* [97]. Wykazano jednak zależność proteolizy od sieci białek regulujących proces transportu z retikulum endoplazmatycznego do aparatu Golgiego. Białko APP nie było cięte, kiedy ekspresjonowano je w mutantach *sec17* i *sec18*. Kolejne badania z użyciem drożdżowych mutantów delecyjnych wykazały znaczną redukcję proteolizy APP w komórkach z usuniętym genem proteazy *YAP3* lub proteazy *MKC7*. Inhibicja aktywności proteolitycznej względem APP następowała również w przypadku ekspresji postaci zmutowanej białka APP-K612Q. Wskazuje to na prawdopodobną rolę białek *Yap3* i *Mkc7* w procesie proteolizy APP w późnych pęcherzykach Golgiego [2,97].

Kolejnym procesem badanym w drożdżach była aktywność  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretazy. Beta- i gamma-sekretaza są głównymi białkami powodującymi powstanie zdolnej do agregowania domeny A $\beta$ 42. Dotychczas nie scharakteryzowano żadnej mutacji w genie kodującym  $\beta$ -sekretazę związanej z AD, co więcej tylko w nielicznych przypadkach u chorych na AD stwierdzono podwyższone stężenie  $\beta$ -sekretazy [47]. W jaki więc sposób aktywność  $\beta$ -sekretazy jest regulowana? Aby to wyjaśnić przygotowano specjalnie udoskonalone szczepy *S. cerevisiae*. W komórkach tych C-końcowa transmembranowa część ludzkiego białka APP była podłączona do C-końca drożdżowego enzymu

inwertazy. Inwertaza jest naturalnie wydzielana przez komórkę, co jest warunkiem niezbędnym do wzrostu drożdży na sacharozie, katalizuje bowiem jej rozkład do glukozy i fruktozy [10]. Chybrydowe białko inwertaza-APP ekspresjonowane w komórkach drożdżowych pozbawionych endogennej inwertazy kumulowało się wewnątrz cytoplazmy. Jednoczesna ekspresja ludzkiej  $\beta$ -sekretazy (BACT) umożliwiła wzrost komórek na podłożu z sacharozą dzięki hydrolizie chimerycznego białka i uwalnianiu inwertazy poprzez cięcie APP przez sekretazy [48]. W ten sposób możliwe było przeszukiwanie szerokiej gamy związków w celu wyszukania inhibitorów  $\beta$ -sekretazy.

W procesowaniu APP bierze udział również  $\gamma$ -sekretaza, która nacina domenę C99, uwalniając krótkie 40/42 aminokwasowe fragmenty. Gamma-sekretaza zbudowana jest co najmniej z czterech białek transmembranowych: preseniliny (PS), nicastrin (Nct), anterior pharynx-1 (Aph-1) i presenilin enhancer-2 (Pen-2). Drożdże *S. cerevisiae* nie zawierają białek o aktywności  $\gamma$ -sekretazy. W celu charakterystyki kompleksu  $\gamma$ -sekretazy skonstruowano szczepy drożdżowe pozbawione endogennej peptydazy Pep4, ekspresjonujące ludzkie geny kompleksu  $\gamma$ -sekretazy i białko APP. Wykazano aktywność ludzkiej  $\gamma$ -sekretazy w komórkach drożdży poprzez pojawianie się ciętych postaci APP: A $\beta$ 40, A $\beta$ 42, A $\beta$ 43 [92]. Aktywność składników  $\gamma$ -sekretazy w procesie endoproteolizy związanej z błoną badano w drożdżach również za pomocą systemu genu reporterowego *GAL4* [75]. Gen reporterowy ekspresjonowano w komórkach drożdży z jednoczesną ekspresją poszczególnych komponentów  $\gamma$ -sekretazy. Wykazano w ten sposób zależność aktywności  $\gamma$ -sekretazy od preseniliny (PS1), nicastriny (Nct) Pen-2 i APH-I [75,76]. Użycie systemu drożdżowego pozwoliło na zidentyfikowanie już ponad 15 mutacji w genie *PS1* [25]. Możliwość badania poszczególnych komponentów  $\gamma$ -sekretazy w drożdżach otwiera ogromną szansę na identyfikację mutacji odpowiedzialnych za tworzenie 40–42 aminokwasowych fragmentów o dużej zdolności do agregacji. Niemożliwym jest prowadzenie podobnych badań w systemie ssaczym.

W przypadku spontanicznej późnej postaci AD główną rolę w powstawaniu płytek starczych upatruje się w zaburzeniach systemu degradacji białek przez proteasom. Liczba powstających w wyniku aktywności sekretazy fragmentów C99 zdaje się ważnym elementem warunkującym gromadzenie się płytek starczych [55]. Dzięki użyciu szczepów drożdżowych pozbawionych genów proteasomu *pre1* i *pre2*, wykazano powstawanie większej różnorodności fragmentów z cięcia domeny C99. Dysfunkcja proteasomu powodowała nagromadzenie się C99 i fragmentów powstałych z cięcia tej domeny, które to stawały się substratami dla innych enzymów komórkowych. Możliwe jest więc, że mutacje proteasomu promują powstawanie fragmentów o dużej zdolności do agregacji [2,73].

Białko APP ulega w komórce modyfikacjom, a zachodzące w aparacie Golgiego O-glikozylacja i N-glikozylacja są niezbędne do dojrzewania białka i umiejscowienia w błonie. Ludzkie APP ekspresjonowane w drożdżach ulegało jednak tylko O-mannosylacji, nie obserwowano postaci N-glikozylowanych. Wykazano, że modyfikacja ta zależna jest od *Pmt4p*, gdyż brak tego białka powodował zwolnione dojrzewanie APP, zmniejszone wytwarzanie fragmentów

i agregację. Pozwala to wnioskować, że O-mannosylacja jest potrzebna do utrzymania płynności APP [54].

Ponieważ agregacje domen A $\beta$  są odpowiedzialne za tworzenie płytek starczych użyto drożdży do badania bezpośrednich przyczyn polimeryzacji. W komórkach drożdży obserwowano wewnątrzkomórkowe umiejscowienie złożeń amyloidu. Białko A $\beta$  znakowano GFP (białkiem zielonej fluorescencji). Chimeryczne białko A $\beta$ -GFP i GFP-A $\beta$  ulegało ekspresji w komórkach drożdży, było obserwowane w mikroskopie fluorescencyjnym, a także wykrywane metodą immunodetekcji. Obserwacje w mikroskopie fluorescencyjnym wykazały wewnątrzkomórkowe punktowe umiejscowienie białka A $\beta$ -GFP, natomiast badania immunochemiczne wskazywały na obecność tego białka we frakcjach błonowych [2]. Ekspresja GFP-A $\beta$  wpływała na obniżenie tempa wzrostu komórek i zwiększoną wrażliwość drożdży na szok termiczny, wskazując na ich toksyczność dla drożdży [8].

W drożdżach przeprowadzono również badania *in vivo* dynamiki agregacji A $\beta$ 42. W tym celu użyto systemu dwuhybrydowego, w którym użyto A $\beta$ 42 związanego do LexA, domeny wiążącej do DNA (jako bait) i B42 domenę aktywującą (jako prei). Interakcja białek w komórkach *S. cerevisiae* wykazywana była jako ekspresja genu *lacZ* i *LEU2* pod kontrolą promotora zależnego od LexA. Badając mutanty A $\beta$ F19T, F20T wykazano obecność swoistych interakcji między domenami A $\beta$ , których nie obserwowano w przypadku postaci zmutowanych [40].

W badaniach związków wpływających na ekspresję A $\beta$  wykazano, że kwas foliowy powoduje zwiększenie fluorescencji GFP-A $\beta$  w komórkach drożdży pozbawionych endogennej syntezy kwasu foliowego. Kwas foliowy jest związkiem o właściwościach antyoksydacyjnych. Przypuszcza się, że nagromadzenie złożeń uaktywnia szlak szoku oksydacyjnego [49].

W badaniach warunków oligomeryzacji A $\beta$  wykorzystano również białko Sup35. Proteina Sup35 jest niezbędna do życia komórki drożdżowej. Białko to ma jednak N-terminalną domenę charakterystyczną dla białek prionowych, która warunkuje agregację Sup35. Konsekwencją agregacji jest utrata aktywności białka. Używając szczepów drożdżowych, gdzie N-terminalna domena białka Sup35 była zastąpiona przez różne wersje mutowanych A $\beta$ 42, a aktywność tych postaci była badana jako zdolność do odtworzenia wzrostu na podłożu bez adeniny (mutant *ade1-14*) identyfikowano aminokwasy odpowiedzialne za swoistą własną agregację A $\beta$  [39,86].

Użycie modelu drożdżowego pozwoliło na ustalenie warunków odpowiednich do badań nad toksycznym charakterem niefibrilarnych i fibrilarnych postaci A $\beta$ 42. Prowadzenie badań nad toksycznością A $\beta$ 42 bezpośrednio w komórkach ludzkich jest utrudnione ze względu na występowanie różnych postaci białka: toksycznych i naturalnie występujących w komórce. Dodatkowym utrudnieniem jest niecałkowita sekrecja A $\beta$ 42 do przestrzeni międzykomórkowych. Bharadwaj i wsp. [3] wykorzystali nowy system do badań toksycznego charakteru A $\beta$ 42 w komórkach drożdży *S. cerevisiae*. W komórkach ludzkich do badań używano odpowiednich podłoży i serum, uzyskiwano więc

zawsze mieszaninę różnych postaci A $\beta$ 42. Nowa metoda polega na badaniu toksyczności A $\beta$ 42 w roztworach wodnych, w warunkach, które umożliwiają stabilizację poszczególnych izoform A $\beta$ 42. Uzyskanie stabilnej postaci oligomerycznej czy fibrylarnej białka A $\beta$ 42 pozwala na badanie i porównywanie właściwości poszczególnych postaci. Używając testów przeżywalności drożdży wykazano, że toksyczny charakter A $\beta$ 42 jest zależny od ilości białka, a rozpuszczalna postać oligomeryczna jest znacznie bardziej toksyczna niż fibrilarna [3]. Potwierdzono w ten sposób obserwacje, że zwiększona ekspresja białka APP i tworzenie płytek starczych poprzez oligomeryzację A $\beta$ 42 jest główną przyczyną dysfunkcji systemu nerwowego w chorobie Alzheimera. Testy przeżywalności komórek drożdżowych umożliwiają również badanie wpływu różnych warunków fizycznych i chemicznych na żywotność komórek drożdżowych ekspresjonujących poszczególne izoformy A $\beta$ 42. Zwiększa to znacznie szanse na identyfikację potencjalnych inhibitorów toksycznych postaci A $\beta$ 42.

Z chorobą Alzheimera powiązано również białko tau. Białko tau jest proteiną wchodzącą w interakcje z mikrotubulami. Uważa się, że fizjologiczną rolą białka tau jest stabilizacja mikrotubul, regulacja transportu aksonalnego w mózgu i stabilizacja struktury neuronów. Wiązanie tau z mikrotubulami regulowane jest poprzez fosforylację. Zaburzenia fosforylacji tau, a zwłaszcza hiperfosforylacja tego białka doprowadza do zaburzeń i zmian patologicznych. Zmienione białko wykazuje słabsze wiązanie do tubuliny i tendencję do agregacji tworząc podwójne skręcone filamenty (paired helical filaments – PHU-tau). Patologiczne agregaty PHU-tau stwierdzono u chorych na AD, a także w otępieniu czołowo-skroniowym, zwyrodnieniu korowo-podstawnym i postępującym porażeniu nadjądrowym. Wszystkie te schorzenia określane są jako tauopatie [18,45,50,68]. W komórce powstaje sześć izoform białka tau, wszystkie są wynikiem alternatywnego splicingu mRNA genu *17g21-22*. Izofomy różnią się liczbą dodatkowych powtórzeń na N-końcu białka (izoformy 0N, 1N, 2N) i powtórzeń na C-końcu białka odpowiedzialnych za wiązanie z mikrotubulami (izoformy 3R i 4R). Z sukcesem ekspresjonowano ludzkie białko tau w komórkach drożdżowych w systemie heterologicznej ekspresji [82]. Wykazano, że tau-3R i tau-4R wykazują tendencję do agregacji w komórkach drożdżowych. Za fosforylację i agregację białka tau w komórkach drożdży odpowiedzialne są kinazy Mds1 i Pho85 [81]. Obecnie zmapowano już ponad 40 mutacji powodujących tauopatie [63,64]. Serie klinicznie diagnozowanych mutantów tau ekspresjonowano w drożdżach w celu określenia krytycznych dla patologicznych agregacji zmian w izoformach tau. Pozwoliło to na scharakteryzowanie S409 – najważniejszego miejsca fosforylacji białka tau. Badania na drożdżach wykazały też główną rolę dysfunkcji mitochondriów i stresu oksydacyjnego na tworzenie agregatów tau [83].

#### DROŻDZE W MODELU CHOROBY HUNTINGTONA

Chorobę pierwszy opisał George Huntington w 1878 r. Choroba Huntingtona (*chorea chronica hereditaria progressiva*, ang. Huntington's disease, chorea progressiva maior – HD) należy do grupy zaburzeń neurodegeneracyjnych. Objawami choroby są ruchy pływawicze, zmiany osobowości, agresja, autoagresja, depresja i otępienie. U podstaw choroby



Huntingtona leżą mutacje w genie *IT15* kodującym huntingtynę (Htt), duże białko o masie 348 kDa [4,87]. Choroba HD dziedziczona jest w sposób autosomalny dominujący. Mutacje w Htt obejmują przrost zróżnicowanej liczby powtórzeń CAG, kodonu glutaminy, w obrębie eksonu 1 powodując powstawanie długich regionów poliglutaminowych (poliQ) na N-końcu białka. Region poliglutaminowy wykazuje duży polimorfizm w populacji, a liczbę powtórzeń glutaminy szacuje się między 4 a 35. Wydłużenie regionu poliQ do 36–39 znacznie zwiększa ryzyko wystąpienia HD, podczas gdy 40 lub więcej powtórzeń glutaminy powoduje wczesne rozwinięcie się choroby HD [20,66] nawet w wieku 2 lat. Wydłużanie i polimeryzacja regionu poliQ powoduje złe fałdowanie białka Htt, jego agregację w jądrze i toksyczność dla komórek [54]. Fizjologiczna rola huntingtyny nie została jeszcze określona, wiadomo jednak, że białko to wiąże się z retikulum endoplazmatycznym, mitochondriami i tubulami [79,84]. Wykazano, że huntingtyna wchodzi w interakcje z kilkudziesięcioma różnymi białkami, reguluje transkrypcję przez wpływ na przenoszenie czynników transkrypcyjnych między cytoplazmą a jądrem, wpływa na transport pęcherzykowy i procesy apoptozy [26,27,35,37].

Chociaż drożdże *S. cerevisiae* nie mają genu dla Htt, heterologiczna ekspresja ludzkiego i mysiego genu *Htt* w komórkach drożdży pozwoliła na wyjaśnienie wielu elementów wpływających na toksyczność tego białka dla komórek eukariotycznych [29]. PoliQ Htt ekspresjonowano z powodzeniem w komórkach drożdży pod kontrolą różnych regulowanych promotorów np. *GALI*, *CUP1*. Pierwsze badania prowadzone na drożdżach wykazały, że agregacja domen poliQ jest zależna od ilości powtórzonych glutamin [44,53]. Badania fenotypowe wykazały, że ekspresja poliQ ludzkiego białka Htt powoduje spowolnienie wzrostu komórek, wpływa na cykl komórkowy drożdży i stymuluje powstawanie zarówno cytoplazmatycznych, jak i jądrowych agregatów. Używając chimericznych postaci poliQ-GFP wykazano charakterystyczne agregacje w cytoplazmie [56]. Zaobserwowano również, że agregacja i toksyczność poliQ Htt jest zależna od drożdżowego białka prionowego Rnq1 [51,58,72]. Oznaczałoby to, że toksyczny charakter agregatów poliQ nie wynika bezpośrednio z samego Htt. Nie ma jednak bezpośrednich dowodów na koagregację poliQ i priona Rnq1, choć obecność agregatów poliQ ułatwia formowanie priona Sup35 w komórkach drożdży [14].

Przeprowadzone na modelu drożdżowym badania wykazały, że toksyczność agregatów Htt zależy nie tylko od samej domeny poliQ, lecz również od sekwencji otaczających, zwłaszcza od regionu bogatego w prolinę. Obecność endogennej domeny bogatej w prolinę przekształca toksyczną postać poliQ w postać nietoksyczną [13,19].

Prowadzone badania wykazują zatrzymywanie wydłużonych form poliQ w jądrze komórek drożdżowych, przy czym translokacja do jądra wymaga obecności funkcjonalnego białka kaspazy Yca1 [71].

Badania fragmentów poliQ w drożdżach pozwoliły na wykazanie, że wydłużone regiony poliQ są zdolne do zwiększonej asocjacji do zewnętrznej błony mitochondrialnej zaburzając funkcję mitochondriów. Pozwala to przypuszczać, że toksyczny charakter poliQ polega na zaburzaniu procesów oddechowych komórki przez obniżanie funkcji mitochondriów.

Defekty te są niwelowane przez zwiększone wytwarzanie białka Hsp4p, głównego pozytywnego regulatora ekspresji genów biogenezy mitochondriów [57]. Wykazano również, że agregacja wydłużonych domen poliQ jest zależna od białek opiekuńczych Hsp104, Hsp40 i Hsp70. Nadekspresja Hsp104, Ssp1 i Hsp 40 powoduje supresję defektów wzrostu komórek wynikających z ekspresji toksycznych postaci poliQ [13, 57]. Model drożdżowy pozwolił również na wykazanie związku agregacji poliQ z procesem endocytozy. Toksyczność poliQ jest zwiększona w mutantach z zaburzonym procesem endocytozy, natomiast pojawienie się agregatów poliQ w komórkach dzikich powoduje natychmiastowe zatrzymanie procesów endocytozy [52].

Międzynarodowe projekty delecji genów drożdżowych pozwoliły na utworzenie kolekcji szczepów drożdżowych z usuniętymi poszczególnymi genami (yeast haploid and diploid deletion strains) [91]. Kolekcja ta posłużyła do wyszukiwania genów wpływających na toksyczny charakter poliQ. Nietoksyczne poliQ wprowadzono i ekspresjonowano w 4850 haploidalnych mutantach drożdżowych w celu wyszukania tych, u których obecność poliQ jest toksyczna. W ten sposób wyselekcjonowano 52 mutanty z uszkodzonymi genami systemu fałdowania białek, zależnej od ubikwityny degradacji białek przez proteasom i odpowiedzi na stres, które były wyjątkowo wrażliwe na obecność poliQ [89]. W kolejnym teście do komórek mutantów delecyjnych wprowadzono toksyczne poliQ i wyszukiwano szczepy o zwiększonej przeżywalności [28]. Zidentyfikowano w ten sposób 28 mutantów, w ich komórkach stwierdzono obecność wydłużonych poliQ, lecz nie obserwowano efektów cytotoksycznych. Potwierdza to tezę, że sama obecność domen poliQ nie warunkuje toksyczności. Wśród wyizolowanych genów znalazły się geny odpowiedzialne za transport pęcherzykowy, sortowanie białek, regulację transkrypcji i białka prionowe. Jednym z genów supresujących toksyczny charakter poliQ okazał się *BNA4*. Gen ten koduje monoooksydazę kinureninową, konserwatywny dla wszystkich eukariota enzym ze szlaku degradacji tryptofanu i wytwarzania NAD<sup>+</sup>. Delecja *BNA4* powoduje zmniejszenie wrażliwości komórek na stres oksydacyjny i na obecność toksycznych poliQ. Podobny efekt ochronny ma zastosowanie Ro 61-8048, inhibitora ssaczej monoooksydazy kinureninowej [28]. Analogiczny system drożdżowy pozwolił na identyfikację nowego inhibitora procesu agregacji poliQ [98].

## MODEL DROŻDŻOWY W CHOROBIE PARKINSONA

Choroba Parkinsona (*morbus Parkinsoni*, ang. Parkinson's disease – PD) jest drugim co do częstości występowania schorzeniem neurodegeneracyjnym związanym z wiekiem. PD występuje u 2% osób po 65 roku życia. Choroba Parkinsona jest postępującym schorzeniem ośrodkowego układu nerwowego, którego główną przyczyną jest zwirodnienie neuronów dopaminergicznych układu nigrostriatalnego. Objawami choroby są spowolnienie ruchowe, sztywność mięśni, drżenie, ale też otepienie i depresja [41].

U postaw PD leży postępująca degeneracja neuronów dopaminergicznych istoty czarnej (*substantia nigra pars compacta*). W zmienionych komórkach chorych na PD wykazano obecność ciałek Lewiego (Lewy bodies), wkrętów komórkowych zbudowanych głównie z agregatów białka

$\alpha$ -synukleiny [74]. Na rozwój PD wpływ mają zarówno czynniki środowiska, jak i czynniki genetyczne, choć rodzinna postać PD występuje stosunkowo rzadko [31]. Dotychczas wyznaczono kilka genów związanych z PD. Pierwszym scharakteryzowanym genem był  $\alpha$ -syn kodujący białko  $\alpha$ -synukleinę. Zarówno mutacje (A30P, A53T i E46K), jak i duplikacje *locus*  $\alpha$ -syn powiązано z rodzinną postacią choroby Parkinsona [36]. Z rodzinną PD powiązано również mutacje w genach: *LRRK2* kodującym dardarynę; *Dj-1*; *PINK1* kodującym kinazę 1; genie kodującym parkinę; *UCH-L1* kodującym hydrolazę L1 ubikwityny; *ATP13A2* kodującym P typu ATP-azę; genie *HTRA2* kodującym peptydazę serynową 2 HtrA. Produkty tych genów odgrywają ważną rolę w funkcjonowaniu mitochondriów, systemie degradacji przez proteasom, ubikwitynacji i transporcie błonowym [26,36,90].

Ciałka Lewiego pojawiające się w komórkach chorych na PD zbudowane są głównie z  $\alpha$ -synukleiny. Białko to występuje w zdrowych komórkach ośrodkowego układu nerwowego, głównie zakończeniach nerwowych. W warunkach fizjologicznych wpływa na homeostazę dopaminy. Patologiczna zagregowana alfa-synukleina traci swoją funkcję doprowadzając do nagromadzenia dopaminy w komórkach, czego konsekwencją jest wytwarzanie wolnych rodników uszkadzających DNA i białka. U drożdży brak homologa genu  $\alpha$ -synukleiny, jej funkcję bada się więc przy zastosowaniu systemów heterologicznej ekspresji. W natywnych warunkach  $\alpha$ -syn występuje w postaci rozpuszczalnych monomerów, jednak pod wpływem różnych warunków stresowych, przybiera strukturę  $\beta$ -harmonijki, może formować oligomery, które następnie agregują tworząc podobne do amyloidu struktury fibrylarne, toksyczne dla komórki [86].

Pierwsze próby badania  $\alpha$ -syn w komórkach drożdży podjęto w 2003 r. [60]. W badaniach tych wykazano, że ekspresja alfa-syn inhibuje wzrost drożdży i doprowadza do śmierci komórki w sposób zależny od stężenia. Ekspresja chimerycznego białka  $\alpha$ -syn-GFP w drożdżach wykazała jego agregację w postaci małych *foci* w błonie komórkowej, które z czasem powiększają się i przesuwają do cytoplazmy. Niektóre z agregatów przyjmowały formę  $\beta$ -kartki, co wykazano przez barwienie tioflawiną S. Agregacja  $\alpha$ -syn wiązała się z inhibicją fosfolipazy D, blokowaniem transportu między retikulum endoplazmatycznym i aparatem Golgiego, jak i zaburzeniami endocytozy [17,59,94]. W odróżnieniu od dzikiej postaci  $\alpha$ -syn, postać zmutowana A30P umiejscawia się tylko cytoplazmatycznie i nie wykazuje tendencji do agregacji. Jest to prawdopodobnie związane ze słabym jej powinowactwem do błony, ponieważ zwiększenie zawartości lipidów poprzez traktowanie komórek DMSO odtwarza funkcje agregacji mutantu [94]. Delecja genów związanych z metabolizmem lipidów i transportem pęcherzykowym zwiększa wrażliwość komórek drożdży na  $\alpha$ -syn, co pozwala przypuszczać o interakcji  $\alpha$ -syn z lipidami i wpływie tego wiązania na cytotoksyczność [89]. Użycie różnych mutantów drożdżowych pozwoliło na wykazanie, że same inkluzyje  $\alpha$ -syn nie są toksyczne dla komórki. Cytotoksyczność  $\alpha$ -syn zależy od tła genetycznego. Volles i wsp. [85] wykazali, że toksyczność  $\alpha$ -syn w drożdżach zależna jest od zdolności formowania  $\alpha$ -harmonijki, a nie tworzenia struktur fibrylarnych. W przypadku komórek *S. pombe*  $\alpha$ -syn nie jest kierowane do błony komórkowej i mimo agregacji w cytoplazmie nie

wykazuje działania cytotoksycznego [6]. Ekspresja mutowanych  $\alpha$ -syn w komórkach drożdży wskazuje na główną rolę centralnej hydrofobowej części białka w aktywności cytotoksycznej [34]. Delecja genów kodujących białka proteasomu również wzmacnia cytotoksyczny charakter  $\alpha$ -syn, prawdopodobnie przez wpływ  $\alpha$ -syn na kompozycję proteasomu [69]. Jednym z najlepszych supresorów toksyczności  $\alpha$ -syn okazała się *RabGTPaza Ypt1*. Nadmierne wytwarzanie *Rab1*, mysiego homologa *Ybt1*, znosi cytotoksyczne działanie  $\alpha$ -syn w komórkach neuronów myszy [12]. Szczepy drożdżowych mutantów delecyjnych okazały się przydatne w wyznaczeniu genów związanych z lokalizacją alfa-syn w komórce. W ten sposób wyznaczono związek genów endocytozy i degradacji w wakuoli z prawidłowym umiejscowieniem  $\alpha$ -syn [93]. Drożdże były również użyte w celu wyszukania ewentualnych chemioterapeutyków inhibujących cytotoksyczne działanie  $\alpha$ -syn [23,77]. Wykazano inhibujące toksyczność  $\alpha$ -syn działanie dwóch flawonoidów, quercetyny i EGCG [91], co potwierdza rolę stresu oksydacyjnego w degeneracji komórek warunkowanej  $\alpha$ -syn. W najnowszych badaniach, Su i wsp. [77] zidentyfikowali klasę substancji małowcząsteczkowych o działaniu przywracającym prawidłowy transport ER-aparat Golgiego, chroniących mitochondria przed działaniem  $\alpha$ -syn i ograniczający agregację tego białka w komórkach drożdży.

W patologii PD dużą rolę odgrywa stres oksydacyjny. Wpływ stresu oksydacyjnego na toksyczność  $\alpha$ -syn badano na modelu drożdżowym. Wykazano, że indukcja wytwarzania wolnych rodników poprzez ekspozycję drożdży na jony żelaza powodowała znaczne zwiększenie cytotoksyczności  $\alpha$ -syn i przekształcanie białka w fibrylarne [34,94]. Wykazano, że  $\alpha$ -syn powoduje zwiększone wytwarzanie wolnych rodników, uwalnianie cytochromu C z mitochondriów i eksternalizację fosfatydylseryny. Okazuje się, że komórki drożdży mogą być chronione przed indukowanym przez  $\alpha$ -syn wytwarzaniem i działaniem wolnych rodników przez działanie glutationu, geldamycyny (aktywator odpowiedzi na szok termiczny), słaby szok termiczny lub nadmierne wytwarzanie *Ssa3* [7,24]. Nie wyjaśniono dotychczas w jaki sposób szok termiczny odwraca toksyczne działanie  $\alpha$ -syn, prawdopodobnie  $\alpha$ -syn wchodzi w interakcje z *Ssa3*. Ochronę przed indukowanym  $\alpha$ -syn przyrostem wolnych rodników obserwowano również w mutantach drożdżowych pozbawionych genu *metakaspazy Yca1* [24].

Toksyczność  $\alpha$ -syn w komórkach drożdży warunkowana jest również modyfikacjami potranslacyjnymi. Delecja genów kinaz *Yck1* lub *Yck2*, powoduje zmniejszenie fosforylacji  $\alpha$ -syn i przez to zmniejszoną cytotoksyczność [93].

## PODSUMOWANIE

Przez wieki drożdże służyły człowiekowi. Powszechnie używane w przemyśle piekarniczym i browarnictwie, obecnie z powodzeniem również używane w przemyśle farmaceutycznym i biotechnologii. Zaawansowane techniki biologii molekularnej dostępne dla drożdży *S. cerevisiae* pozwalają na wdrażanie coraz to nowych metod w badaniach nad genomem i proteasomem drożdżowym. Dostępne obecnie biblioteki szczepów drożdżowych noszących insercje transpozono-we, delecje genów, czy znakowane epitopami białka, stanowią zachęcający i obiecujący warsztat dla biologa eksperymentalnego. Warsztat ten jest z powodzeniem wykorzystywany



w badaniu funkcji zarówno drożdżowych genów, jak również do badania funkcji białek innych organizmów – w tym człowieka. Duże podobieństwo eukariotycznych komórek drożdżowych i komórek ssaczy pozwala na badanie konserwatywnych dla wszystkich eukariota procesów właśnie na modelu drożdżowym. Umiejętne zastosowanie technik heterologicznej ekspresji pozwala na obserwacje ‘zachowań’ ludzkich białek w komórkach drożdży i dedukowanie na tej podstawie o ich fizjologicznej funkcji. Zdolność fermentacji czyni drożdże wspaniałym modelem do badań chorób związanych z dysfunkcją mitochondriów. Można bowiem obserwować zmiany fizjologiczne wynikające z mutacji genów wpływających na funkcję mitochondriów. Możliwość pracy na haploidalnych szczepach drożdżowych pozwala na obserwację efektów mutacji recesywnych. Drożdże są również doskonałym modelem w badaniach właściwości białek prionowych, wielorakiej oporności komórek na inhibitory,

w tym leki antynowotworowe i opisanych w tej pracy chorobach neurodegeneracyjnych. Drożdżowe biblioteki mutantów delecyjnych z powodzeniem służą wyszukiwaniu nowych inhibitorów, jak i czynników związanych z danym schorzeniem. W drożdżach upatruje się więc szansę na wyznaczenie nowych czynników prewencyjnych, a także potencjalnych leków dla wielu schorzeń. Chociaż wyniki otrzymane dla drożdży wymagają potwierdzeń *in vivo* i *in vitro* w innych modelach np. *Drosophila* sp., *Caenorhabditis* sp., myszach czy hodowlach tkankowych, te proste jednokomórkowe organizmy umożliwiają nam użycie metod niedostępnych dla wyższych eukariota. Choć *Saccharomyces cerevisiae* jest najbardziej rozpowszechniony w badaniach molekularnych, należy również wspomnieć o innych drożdżach wnoszących duży wkład w zrozumienie funkcjonowania komórek eukariotycznych: *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis* czy *Hansenula polymorpha*.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Arrasate M., Mitra S., Schweitzer E.S., Segal M.R., Finkbeiner S.: Inclusion body formation reduces level of mutant huntingtin and risk of neuronal death. *Nature*, 2004; 431: 805–810
- [2] Bharadwaj P., Martins R., Macreadie I.: Yeast as a model for studying Alzheimer's disease. *FEMS Yeast Res.*, 2010; 10: 961–969
- [3] Bharadwaj P., Waddington L., Varghese J., Macreadie I.G.: A new method to measure cellular toxicity of non-fibrillar and fibrillar Alzheimer's A $\beta$  using yeast. *J. Alzheimers Dis.*, 2008; 13: 147–150
- [4] Bocharova N., Chave-Cox R., Sokolov S., Knorre D., Severin F.: Protein aggregation and neurodegeneration: clues from a yeast model of Huntington's disease. *Biochemistry (Mosc)*, 2009; 74: 231–234
- [5] Bodner R.A., Outeiro T.F., Altmann S., Maxwell M.M., Cho S.H., Hyman B.T., McLean P.J., Young A.B., Housman D.E., Kazantsev A.G.: Pharmacological promotion of inclusion formation: a therapeutic approach for Huntington's and Parkinson's diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 4246–4251
- [6] Brandis K.A., Holmes I.F., England S.J., Sharma N., Kukreja L., DebBurman S.K.: Alpha-synuclein fission yeast model: concentration-dependent aggregation without plasma membrane localization or toxicity. *J. Mol. Neurosci.*, 2006; 28: 179–191
- [7] Büttner S., Bitto A., Ring J., Augsten M., Zabrocki P., Eisenberg T., Jungwirth H., Hutter S., Carmona-Gutierrez D., Kroemer G., Winderickx J., Madeo F.: Functional mitochondria are required for  $\alpha$ -synuclein toxicity in aging yeast. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 7554–7560
- [8] Caine J., Sankovich S., Antony H., Waddington L., Macreadie P., Varghese J., Macreadie I.: Alzheimer's A $\beta$  fused to green fluorescent protein induces growth stress and a heat shock response. *FEMS Yeast Res.*, 2007; 7: 1230–1236
- [9] Cannon R.D., Lamping E., Holmes A.R., Niimi K., Baret P.V., Keniya M.V., Tanabe K., Niimi M., Goffeau A., Monk B.C.: Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2009; 22: 291–321
- [10] Carlson M., Botstein D.: Organization of the SUC gene family in *Saccharomyces*. *Mol. Cell. Biol.*, 1983; 3: 351–359
- [11] Chen L., Periquet M., Wang X., Negro A., McLean P.J., Hyman B.T., Feany M.B.: Tyrosine and serine phosphorylation of  $\alpha$ -synuclein have opposing effects on neurotoxicity and soluble oligomer formation. *J. Clin. Invest.*, 2009; 119: 3257–3265
- [12] Cooper A.A., Gitler A.D., Cashikar A., Haynes C.M., Hill K.J., Bhullar B., Liu K., Xu K., Strathearn K.E., Liu F., Cao S., Caldwell K.A., Caldwell G.A., Marsischky G., Kolodner R.D., Labaer J., Rochet J.C., Bonini N.M., Lindquist S.:  $\alpha$ -synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science*, 2006; 313: 324–328
- [13] Dehay B., Bertolotti A.: Critical role of the proline-rich region in Huntingtin for aggregation and cytotoxicity in yeast. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 35608–35615
- [14] De Jonghe C., Esseleens C., Kumar-Singh S., Craessaerts K., Serneels S., Checler F., Annaert W., Van Broeckhoven C., De Strooper B.: Pathogenic APP mutations near the  $\gamma$ -secretase cleavage site differentially affect A $\beta$  secretion and APP C-terminal fragment stability. *Hum. Mol. Genet.*, 2001; 10: 1665–1671
- [15] Derkach I.L., Uptain S.M., Outeiro T.F., Krishnan R., Lindquist S.L., Lieberman S.W.: Effects of Q/N-rich, polyQ, and non-polyQ amyloids on the *de novo* formation of the [PSI<sup>+</sup>] prion in yeast and aggregation of Sup35 *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 12934–12939
- [16] De Strooper B.: Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol. Rev.*, 2010; 90: 465–494
- [17] DiFiglia M., Sapp E., Chase K.O., Davis S.W., Bates G.P., Vonsattel J.P., Aronin N.: Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*, 1997; 277: 1990–1993
- [18] Dixon C., Mathias N., Zweig R.M., Davis D.A., Gross D.S.:  $\alpha$ -synuclein targets the plasma membrane via the secretory pathway and induces toxicity in yeast. *Genetics*, 2005; 170: 47–59
- [19] Drewes G.: MARKing tau for tangles and toxicity. *Trends Biochem. Sci.*, 2004; 29: 548–555
- [20] Duennwald M.L., Jagadish S., Muchowski P.J., Lindquist S.: Flanking sequences profoundly alter polyglutamine toxicity in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 11045–11050
- [21] Duyao M., Ambrose C., Myers R., Novelletto A., Persichetti F., Frontali M., Folstein S., Ross C., Franz M., Abbott M.: Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat. Genet.*, 1993; 4: 387–392
- [22] Faber P.W., Barnes G.T., Srinidhi J., Chen J., Gusella J.F., MacDonald M.E.: Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins. *Hum. Mol. Genet.*, 1998; 7: 1463–1474
- [23] Ferri C.P., Prince M., Brayne C., Brodaty H., Fratiglioni L., Ganguli M., Hall K., Hasegawa K., Hendrie H., Huang Y., Jorm A., Mathers C., Menezes P.R., Rimmer E., Sczufca M.: Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 2005; 366: 2112–2117
- [24] Fleming J., Outeiro T.F., Slack M., Lindquist S.L., Bulawa C.E.: Detection of compounds that rescue Rab1-synuclein toxicity. *Methods Enzymol.*, 2008; 439: 339–351
- [25] Flower T.R., Chesnokova L.R., Froelich C.A., Dixon C., Witt S.N.: Heat shock prevents alpha-synuclein-induced apoptosis in a yeast model of Parkinson's disease. *J. Mol. Biol.*, 2005; 351: 1081–1100
- [26] Futai E., Yagishita S., Ishiura S.: Nicastrin is dispensable for  $\gamma$ -secretase protease activity in the presence of specific presenilin mutation. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 13013–13022
- [27] Gasser T.: Genetics of Parkinson's disease. *J. Neurol.*, 2001; 248: 833–840
- [28] Gauthier L.R., Charrin B.C., Borrell-Pages M., Dompierre J.P., Rangone H., Cordelieres F.P., de Mey J., MacDonald M.E., Lessmann V., Humbert S., Saudou F.: Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*, 2004; 118: 127–138
- [29] Giorgini F., Guidetti P., Nguyen Q., Bennett S.C., Muchowski P.J.: A genomic screen in yeast implicates kynurenine 3-monooxygenase as a therapeutic target for Huntington disease. *Nat. Genet.*, 2005; 37: 526–531
- [30] Giorgini F., Muchowski P.J.: Exploiting yeast genetics to inform therapeutic strategies for Huntington's disease. *Methods Mol. Biol.*, 2009; 548: 161–174



- [31] Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L.: Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 1991; 349: 704–706
- [32] Goedert M.: Parkinson's disease and other alpha-synucleinopathies. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2001; 39: 308–312
- [33] Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G.: Life with 6000 genes. *Science*, 1996; 274: 546, 563–567
- [34] Gokhale K.C., Newnam G.P., Sherman M.Y., Chernoff Y.O.: Modulation of prion-dependent polyglutamine aggregation and toxicity by chaperone proteins in the yeast model. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 22809–22818
- [35] Griffioen G., Duhamel H., Van Damme N., Pellens N., Zabrocki P., Pannecouque C., van Leuven F., Winderickx J., Wera S.: A yeast-based model of alpha-synucleinopathy identifies compounds with therapeutic potential. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006; 1762: 312–318
- [36] Hackam A.S., Yassa A.S., Singaraja R., Metzler M., Gutekunst C.A., Gan L., Warby S., Wellington C.L., Vaillancourt J., Chen N., Gervais F.G., Raymond L., Nicholson D.W., Hayden M.R.: Huntingtin interacting protein 1 induces apoptosis via a novel caspase-dependent death effectors domain. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 41299–41308
- [37] Hardy J., Cai H., Cookson M.R., Gwinn-Hardy K., Singleton A.: Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Ann. Neurol.*, 2006; 60: 389–398
- [38] Harjes P., Wanker E.E.: The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem. Sci.*, 2003; 28: 425–433
- [39] Hatano T., Kubo S., Sato S., Hattori N.: Pathogenesis of familial Parkinson's disease: new insights based on monogenic forms of Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, 2009; 111: 1075–1093
- [40] Hilbich C., Kisters-Woike B., Reed J., Masters C.L., Beyreuther K.: Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease beta A4 peptides. *J. Mol. Biol.*, 1992; 228: 460–473
- [41] Hughes S.R., Goyal S., Sun J.E., Gonzalez-DeWhitt P., Fortes M.A., Riedel N.G., Sahasrabudhe S.R.: Two-hybrid system as a model to study the interaction of beta-amyloid peptide monomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 2065–2070
- [42] Jankovic J.: Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2008; 79: 368–376
- [43] Kaye R., Head E., Thompson J.L., McIntire T.M., Milton S.C., Cotman C.W., Glabe C.G.: Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 2003; 300: 486–489
- [44] Krobitsch S., Lindquist S.: Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 1589–1594
- [45] Lee V.M., Goedert M., Trojanowski J.Q.: Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2001; 24: 1121–1159
- [46] Levy-Lahad E., Wijsman E.M., Nemens E., Anderson L., Goddard K.A., Weber J.L., Bird T.D., Schellenberg G.D.: A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science*, 1995; 269: 970–973
- [47] Li S.H., Li X.J.: Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet.*, 2004; 20: 146–154
- [48] Lüthi U., Schaerer-Brodbeck C., Tanner S., Middendorp O., Edler K., Barberis A.: Human beta-secretase activity in yeast detected by a novel cellular growth selection system. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003; 1620: 167–178
- [49] Macreadie I., Lotfi-Miri M., Mohotti S., Shapira D., Bennett L., Varghese J.: Validation of folate in a convenient yeast assay suited for identification of inhibitors of Alzheimer's amyloid-beta aggregation. *J. Alzheimers Dis.*, 2008; 15: 391–396
- [50] Mandelkow E.M., Stamer K., Vogel R., Thies E., Mandelkow E.: Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol. Aging*, 2003; 24: 1079–1085
- [51] Meriin A.B., Zhang X., He X., Newnam G.P., Chernoff Y.O., Sherman M.Y.: Huntingtin toxicity in yeast model depends on polyglutamine aggregation mediated by a prion-like protein Rnq1. *J. Cell Biol.*, 2002; 157: 997–1004
- [52] Meriin A.B., Zhang X., Miliaras N.B., Kazantsev A., Chernoff Y.O., McCaffery J.M., Wendland B., Sherman M.Y.: Aggregation of expanded polyglutamine domain in yeast leads to defects in endocytosis. *Mol. Cell Biol.*, 2003; 23: 7554–7565
- [53] Muchowski P.J., Schaffar G., Sittler A., Wanker E.E., Hayer-Hartl M.K., Hartl F.U.: Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 7841–7846
- [54] Murakami-Sekimata A., Sato K., Sato K., Takashima A., Nakano A.: O-mannosylation is required for the solubilization of heterologously expressed human beta-amyloid precursor protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells*, 2009; 14: 205–215
- [55] Nunan J., Shearman M.S., Checler F., Cappai R., Evin G., Beyreuther K., Masters C.L., Small D.H.: The C-terminal fragment of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor is degraded by a proteasome dependent mechanism distinct from gamma-secretase. *Eur. J. Biochem.*, 2001; 268: 5329–5336
- [56] Ocampo A., Barrientos A., Amaratunga D., Morrison T., Brenan C.J., Ilyin S.: From the bakery to the brain business: developing inducible yeast models of human neurodegenerative disorders. *Biotechniques*, 2008; 45: Pvi7–Pxiv
- [57] Ocampo A., Zambrano A., Barrientos A.: Suppression of polyglutamine-induced cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae* by enhancement of mitochondrial biogenesis. *FASEB J.*, 2010; 24: 1431–1441
- [58] Orłowska-Matuszewska G., Wawrzycka D.: A novel phenotype of eight spores asci in deletants of the prion-like Rnq1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006; 340: 190–193
- [59] Outeiro T.F., Kontopoulos E., Altmann S.M., Kufareva I., Strathearn K.E., Amore A.M., Volk C.B., Maxwell M.M., Rochet J.C., McLean P.J., Young A.B., Abagyan R., Feany M.B., Hyman B.T., Kazantsev A.G.: Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson disease. *Science*, 2007; 317: 516–519
- [60] Outeiro T.F., Lindquist S.: Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science*, 2003; 302: 1772–1775
- [61] Polyakova O., Dear D., Stern I., Martin S., Hirst E., Bawumia S., Nash A., Dodson G., Bronstein I., Bayley P.M.: Proteolysis of prion protein by cathepsin S generates a soluble beta-structured intermediate oligomeric form, with potential implications for neurotoxic mechanisms. *Eur. Biophys. J.*, 2009; 38: 209–218
- [62] Price J.L., Davis P.B., Morris J.C., White D.L.: The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 1991; 12: 295–312
- [63] Rademakers R., Cruts M., van Broeckhoven C.: The role of tau (MAPT) in frontotemporal dementia and related tauopathies. *Hum. Mutat.*, 2004; 24: 277–295
- [64] Reynolds C.H., Betts J.C., Blackstock W.P., Nebreda A.R., Anderton B.H.: Phosphorylation sites on tau identified by nano-electrospray mass spectrometry: differences *in vitro* between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3beta. *J. Neurochem.*, 2000; 74: 1587–1595
- [65] Rochet J.C., Lansbury P.T.Jr.: Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2000; 10: 60–68
- [66] Rubinsztein D.C., Leggo J., Coles R., Almqvist E., Biancalana V., Cassiman J.J., Chotai K., Connarty M., Crauford D., Curtis A., Curtis D., Davidson M.J., Differ A.M., Dode C., Dodge A., Frontali M., Ranen N.G., Stine O.C., Sherr M., Abbott M.H., Franz M.L., Graham C.A., Harper P.S., Hedreen J.C., Jackson A., Kaplan J.C., Losekoot M., MacMillan J.C., Morrison P., Trottier Y., Novelletto A., Simpson S.A., Theilmann J., Whittaker J.L., Folstein S.E., Ross I.C.A., Hayden M.R.: Phenotypic characterization of individuals with 30–40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36–39 repeats. *Am. J. Hum. Genet.*, 1996; 59: 16–22
- [67] Schmechel D.E., Goldgaber D., Burkhardt D.S., Gilbert J.R., Gajdusek D.C., Roses A.D.: Cellular localization of messenger RNA encoding amyloid-beta-protein in normal tissue and in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, 1988; 2: 96–111
- [68] Sergeant N., Delacourte A., Buée L.: Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005; 1739: 179–197
- [69] Sharma N., Brandis K.A., Herrera S.K., Johnson B.E., Vaidya T., Shrestha R., Deeburman S.K.: alpha-Synuclein budding yeast model: toxicity enhanced by impaired proteasome and oxidative stress. *J. Mol. Neurosci.*, 2006; 28: 161–178
- [70] Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y., Rogava E.A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K., Tsuda T., Mar L., Foncin J.F., Bruni A.C., Montesi M.P., Sorbi S., Rainero I., Pinessi L., Nee L., Chumakov I., Pollen D., Brookes A., Sanseau P., Polinsky R.J., Wasco W., Da Silva H.A., Haines J.L., Pericak-Vance M.A., Tanzi R.E., Roses A.D., Fraser P.E., Rommens J.M., St. George-Hyslop P.H.: Cloning of a gene bearing missense mutation in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 1995; 375: 754–760



- [71] Sokolov S., Pozniakovskiy A., Bocharova N., Knorre D., Severin F.: Expression of an expanded polyglutamine domain in yeast causes death with apoptotic markers. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006; 1757: 660–666
- [72] Sondheimer N., Lindquist S.: Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol. Cell*, 2000; 5: 163–172
- [73] Sparvero L.J., Patz S., Brodsky J.L., Coughlan C.M.: Proteomic analysis of the amyloid precursor protein fragment C99: expression in yeast. *Anal. Biochem.*, 2007; 370: 162–170
- [74] Spillantini M.G., Crowther R.A., Jakes R., Cairns N.J., Lantos P.L., Goedert M.: Filamentous  $\alpha$ -synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci. Lett.*, 1998; 251: 205–208
- [75] Steiner H., Pesold B., Haass C.: An *in vivo* assay for the identification of target proteases which cleave membrane-associated substrates. *FEBS Lett.*, 1999; 463: 245–249
- [76] Steiner H., Revez T., Neumann M., Romig H., Grim M.G., Pesold B., Kretschmar H.A., Hardy J., Holton J.L., Baumeister R., Houlden H., Haass C.: A pathogenic presentin-1 deletion causes aberrant A $\beta$ 42 production in the absence of congophilic amyloid plaques. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 7233–7239
- [77] Su L.J., Auluck P.K., Outeiro T.F., Yeger-Lotem E., Kritzer J.A., Tardiff D.F., Strathearn K.E., Liu F., Cao S., Hamamichi S., Hill K.J., Caldwell K.A., Bell G.W., Fraenkel E., Cooper A.A., Caldwell G.A., McCaffery J.M., Rochet J.C., Lindquist S.: Compounds from an unbiased chemical screen reverse both ER-to-Golgi trafficking defects and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease models. *Dis. Model Mech.*, 2010; 3: 194–208
- [78] Szczebara F.M., Chandelier C., Villeret C., Masurel C., Bourot S., Dupont C., Blanchard S., Groisillier A., Testet E., Costaglioli P., Cauet G., Degryse E., Balbuena D., Winter J., Achstetter T., Spagnoli R., Pompon D., Dumas B.: Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nat. Biotechnol.*, 2003; 21: 143–149
- [79] Trottier Y., Devys D., Imbert G., Saudou F., An I., Lutz Y., Weber C., Agid Y., Hirsch E.C., Mandel J.L.: Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nat. Genet.*, 1995; 10: 104–110
- [80] Uversky V.N.: Neuropathology, biochemistry, and biophysics of  $\alpha$ -synuclein aggregation. *J. Neurochem.*, 2007; 103: 17–37
- [81] Vandebroek T., Terwel D., Vanhelmont T., Gysemans M., Van Haesendonck C., Engelborghs Y., Winderickx J., Van Leuven F.: Microtubule binding and clustering of human Tau-4R and Tau-P301L proteins isolated from yeast deficient in orthologues of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  or cdk5. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 25388–25397
- [82] Vandebroek T., Vanhelmont T., Terwel D., Borghgraef P., Lemaire K., Snauwaert J., Wera S., Van Leuven F., Winderickx J.: Identification and isolation of a hyperphosphorylated, conformationally changed intermediate of human protein tau expressed in yeast. *Biochemistry*, 2005; 44: 11466–11475
- [83] Vanhelmont T., Vandebroek T., De Vos A., Terwel D., Lemaire K., Anandhakumar J., Franssens V., Swinnen E., Van Leuven F., Winderickx J.: Serine-409 phosphorylation and oxidative damage define aggregation of human protein tau in yeast. *FEMS Yeast Res.*, 2010; 10: 992–1005
- [84] Velier J., Kim M., Schwarz C., Kim T.W., Sapp E., Chase K., Aronin N., DiFiglia M.: Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways. *Exp. Neurol.*, 1998; 152: 34–40
- [85] Volles M.J., Lansbury P.T.Jr.: Relationships between the sequence of alpha-synuclein and its membrane affinity, fibrillization propensity, and yeast toxicity. *J. Mol. Biol.*, 2007; 366: 1510–1522
- [86] von der Haar T., Jossé L., Wright P., Zenthon J., Tuite M.F.: Development of novel yeast cell-based system for studying the aggregation of Alzheimer's disease-associated A $\beta$  peptides *in vivo*. *Neurodegener. Dis.*, 2007; 4: 136–147
- [87] Walker F.O.: Huntington's disease. *Lancet*, 2007; 369: 218–228
- [88] Weller R.O., Massey A., Newman T.A., Hutchings M., Kuo Y.M., Roher A.E.: Cerebral amyloid angiopathy: amyloid  $\beta$  accumulates in putative interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.*, 1998; 153: 725–733
- [89] Willingham S., Outeiro T.F., DeVit M.J., Lindquist S.L., Muchowski P.J.: Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or  $\alpha$ -synuclein. *Science*, 2003; 302: 1769–1772
- [90] Winderickx J., Delay C., De Vos A., Klinger H., Pellens K., Vanhelmont T., Van Leuven F., Zabrocki P.: Protein folding diseases and neurodegeneration: lessons learned from yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008; 1783: 1381–1395
- [91] Winzeler E.A., Shoemaker D.D., Astromoff A., Liang H., Anderson K., Andre B., Bangham R., Benito R., Boeke J.D., Bussey H., Chu A.M., Connelly C., Davis K., Dietrich F., Dow S.W., El Bakkoury M., Foury F., Friend S.H., Gentalen E., Giaever G., Hegemann J.H., Jones T., Laub M., Liao H., Liebundguth N., Lockhart D.J., Lucau-Danila A., Lussier M., M'Rabet N., Menard P., Mittmann M., Pai C., Rebischung C., Revuelta J.L., Riles L., Roberts C.J., Ross-MacDonald P., Scherens B., Snyder M., Sookhai-Mahadeo S., Storms R.K., Véronneau S., Voet M., Volckaert G., Ward T.R., Wysocki R., Yen G.S., Yu K., Zimmermann K., Philippsen P., Johnston M., Davis R.W.: Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 1999; 285: 901–906
- [92] Yagishita S., Futai E., Ishiura S.: *In vitro* reconstitution of  $\gamma$ -secretase activity using yeast microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008; 377: 141–145
- [93] Zabrocki P., Bastiaens I., Delay C., Bammens T., Ghillebert R., Pellens K., De Virgilio C., Van Leuven F., Winderickx J.: Phosphorylation, lipid raft interaction and traffic of  $\alpha$ -synuclein in a yeast model for Parkinson. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008; 1783: 1767–1780
- [94] Zabrocki P., Pellens K., Vanhelmont T., Vandebroek T., Griffioen G., Wera S., Van Leuven F., Winderickx J.: Characterization of alpha-synuclein aggregation and synergistic toxicity with protein tau in yeast. *FEBS J.*, 2005; 272: 1386–1400
- [95] Zhang H., Komano H., Fuller R.S., Gandy S.E., Frail D.E.: Proteolytic processing and secretion of human  $\beta$ -amyloid precursor protein in yeast. Evidence for a yeast secretase activity. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 27799–27802
- [96] Zhang W., Espinoza D., Hines V., Innis M., Mehta P., Miller D.L.: Characterisation of  $\beta$ -amyloid peptide precursor processing by the yeast Yap3 and Mkc7 proteases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997; 1359: 110–122
- [97] Zhang X., Smith D.L., Meriin A.B., Engemann S., Russel D.E., Roark M., Washington S.L., Maxwell M.M., Marsh J.L., Thompson L.M., Wanker E.E., Young A.B., Housman D.E., Bates G.P., Sherman M.Y., Kazantsev A.G.: A potent small molecule inhibits polyglutamine aggregation in Huntington's disease neurons and suppresses neurodegeneration *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 892–897
- [98] Zheng H., Koo E.H.: The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol. Neurodegen.*, 2006; 1: 5

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.