

**ВЛИЯНИЕ цАМФ И НЕЛАРАБИНА
НА ФИБРИЛЛООБРАЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЫ ИНСУЛИНА**
**cAMP AND NELARABINE EFFECTS
ON THE FIBRIL FORMATION OF THE INSULIN MOLECULE**

О. А. Соколович, Н. В. Богданова, В. В. Саган, К. Я. Буланова
O. Sokolovich, N. Bogdanova, V. Sagan, K. Bulanova

*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
helgahawk23@mail.ru
Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus*

В результате проведенного исследования представлены данные о влиянии цАМФ и неларабина на фибриллообразование молекул инсулина. В экспериментах *in vitro* выявлено, что данные вещества снижают процесс фибриллообразования.

As a result of studies, information of the influence of cAMP and nelarabine on the processes of fibrillation of insulin molecules is presented. In vitro experiments revealed that cAMP and nelarabine reduces the process of fibrillation.

Ключевые слова: инсулин, фибриллообразование, цАМФ, неларабин.

Keywords: insulin, fibril formation, cAMP, nelarabine.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-2-115-117>

Исследование структуры упорядоченных белковых агрегатов – амилоидных фибрилл, влияния нативной структуры белка и внешних условий на процесс фибриллообразования в настоящее время является весьма важной темой для исследований. Особенno это стало актуально, когда выяснилось, что неправильная укладка некоторых белков может стать причиной патологических агрегаций и приводить к развитию многих нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, сахарного диабета второго типа, Бокового Амиотрофического склероза (БАС) и др. Но следует отметить, что не все амилоиды и различные амилоидоподобные фибриллы ассоциированы с нейродегенеративными заболеваниями и это свойство присуще многим белкам. Но, несмотря на такое разнообразие белков, образованные амилоидные фибриллы на первый взгляд подобны между собой и представляют уложенные в стопку антипараллельные β -структуры, направленные перпендикулярно оси фибриллы [2].

Амилоидные фибриллы могут быть прямыми или перекрученными, могут содержать много протофиламентов, которые выстраиваются параллельно оси фибриллы или закручиваться относительно друг друга. Можно представить, что амилоидные фибриллы представляют собой закрученные в спираль антипараллельные β -листы, внутри спирали образуется полость, подобно цилиндуру[3].

На кинетику формирования инсулиновых фибрилл (и других амилоидогенных белков) влияют многие факторы окружающей среды: концентрация белка, pH, ионная сила раствора, состав среды (анионы, катионы), присутствие денатурирующих агентов (мочевина) или стабилизаторов (сахароза), температурный режим. Важное отличие сворачивания белка в нативную структуру от формирования амилоидных фибрилл заключается в том, что при сворачивании в нативную структуру предполагается соответствие между последовательностью аминокислот и уникальностью свернутого состояния, тогда как при амилоидообразовании одна и та же полипептидная последовательность может формировать фибриллы разной морфологии. В настоящий момент можно выделить три пути образования амилоидных фибрилл инсулиновых молекул в зависимости от размера ядра. Во-первых, предполагается, что фибрillогенез может происходить прямо при сборке инсулиновых мономеров. Во-вторых, предполагается, что предшественниками фибрилл являются димеры. В-третьих, предшественниками фибрилл являются олигомеры [2].

Конформационные заболевания возникают, когда эндогенный белок претерпевает изменения в форме, что приводит к самоассоциации этого белка. В ходе нормального биосинтеза белка происходит неправильное свертывание. Хотя конформационные изменения происходят при нормальной переработке белка, восприимчивость конкретного белка к агрегации и генетическая или экологическая предрасположенность к болезням могут подавлять механизмы контроля качества клетки. В условиях устойчивого стресса эндоплазматического ретикулума (ЭР) эти механизмы контроля качества оказываются недостаточными. Высокие концентрации мутантного белка со временем приводят к агрегации и медленному отложению в тканях. Эта длительная последовательность событий может частично объяснить относительно позднюю клиническую картину многих конформационных заболеваний [1].

Эти заболевания возникают из-за вторичных или третичных структурных изменений внутри составляющих белков с последующей агрегацией этих измененных белков. При прионных заболеваниях Куру и Крейцфельда-Якоба белки, имеющие в основном спиральную структуру, преобразуются в бета-складчатую конфигурацию листа. На самом деле, конформационные заболевания часто содержат белок, который агрегирует в бета-листовых связях. Бета-плиссированные листы образованы чередующимися пептидными цепями, которые связаны водородными связями между их выровненными плиссированными структурами. Это особенность системных амилоидозов, нейродегенеративных заболеваний и сахарного диабета 2-го типа (СД2). Различные клинические проявления этих заболеваний, а также тот факт, что некоторые из них почти исключительно связаны с генетическим дефицитом (например, болезнь Хантингтона), в то время как другие, такие как СД2, могут иметь относительно сильное влияние окружающей среды (ожирение), могут показаться противоречивыми группировками на основе конформационных аномалий [1].

При изучении процессов сворачивания-разворачивания белков и свойств возникающих при этом частично и неправильно свернутых состояний и их агрегированных форм используются флуоресцентные методы, основанные на регистрации естественной флуоресценции белков. Широко используются тиофлавин Т (ThT), образующий интенсивно флуоресцирующий комплекс с амилоидными фибриллами. При этом ThT не взаимодействует с белками в нативных, полностью развернутых и частично свернутых денатурированных состояниях типа расплавленной глобулы, а также с аморфными агрегатами белков, а специфически взаимодействует только с белками в состоянии амилоидных фибрилл. Благодаря своим уникальным флуоресцентным свойствам ThT является идеальным средством для диагностики появления амилоидных фибрилл в различных тканях и органах. Более того, именно тестирование амилоидных фибрилл с использованием флуоресценции ThT стало явным условием в его исследовании *in vitro*.

Объектом исследования является белок инсулин. Инсулин – это глобулярный белок, состоящий из двух цепей: А и В. Полипептидные цепи соединяются двумя дисульфидными мостиками через остатки цистеина, третья дисульфидная связь расположена в А цепи. Белковый гормон инсулин синтезируется в β клетках островков Лангерганса поджелудочной железы, где он находится в виде Zn^{2+} содержащего гексамера. Гексамер формируется из трех инсулиновых димеров, удерживаемых вместе за счет двух ионов цинка. Для проникновения в кровяное русло инсулиновый гексамер первоначально распадается на димеры, а затем на Zn^{2+} свободные мономеры, которые могут только в таком виде эффективно проникать в кровяное русло. Мономерная и димерная формы инсулина сильно предрасположены к агрегации.

Для получения фибрилл из инсулина его инкубирования в течении 24 ч при температуре 37°C. Инсулин взят в количестве 1 мг на 2 мл трис-НCl буферного раствора, pH=7.4. Для контроля за процессом фибриллообразования инсулина был также использован зонд ThT.

Измерение проводилось с помощью спектрофлуориметра RF-5301 PC («Shimadzu», Япония). Для измерения брали 10 мкл пробы, 1 мл Tris, 1 мл дистиллированной воды и 10 мкл зонда. В качестве веществ, замедляющих фибриллообразование, использовали цАМФ в концентрациях 10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М и неларгин в концентрациях 10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М по 10 мкл соответственно. Инсулин был помещен в стрессовые для молекулы условия: механическое воздействие. Вследствие этого, молекулы инсулина утрачивают нативную структуру и переходят в амилоидную форму.

В ходе проведенного исследования было получено, что интенсивность флуоресценции, в пробе с инсулином, составляет $51,826 \pm 1,114$ относительных единиц (отн. ед.), после инкубирования в течение суток и при температуре 37°C.

На приведенных рисунках 1, 2 приведены данные сравнительного анализа максимальных величин флуоресценции тиофлавина Т, обусловленных формированием максимального количества фибриллярных структур в контроле (2 мг инсулина/1мл буфера) и при введении 10 мкл цАМФ и неларбина соответственно.

Интенсивность флуоресценции в контроле и при добавлении цАМФ в концентрации 10^{-8} М составляет $8,472 \pm 0,408$ отн.ед., а при концентрации 10^{-4} М составляет $12,477 \pm 2,206$ после инкубирования в течение суток и при температуре 37°C.

Интенсивность флуоресценции в контроле и при добавлении неларбина в концентрации 10^{-8} М составляет $8,318 \pm 0,076$ отн. ед., а при концентрации 10^{-4} составляет $14,719 \pm 0,299$ после инкубирования в течение суток и при температуре 37°C.

В ходе проведенного исследования было выявлено, что цАМФ в концентрации 10^{-8} М вызывал снижение интенсивности флуоресценции в сравнении с контролем в 6,12 раз, а неларгин в той же концентрации вызывал снижение интенсивности флуоресценции в 6,23 раза; цАМФ в концентрации 10^{-4} М вызывал снижение интенсивности флуоресценции в сравнении с контролем в 4,15 раза, неларгин в концентрации 10^{-4} М вызывал снижение интенсивности флуоресценции в сравнении с контролем в 3,52 раза.

Следовательно снижение интенсивности флуоресценции цАМФ в концентрации 10^{-8} М в 1,47 раза больше, чем при концентрации 10^{-4} М, а снижение интенсивности флуоресценции неларбина в концентрации 10^{-8} М в 1,77 раза больше, чем при концентрации 10^{-4} М.

Уменьшение интенсивности флуоресценции показывает то, что количество образовавшихся фибрилл снизилось. Это значит, что процесс фибриллообразования был снижен; сохранилось большее количество функционально-активных молекул инсулина.

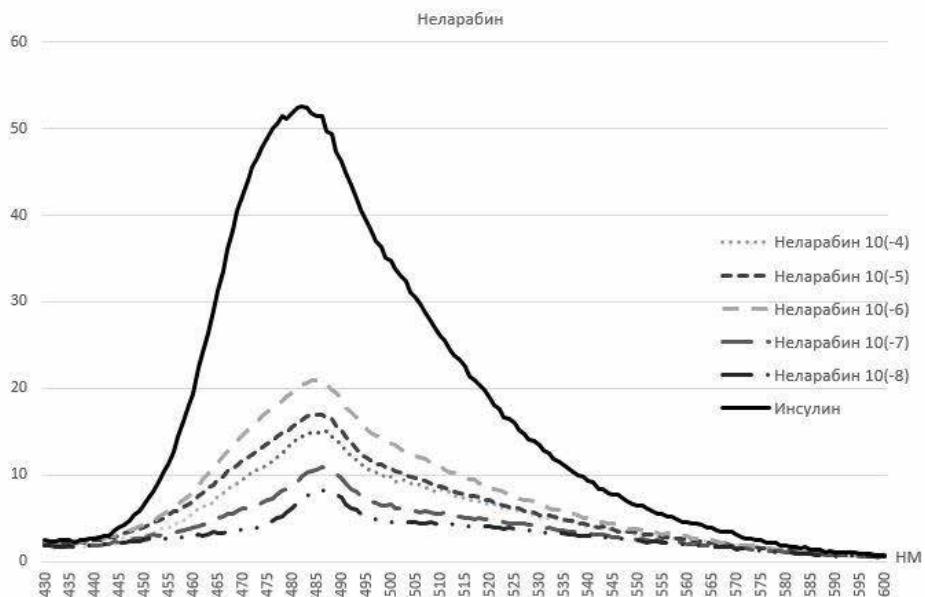


Рис. 1 – Спектр флуоресценции ThT в пробе неларабина

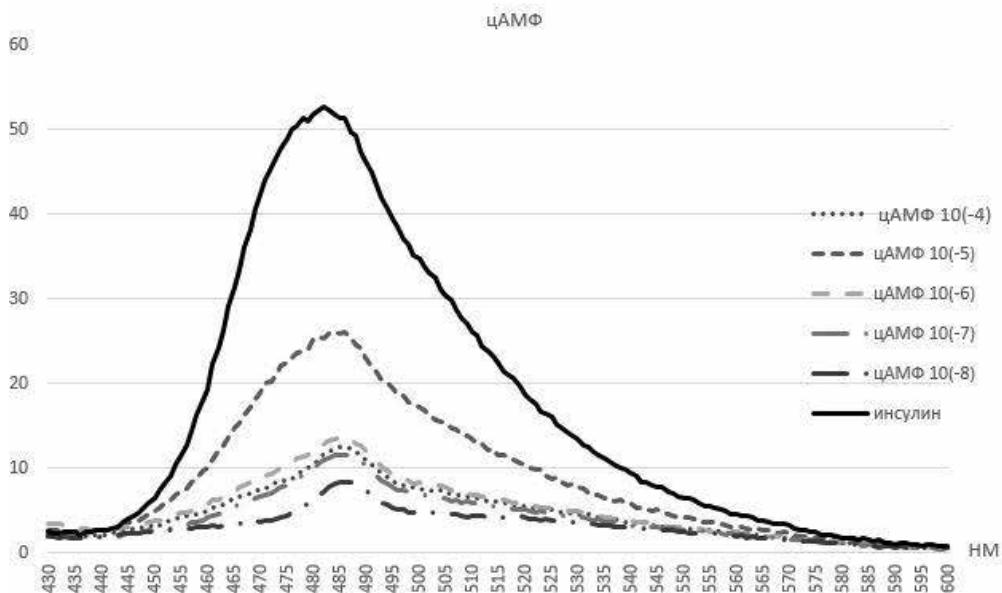


Рис. 2 – Спектр флуоресценции ThT в пробе цАМФ

Исследования в области инсулина направлены на поиски веществ подавляющих фибриллообразование, что в последующем поможет уменьшить риски развития заболеваний, связанных с образованием амилоидных фибрилл таких как: болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, СД2 и т.д.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hayden MR, Tyagi SC, Kerklo MM, Nicolls MR. Type 2 Diabetes Mellitus as a Conformational Disease / Journal of the Pancreas. 2005;6(4):287–302.
2. Довидченко, Н. В. Механизмы образования амилоидных фибрилл / Н.В. Довидченко, Е.И. Леонова, О.В. Галзитская // Успехи биологической химии. 2014;54:203–230.
3. Селиванова О. М. Структурный полиморфизм и возможные пути образования амилоидных фибрилл на примере белка инсулина/ О.М. Селиванова, О.В. Галзитская // Биохимия. 2012;77:11:1478–1490.