

# **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. Особенно 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  $\beta$ -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  $\beta$ -листы, внутри спирали образуется полость, подобно цилиндру [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 фибриллогенез 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 сворачивание. 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 ретикула (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 Крейтцфельда-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 тиафлавин 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  $\beta$  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 инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C. Инсулин взят в количестве 1 мг на 2 мл трис-НСl 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  $10^{-4}M$ ,  $10^{-5}M$ ,  $10^{-6}M$ ,  $10^{-7}M$ ,  $10^{-8}M$  и неларабин в концентрациях  $10^{-4}M$ ,  $10^{-5}M$ ,  $10^{-6}M$ ,  $10^{-7}M$ ,  $10^{-8}M$  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 тиафлавина Т, обусловленных формированием максимального количества фибриллярных структур в контроле (2 мг инсулина/1мл буфера) и при введении 10 мкл цАМФ и неларабина соответственно.

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

Интенсивность флуоресценции в контроле и при добавлении неларабина в концентрации  $10^{-8}M$  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  $10^{-8}M$  вызывал снижение интенсивности флуоресценции в сравнении с контролем в 6,12 раз, а неларабин в той же концентрации вызывал снижение интенсивности флуоресценции в 6,23 раза; цАМФ в концентрации  $10^{-4}M$  вызывал снижение интенсивности флуоресценции в сравнении с контролем в 4,15 раза, неларабин в концентрации  $10^{-4}M$  вызывал снижение интенсивности флуоресценции в сравнении с контролем в 3,52 раза.

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

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

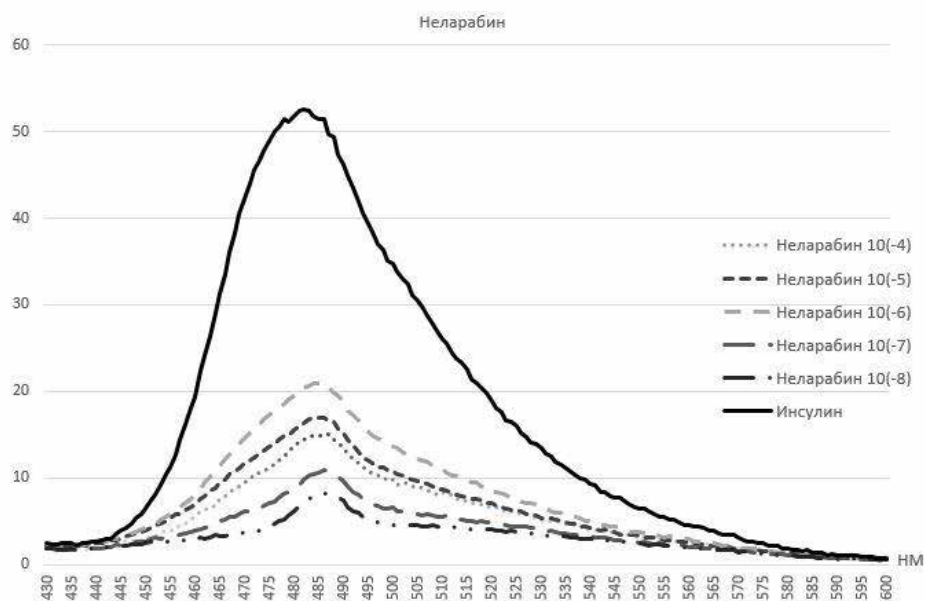


Рис. 1 – Спектр флуоресценции ThT в пробе неларабина

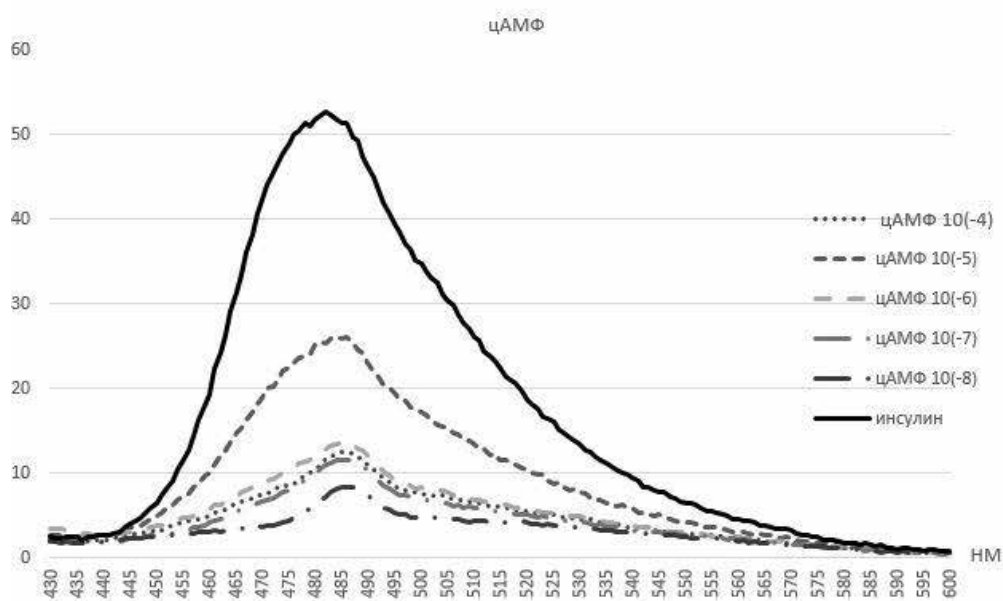


Рис. 2 – Спектр флуоресценции ThT в пробе цАМФ

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.