

ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ПРОЦЕСС ФИБРИЛЛООБРАЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛЫ ИНСУЛИНА

INFLUENCE OF PHYSICO-CHEMICAL FACTORS ON THE PROCESS OF FIBRILLATION OF THE INSULIN MOLECULE

Н. В. Богданова, В. В. Саган, О. А. Соколович
N. Bogdanova, V. Sagan, O. Sokolovich

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

В результате исследований представлены данные о динамике фибриллообразования молекул инсулина при нахождении в различных температурных режимах, а также исследовано влияние pH среды и механического воздействия на процессы образования амилоидов. В экспериментах *in vitro* выявлено три стадии фибриллообразования молекул инсулина.

As a result of the research, data on the dynamics of fibrillation of insulin molecules under different temperature conditions are presented. The influence of the pH of the medium and mechanical action on the processes of amyloid formation is also studied. *In vitro* experiments revealed three stages of fibrillation of insulin molecules.

Ключевые слова: сахарный диабет, инсулин, фибриллообразование, агрегация.

Keywords: diabetes mellitus, insulin, fibrillation, aggregation.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-2-24-27>

Процесс образования белков в клетке состоит из двух этапов – биосинтеза полипептидной цепи и ее сворачивания в нативную трехмерную структуру. Первый процесс – передача информации о последовательности и числе аминокислот, хранящейся в ДНК, и сборка необходимых аминокислот в полипептидную цепь с образованием первичной структуры белка. На этом этапе на основании информации, закодированной в одномерной ДНК, строится одномерная полипептидная цепь белка. На втором этапе происходит фолдинг – сворачивание цепочки аминокислот, из которых образован данный белок и которые определяют его первичную структуру, в уникальную трехмерную структуру. Только правильно сложенные белки проявляют стабильность в условиях насыщенного биологического окружения и способность к селективному взаимодействию с природными партнерами. Однако под воздействием различных внешних условий при образовании пространственной структуры в многоэтапном процессе биосинтеза белка в клетке могут возникать развернутые или неправильно свернутые, ненативные формы белков, склонные к агрегации.

Белок может образовывать различные структуры, в том числе амилоиды, и амилоидные фибриллы. Амилоидоз связан с самым большим классом болезней неправильного сворачивания белков, которые включают широкий спектр неврологических, метаболических и связанных со старением заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, прионную болезнь, болезнь Паркинсона и сахарный диабет 2-го типа. К патологическим признакам амилоидоза относятся структурно консервативные внутриклеточные и внеклеточные нерастворимые белковые отложения, называемые амилоидными фибриллами [1].

Процесс формирования амилоидов, как специфически структурированных фибриллярных агрегатов белков, возможен за счет наличия в аминокислотной последовательности так называемых амилоидогенных участков. Основной вклад в амилоидогенез белка вносят аминокислотные остатки (а.о.), которые способствуют более плотной упаковке белковой структуры. Предсказание амилоидогенных участков с последующим их экспериментальным определением – важный этап на пути понимания особенностей амилоидообразования конкретного белка [2].

Амилоидные фибриллы разного происхождения имеют сходную морфологию. Они представляют собой длинные неразветвленные структуры диаметром несколько нанометров, образованные перевитыми между собой протофибриллами, в которых β -слои ориентированы перпендикулярно оси фибриллы. Образованию амилоидных фибрилл предшествуют конформационные изменения, происходящие в нативном белке под действием химических веществ, температуры, механического воздействия, нагревания, изменения pH и др. Обычно амилоидные фибриллы образуются при инкубации белков, находящихся в промежуточных состояниях, при повышенной температуре и интенсивном перемешивании. Это обусловлено, по-видимому, тем, что для этих белков наряду с минимумом свободной энергии, отвечающим промежуточному состоянию, имеется еще один, достаточно глубокий минимум свободной энергии, отвечающий β -форме белка. В этом состоянии белки склонны к агрегации с образованием амилоидных фибрилл. Переход из промежуточного состояния в β -форму при низкой температуре

происходит очень медленно, поскольку он требует преодоления значительного активационного барьера, разделяющего эти состояния белка. Скорость этого процесса существенно возрастает при инкубации белка при повышенной температуре. Способность к фибриллообразованию имеют многие никак не связанные с заболеваниями белки и пептиды независимо от их функции.

Стрессовые условия могут вызывать образование развернутых форм белков, проявляющих повышенную склонность к агрегации. В процессе биосинтеза белка в клетке сворачивание вновь синтезируемых полипептидных цепей может сопровождаться образованием ненативных форм белков, склонных к агрегации. На клеточном уровне повреждения, связанные с агрегацией белков, носят ограниченный характер и репарируются системой контроля качества белков (protein quality control), включающей шапероны и протеазы. Основная роль в сворачивании белков отводится белкам теплового шока, относящимся к семействам HSP60 (GroEL у бактерий) и HSP70 (DnaK у бактерий). Используя энергию гидролиза АТФ, HSP60 и HSP70 обеспечивают правильное сворачивание вновь синтезируемых полипептидных цепей и корректировку структуры неправильно свернутых белков.

Среди белков теплового шока особое место занимает семейство малых белков теплового шока (sHSP), основной функцией которых является подавление агрегации ненативных форм белков. Представители этого семейства обнаружены практически у всех живых организмов. Характерными признаками данного семейства являются небольшая молекулярная масса мономеров (от 12 до 43 кДа) и склонность к образованию крупных олигомеров с молекулярной массой до 1000 кДа. Отличительной чертой sHSP является наличие в их структуре консервативного α -кристаллинового домена. sHSP не способны обеспечить сворачивание полипептидной цепи, однако они образуют комплексы с ненативными формами белков и могут либо передавать последние на АТФ-зависимые шапероны, либо переносить их в протеасомы, где происходит протеолитическая деградация развернутых белков. Антиагрегационной активностью обладают не только малые белки теплового шока, но и белки теплового шока, построенные из субъединиц более крупного размера.

Предсказание амилоидогенных участков с последующим их экспериментальным определением – важный этап на пути понимания особенностей амилоидообразования конкретного белка. Успешное определение амилоидогенных участков может быть проведено для хорошо изученных белков, у которых известна структура мономера, а также подтверждена возможность образования амилоидных фибрилл. Чаще всего исследованию подвергается такой амилоидогенный белок, как инсулин – гормон белковой природы, который вырабатывается бета-клетками островков Лангерганса поджелудочной железы [3].

В растворе инсулин находится в основном в виде смеси мономеров, димеров и гексамеров, состав которой изменяется в зависимости от концентрации белка и рН раствора. Мономерный инсулин имеет преимущественно α -спиральную структуру, образованную двумя полипептидными α и β цепями, соединенными между собой дисульфидными (S–S) связями через остатки цистеина, α цепь состоит из 21 а.о., имеет две α спиральные области: одну на N-конце, другую – на C-конце. β цепь состоит из 30 а.о., имеет центральную α спираль. Третичная структура этого глобулярного белка образована из обозначенных трех α спиралей, сложенных напротив N- и C-концевых сегментов β цепи. После биосинтеза и секреции *in vivo* инсулин хранится в виде гексамера, координированного ионами цинка (Zn^{2+}). При формировании димера C-концевые участки образуют антипараллельный β -лист. Гексамер с двумя ионами Zn^{2+} имеет тройную ось симметрии и состоит из трех димеров молекул инсулина, попарно объединяющих момеры инсулина. Известно, что ионы Zn^{2+} замедляют процесс фибриллогенеза инсулина, и в фармакологических составах инсулин обычно представлен в виде гексамера, координированного ионами цинка. Однако для быстрой диффузии в инсулиновых помпах белок должен находиться в виде свободных мономеров. Склонность мономеров инсулина при длительном хранении в растворе при температуре выше комнатной к формированию амилоидных фибрилл служит основным препятствием для использования пептида в инсулиновой помпе [2].

Существует модель образования фибрилл инсулина, согласно которой росту амилоидов предшествует диссоциация димеров/гексамеров инсулина до мономеров, образующих в дальнейшем промежуточную структуру, соответствующую ядру нуклеации фибриллы. Также было показано, что первой стадией фибриллогенеза инсулина является переход от нативной к частично развернутой, промежуточной конформации мономера.

В последнее время на основе представлений о наличии общего структурного элемента в амилоидных фибриллах были предложены модели фибрилл инсулина, в которых повторяющейся структурной единицей являются β -арки либо кольцевые олигомеры. Представляет интерес обнаружение в аминокислотной последовательности мономера инсулина амилоидогенных фрагментов, ответственных за формирование остова фибриллы. Для амилоидов характерна высокая устойчивость к химическим физическим воздействиям, таким как изменение температуры и давления, а также к обработке протеазами. Выявление механизмов образования амилоидных фибрилл позволит разработать способы управления процессом фибриллогенеза.

Объектом исследования является субстанция инсулина. Субстанция инсулина – это инсулин без примесей связывающих и противомикробных веществ.

Фибриллы из инсулина были получены путем его инкубирования в течении 3,7,10,22,25,30 часов при комнатной температуре и 37°C в присутствии буферов: Tris (трис), рН 7,4; Hepes (хепес) рН 7,4; Na-фосфатный (рН 8,0), цитратный (рН 4,0). Инсулин взят в количестве 2 мг на 1 мл буфера. Для выявления процесса образования амилоидных фибрилл из инсулина был использован ThT Бензотиазолиновый зонд. Данный краситель широко используется для диагностики возникновения амилоидных и амилоидно-подобных фибрилл, что обусловлено высокой специфичностью взаимодействия тиофлавина с амилоидными фибриллами. При взаимодействии с белками,

которые имеют амилоидные фибриллы квантовый выход красителя возрастает в тысячи раз, при этом он не взаимодействует с белками в нативном, развернутом и частично свернутых состояниях. Спектры поглощения ThT измеряли с помощью спектрофлуориметра Shimadzu RF-5301 PC. Для измерения использовали 10 мкл пробы, 1 мл буфера, 1 мл дистиллированной воды и 10 мкл зонда.

Регистрацию максимума интенсивности флуоресценции красителя производили при длине волны равной 450 нм (возбуждение при 415 нм).

В ходе эксперимента было выяснено, что образование амилоидных фибрилл начинается только после 7 ч инкубации инсулина. Активная полимеризация инсулина происходит до 10–25 ч инкубации. Агрегация белка происходит в результате увеличения времени инкубации до 25 ч. К 30 ч происходит выход интенсивности флуоресценции на плато, что может указывать на насыщение сайта связывания тиофлавина и формирования зрелых амилоидных фибрилл. Таким образом можно выделить 3 участка: участок, который характеризуется незначительным ростом интенсивности флуоресценции тиофлавина, участок роста интенсивности флуоресценции и участок, который характеризуется выходом интенсивности флуоресценции тиофлавина на плато.

В ходе экспериментов было выявлено, что максимум флуоресценции тиофлавина отмечается при комнатной температуре в Hерес буфере (рН 7,4) и составляет $12,064 \pm 0,074$ относительных единиц (отн.ед.), тогда как интенсивность флуоресценции тиофлавина в контроле составила 0,001 отн. ед. (рис. 1). Минимум флуоресценции был отмечен в цитратном буфере (рН 4,0) и составил $5,461 \pm 0,36$ отн. ед, контроль 0,001 отн. ед. соответственно (таблица 1).

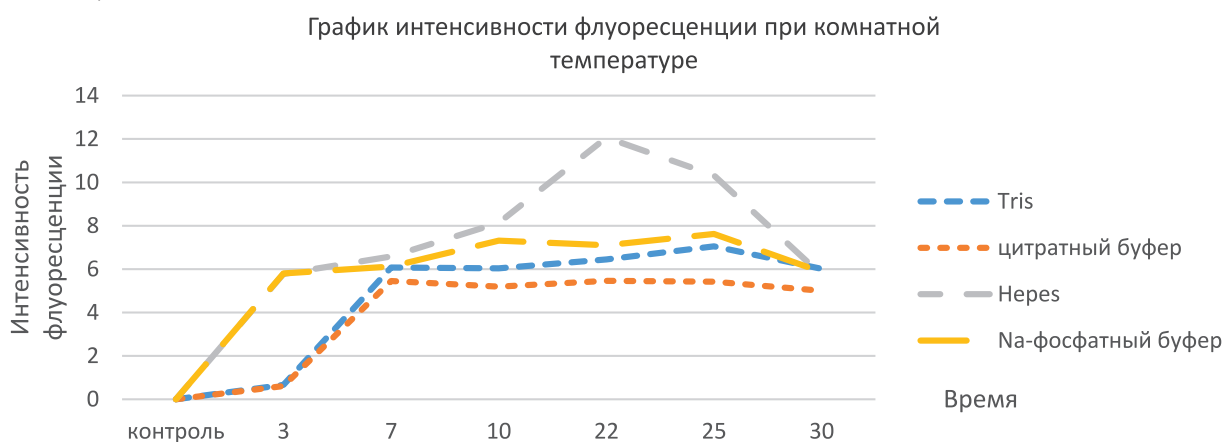


Рис. 1 – Спектры флуоресценции ThT в инсулине при комнатной температуре

Таблица 1 – Показатели интенсивности флуоресценции молекулы инсулина в различных буферах при комнатной температуре

Буфер	Контроль	3 часа	7 часов	10 часов	22 часа	25 часов	30 часов
Tris	0,001	$0,661 \pm 0,074$	$6,078 \pm 0,29$	$6,04 \pm 1,07$	$6,445 \pm 0,35$	$7,051 \pm 0,3$	$6,015 \pm 0,2$
Цитратный	0,001	$0,607 \pm 0,77$	$5,452 \pm 0,05$	$5,197 \pm 0,82$	$5,461 \pm 0,36$	$5,419 \pm 1,08$	$5,005 \pm 0,98$
Hерес	0,001	$5,776 \pm 0,012$	$6,584 \pm 0,36$	$8,132 \pm 0,19$	$12,064 \pm 0,074$	$10,324 \pm 0,73$	$5,73 \pm 0,52$
Na-фосфатный	0,001	$5,8 \pm 0,23$	$6,124 \pm 0,18$	$7,315 \pm 0,063$	$7,104 \pm 0,81$	$7,622 \pm 0,007$	$5,868 \pm 0,075$

При температуре 37°C максимум флуоресценции был отмечен в Na-фосфатном буфере при значении рН = 8,0 (рис. 2) и составил $22,35 \pm 0,018$ отн.ед., контроль - 0,001 отн. ед. Минимум флуоресценции отмечается в Tris буфере при рН 7,4 и составляет $7,497 \pm 0,5$, контроль соответственно составил 0,001 отн. ед. (таблица 2).

Постепенный рост интенсивности флуоресценции тиофлавина был отмечен при инкубации инсулина в Tris буфере, рН 7,4, именно поэтому данный буфер был выбран для дальнейших исследований.

Таблица 2 – Показатели интенсивности флуоресценции молекулы инсулина в различных буферах при температуре 37°C

Буфер	Контроль	3 часа	7 часов	10 часов	22 часа	25 часов	30 часов
Tris	0,001	$0,555 \pm 0,02$	$6,286 \pm 0,07$	$6,407 \pm 0,2$	$7,497 \pm 0,5$	$7,912 \pm 0,023$	$10,996 \pm 0,8$
Цитратный	0,001	$5,44 \pm 1,06$	$5,527 \pm 1,15$	$7,597 \pm 1,62$	$14,365 \pm 0,29$	$10,631 \pm 0,018$	$10,829 \pm 0,0085$
Hерес	0,001	$5,93 \pm 0,09$	$5,713 \pm 0,35$	$7,284 \pm 0,19$	$9,093 \pm 0,16$	$8,064 \pm 0,07$	$5,723 \pm 0,084$
Na-фосфатный	0,001	$6,605 \pm 0,38$	$12,766 \pm 0,75$	$22,1 \pm 0,58$	$22,35 \pm 0,018$	$21,483 \pm 0,19$	$15,966 \pm 0,6$

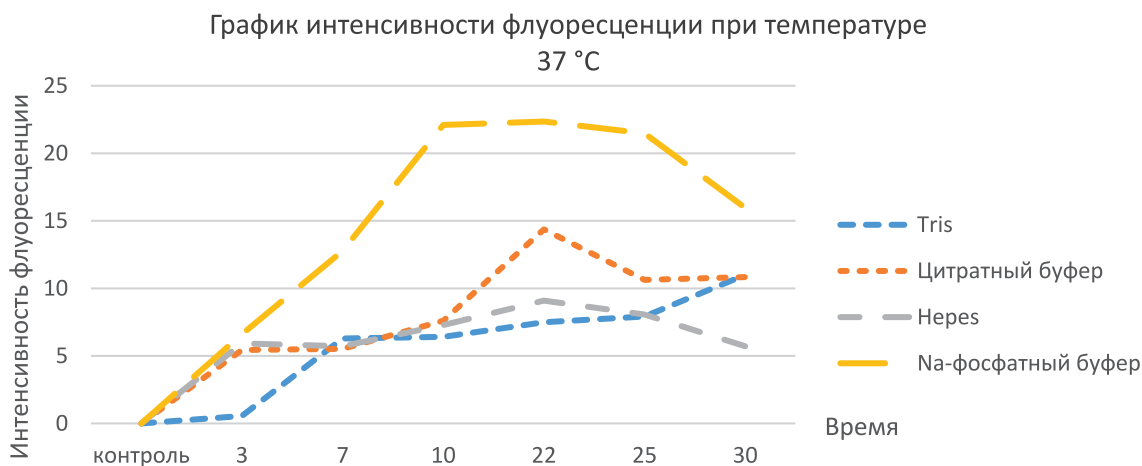


Рис. 2 – Спектры флуоресценции ThT в инсулине при температуре 37 °С

Молекулярный механизм, лежащий в основе формирования амилоидов, до сих пор не выяснен. Связано это с тем, что большое количество факторов может повлиять на конформационный переход белка из нативного состояния в патологическое, с образованием агрегатов. К таким факторам относят протеолитическое расщепление белка, мутации, взаимодействия с лигандами, высокая концентрация белка и другие. Образование амилоидов многими белками, регулируемость этого процесса, широкое распространение в природе подчеркивает биологическую необходимость этих формирований. Исследования в этой области могут быть существенны для формирования представлений об механизме образования амилоидных фибрилл, а также для усовершенствования инсулиновой терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Довидченко, Н. В. Механизмы образования амилоидных фибрилл / Н.В. Довидченко, Е.И. Леонова, О.В. Галзитская // Успехи биологической химии. 2014;54:203–230.
2. Сурин А. К. Определение амилоидогенных участков, входящих в остов фибрилл инсулина / А.К. Сурин, С.Ю. Гришин, О.В. Галзитская // Биохимия. 2019;84:129–137.
3. Сулацкая А. И. Исследование кинетики образования амилоидных фибрилл на основе инсулина / А.И. Сулацкая, Е.А. Волова, Я.Ю. Комиссарчик // Цитология. 2013;55:809–813.

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЛИГАНДОВ БЕЛКА S1 SARS-COV-2 MODELING OF POTENTIAL PROTEIN S1 SARS-COV-2 LIGANDS

С. Д. Бруякин^{1,2}, Д. А. Макаревич¹
S. Bruyakin^{1,2}, D. Makarevich¹

¹ГНУ «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси»,
Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
Минск Республика Беларусь²
bruyakin.sergey@gmail.com

¹Institute of bioorganic chemistry NAN Belarus, Minsk, Republic of Belarus¹

²Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

S1 домен S белка SARS-CoV-2 (далее S1 белок) – вероятно является основным фактором патогенеза при COVID-19. По нашему мнению, элиминация или снижение концентрации этого белка будет уменьшать воспалительный процесс и, соответственно, повреждение органов и тканей активированной иммунной системой. Проведение анализа комплексов Ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2) и S1 белка (ACE2-S1), позволит определить олигопептиды, которые являются лигандами для связывания S1 белка, своевременное удаление которого из крови пациентов с коронавирусной инфекцией (COVID-19) позволит предотвратить развитие тяжелых мультиорганных осложнений. Кроме того, иммобилизованный олигопептид, связывающий S1 белок, будет способен удалять из организма вирусные частицы, находящиеся во внеклеточном пространстве [1].