

ВЛИЯНИЕ ЛИПИДОВ НА АГРЕГАЦИЮ ИНСУЛИНА И ЕГО ДАЛЬНЕЙШУЮ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ

Матвеевко М. А.

Научный сотрудник, Техасский государственный университет A&M, Колледж-Стейшн, США

mmatveyenka@icloud.com

Шолух М. В.

Кандидат биологических наук, Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

mvsh35@gmail.com

Аннотация. Установлено, что такие липиды как кардиолипин и фосфатидилсерин с одной стороны значительно ускоряют агрегации инсулина, сокращая лаг-фазу кривой агрегации, а с другой – проявляют выраженный антиагрегационный эффект. В присутствии данных липидов инсулин образует морфологически различные агрегаты, обладающие значительно меньшей токсичностью для нейронов клеточной линии N27, чем фибриллы, выращенные в среде без липидов.

Ключевые слова: амилоидные белки; инсулин; цитотоксичность; атомно-силовая микроскопия

IMPACT OF LIPIDS ON INSULIN AGREGATION AND ITS FURTHER CITOTOXITY

Matveyenka M. A.

Research Specialist, Texas State University A&M, College-Station

mmatveyenka@icloud.com

Sholukh M. V.

Candidate of Biological Sciences, Belarusian State University, Minsk

mvsh35@gmail.com

Annotation. It was found that lipids such as cardiolipin and phosphatidylserine, on the one hand, significantly accelerate the aggregation of insulin, reducing the delayed phase of the aggregation curve, and on the other hand, exhibit a pronounced anti-aggregation effect. In the presence of these lipids, insulin forms morphologically different aggregates that are significantly less toxic to neurons of the N27 cell line than fibrils grown in a lipid-free environment.

Keywords: amyloid proteins; insulin; cytotoxicity; atomic force microscopy

Точная причина патологий, связанных с амилоидными белками неизвестна, но понятно, что неправильный фолдинг белка и высокая его концентрация являются одними из факторов, способствующих появлению амилоидных агрегатов [1-2]. Показано, что присутствие определенных аминокислотных остатков влияет на самосборку белков [3]. Эти самые остатки образуют структуру β -листа, стабилизируемую водородными связями. Таким образом, минимизация энергии неправильно свернутых белков с такими аминокислотными последовательностями приводит к их объединению в структуру β -листа [4]. В результате образуются белковые олигомеры. Амилоидные олигомеры могут способствовать агрегации неправильно свернутых белков, что приводит к образованию фибрилл [5-6]. В этом случае два β -листа соединяются вместе плоскость к плоскости, образуя еще более термодинамически стабильный поперечный β -лист [7], который растягивается на микроны в длину в направлении, перпендикулярном пептидным нитям в β -листах [8]. Фибриллы скручиваются в спираль, образуя большие надмолекулярные сборки с витой или лентообразной морфологией [9].

Изучая эти фибриллы, мы исследовали, в какой степени липиды изменяют морфологию и цитотоксические свойства амилоидных агрегатов. В качестве объектов влияния выбраны фосфатидилсерин (PS) и кардиолипин (CL), имеющие высокое содержание в плазме и мембранах клеточных органелл.

Материалы и методы.

Приготовление липидных везикул. Для формирования крупных однослойных везикул размером 100 нм, использовали экструдер с мембраной 100 нм (Avanti, США), через который пропускали раствор липидов 10 раз в каждую сторону, после пятикратной процедуры заморозки и оттаивания растворов этих липидов. Диаметр везикул измеряли методом динамического рассеяния света (DLS) на приборе DynaPro NanoStar II (WYATT, США).

Измерение агрегации инсулина. Инсулин (400 μ M) растворяли в натрий-фосфатном буфер (НФБ) и агрегировали в присутствии липидов, смешивая с растворами липидов в молярном соотношении 1:1. К смеси добавляли флуорофор тиофлавин Т (20 μ M) и инкубировали при 37 °C в течение 24 ч [7]. Измерение флуоресценции производили в триплетах на планшетном считывателе (Tecan, США). Результаты обрабатывали в программе Microsoft Excel 2022.

Атомно-силовая микроскопия. Морфологию белково-липидных структур исследовали методом атомно-силовой микроскопии (Horiba, США). Образцы фиксировали на стекле и сканировали с помощью золотого наконечника.

Тест на цитотоксичность. Клеточную линию нейронов мышей N27 выращивали в культуральной среде RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific, США) с

10% фетальной бычьей сывороткой (FBS) (Invitrogen, США) в планшете с 96 лунками для адгезивных клеток (5000 клеток на лунку) при температуре 37 °С и 5 % CO₂. Клетки N27 делятся приблизительно один раз в 12 ч. Следовательно, после 24 ч инкубации клетки достигали количества 20 000 в каждой лунке. После этого среду с 10% сыворотки заменяли на среду с 5% FBS, содержащей образцы белка. Это было сделано для снижения концентрации FBS, которая, в свою очередь, требовалась при анализе на цитотоксичность при детекции лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в среде, для снижения базового уровня поглощения в контроле. После 48ч инкубации определение лактатдегидрогеназы (LDH) проводили на клеточной среде с использованием коммерческого набора на цитотоксичность CytoTox 96 (Promega, США). Измерения абсорбции проводились в планшетном считывателе (Tecan, США) при длине волны 450 нм. Каждая лунка была измерена 25 раз в разных местах. Все измерения были проведены в трех повторах.

Результаты. На первом этапе мы исследовали влияние липидов на изменение морфологической структуры белка и скорость его агрегации. Для этого инсулин смешивали в соотношении 1:1 с PS и CL. Затем растворы смешивали с Тиофлавином Т (ThT) и инкубировали при температуре 37 °С при перемешивании со скоростью 510 об/мин. Агрегация инсулина в НФБ, не содержащей липидов, имела четко выраженную лаг-фазу, за которой последовало быстрое увеличение интенсивности ThT, что указывало на образование белковых агрегатов. Мы обнаружили, что липиды могут сокращать лаг-фазу (t_{lag}) агрегации инсулина.

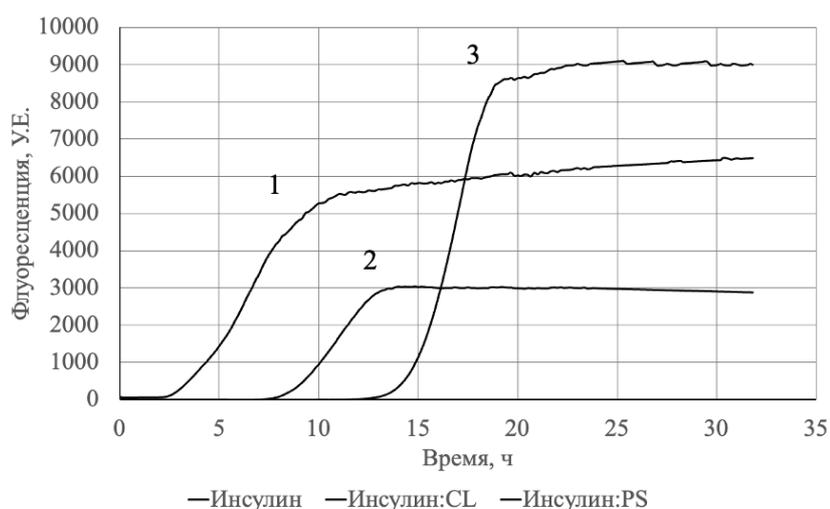


Рисунок 1 – Влияние липидов на агрегацию инсулина

Примечание: 1 – инсулин+CL; 2 – инсулин+PS; 3 – инсулин.

Как показано на рисунке 1, агрегация инсулина ускоряется в присутствии липидов. Кардиолипин и фосфатидилсерин с одной стороны значительно ускоряют агрегацию инсулина, сокращая лаг-фазу кривой агрегации в 2 и 5 раз соответственно, а с другой – проявляют выраженный антиагрегационный эффект, выразившийся в снижении уровня агрегатов инсулина в 1,4 и 3 раза.

Морфологическую структуру агрегатов инсулина, выращенных в присутствии липидов, оценивали методом АСМ. Согласно результатам, представленным на рисунке 2 видно, что без липидов инсулин образует удлиненные фибриллярные комплексы, имеющие 10-15 нм в высоту. В присутствии CL наблюдается агрегация инсулина, приводящая к образованию коротких сферических агрегатов гормона со средним диаметром 45 нм и фибрилл длиной ~ 180-210 нм и высотой 7 нм. Аналогичные агрегаты наблюдались для PS.

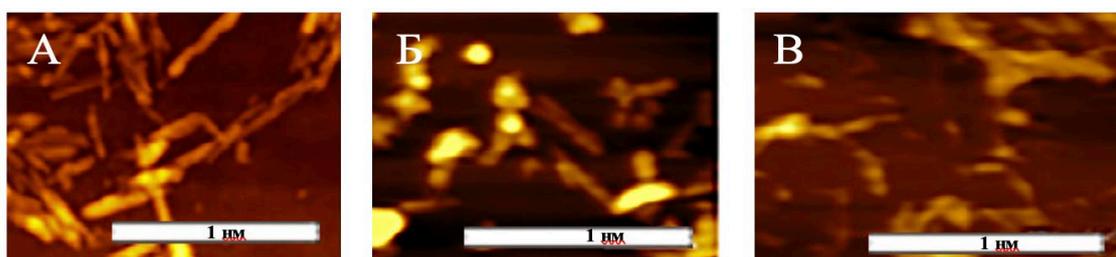


Рисунок 2 – Морфология агрегатов инсулина, выращенных в присутствии липидов

Примечание: Фото получены с помощью сканирующего атомно-силового микроскопа.

А – инсулин; Б – инсулин+CL; В – инсулин+PS. Референтная шкала длиной 1 нм.

Как следует из рисунка 3, липиды существенно снижают цитотоксический эффект инсулина на жизнеспособность нейронов клеточной линии N27. При этом действие фосфатидилсерина оказалось более выраженным, чем таковое кардиолипина.

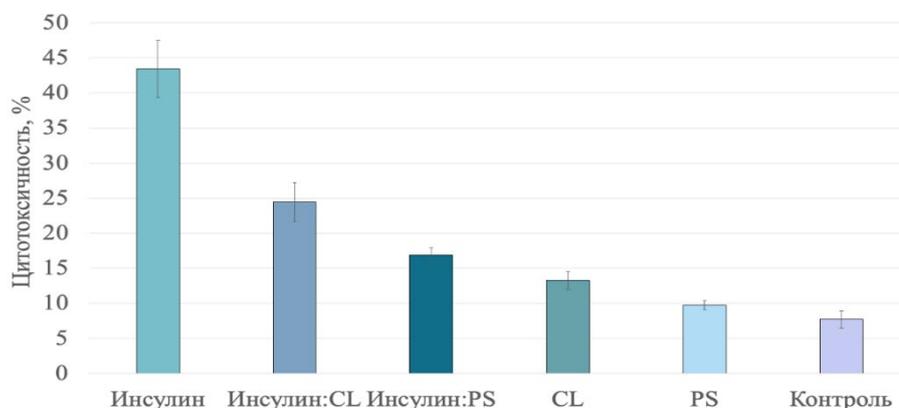


Рисунок 3 – Влияние липидов на цитотоксическое действие инсулина.

Примечание: контроль –клетки без инсулина и липидов

В заключение следует отметить, что такие липиды как кардиолипин и фосфатидилсерин, как показано выше, с одной стороны значительно ускоряют агрегацию инсулина, сокращая лаг-фазу кривой агрегации, а с другой – проявляют выраженный антиагрегационный эффект. В присутствии данных липидов инсулин образует морфологически различные агрегаты, обладающие значительно меньшей токсичностью для нейронов клеточной линии N27, чем фибриллы, выращенные в среде, не содержащей липидов.

Список литературы

1. Chiti, F. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade / F. Chiti, C.M. Dobson // *Biochemistry*. – 2017. – № 86. – С. 27-68.
2. A new era for understanding amyloid structures and disease / M.G. Iadanza, M.P. Jackson, E.W. Hewitt [и др.] // *Nature reviews molecular cell biology*. – 2018. – № 19. – С. 755–773.
3. Secondary Structure of α -Synuclein Oligomers: Characterization by Raman and Atomic Force Microscopy / M.M. Apetri, N.C. Haiti, M.G. Zagorski [и др.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2006. – Т. 355, № 1. – С. 53-71.
4. Chickos, J.S. Thermolysis of (1R,2R)-1,2-dideuteriocyclobutane. An application of vibrational circular dichroism to kinetic analysis / J.S. Chickos, A. Annamalai, T.A. Keiderling // *Journal of the American Chemical Society*. – 1986. – № 108. – С. 398–402.
5. Batista, J.M. Recent advances in the use of vibrational chiroptical spectroscopic methods for stereochemical characterization of natural products / J.M. Batista, E.W. Blanch, Vda S Bolzani // *Natural Product Reports*. – 2015. – № 32. – С. 280–302.
6. Absolute configuration of tert- Butyl-1-(2-methylnaphthyl) phosphine oxide / F. Wang, Y. Wang, P.L. Polavarapu [и др.] // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2002. – № 67. – С. 539-541.
7. Impact of membrane curvature on amyloid aggregation / M.S. Terakawa, Y. Lin, M. Kinoshita [и др.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2018. – Т. 1860, № 9. – С. 1741-1764.
8. Localized Amyloidosis at the Site of Repeated Insulin Injection in a Diabetic Patient / Y. Shikama, J.I. Kitazawa, N. Yagihashi [и др.] // *Internal Medicine*. – 2010. – Т. 49 397-401, № 5. – С. 397-401.

9. The molecular basis of distinct aggregation pathways of islet amyloid polypeptide / L. Wei, P. Jiang, W. Xu [и др.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – № 286. – С. 6291–6300.