

Вgl2p – белок клеточной стенки дрожжей с амилоидными свойствами и его взаимодействие с инсулином человека

Работу выполнил:

Прозоров М. А.

Научные руководители:

профессор, д.б.н. Калеева Т.С.

профессор, д.б.н. Камзолкина О.В.

Московский Государственный Университет

им. М.В. Ломоносова

Биологический факультет

Кафедра микологии и альгологии

Актуальность

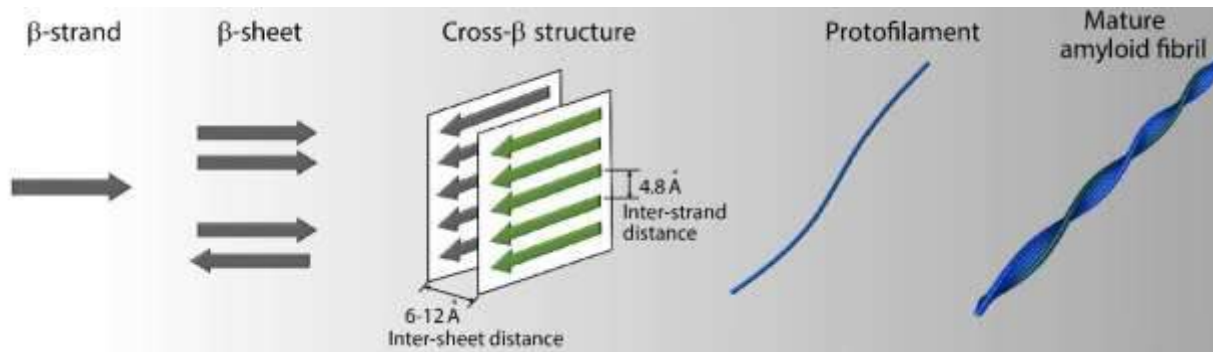


Схема строения амилоидной фибриллы (Cao et al., 2019)

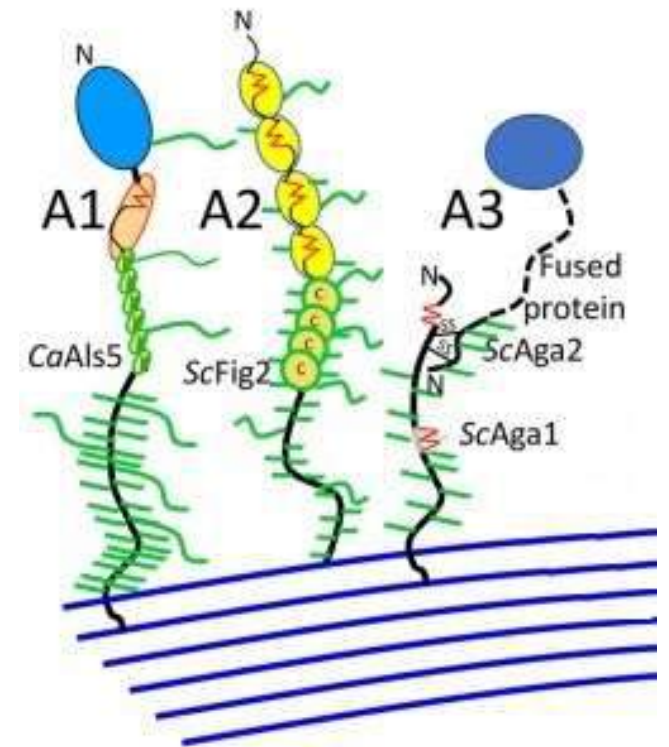
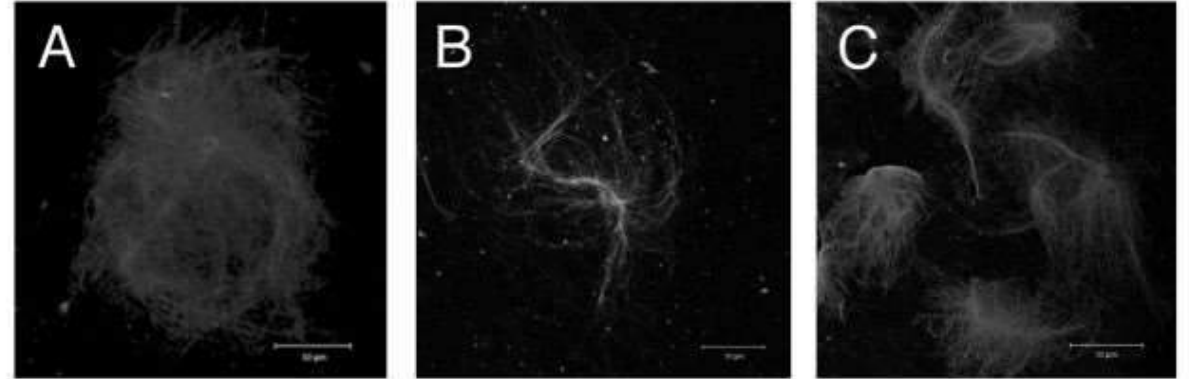


Схема строения некоторых белков клеточной стенки дрожжей с амилоидными свойствами (Lipke, 2018)

Актуальность

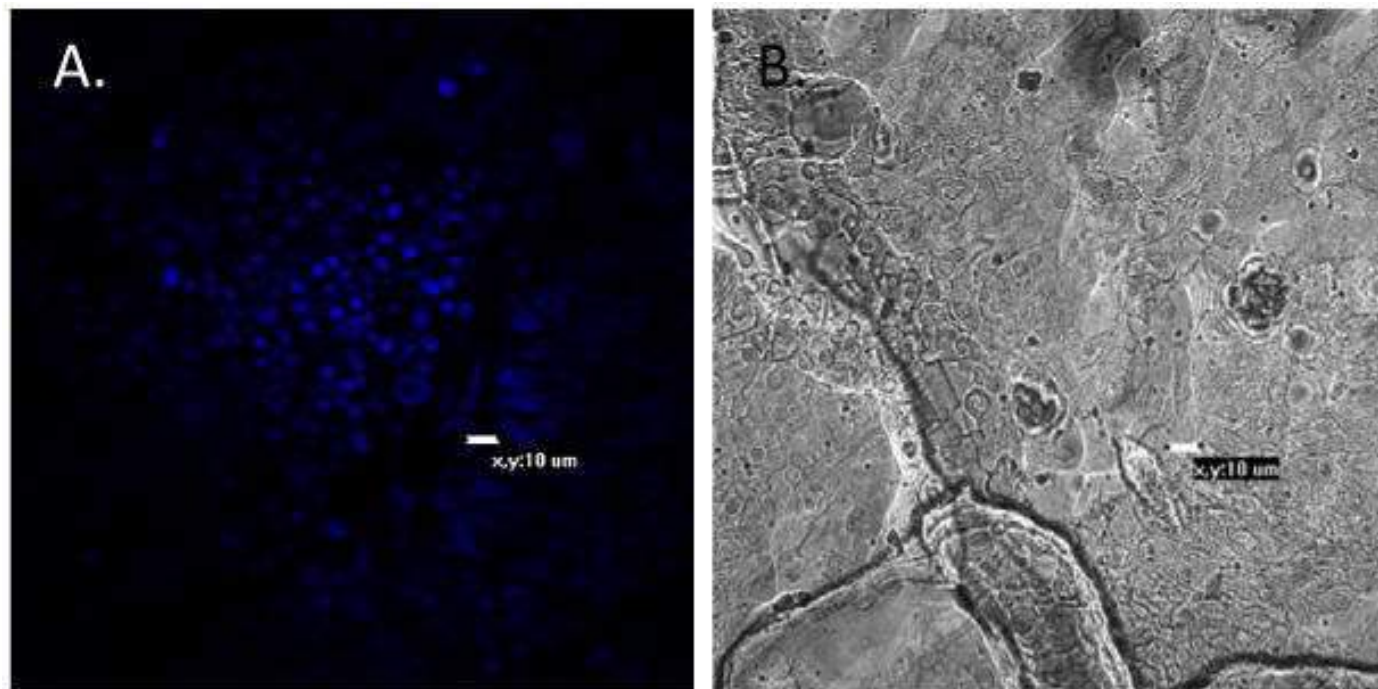
Белок **Bgl2p**:

- Консервативный
- Конститутивный
- Мажорный
- В составе клеточной стенки устойчив к обработке трипсином и SDS, нековалентно связан с глюканом
- Присутствует в клеточной стенке аскомицетных дрожжей родов *Saccharomyces*, *Candida* и других
- Способен образовывать фибриллы из кросс-бета-слоевых структур



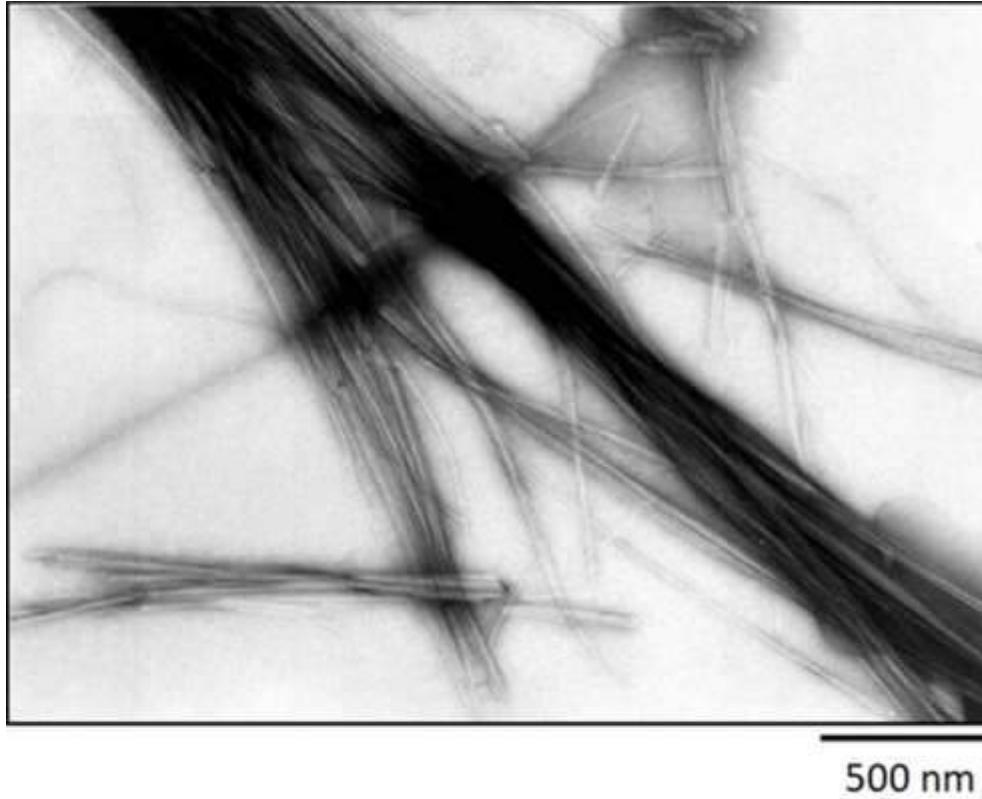
Флуоресцентные микрофотографии фибрилл, образуемых Bgl2p после выделения из клеточной стенки (Бессонов и др., 2013)

Актуальность

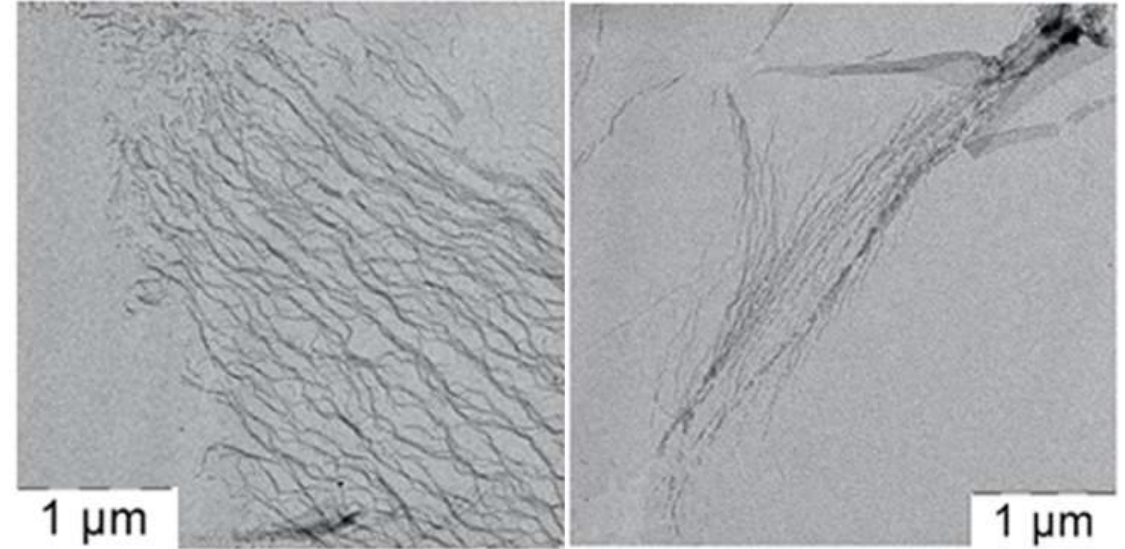


Флуоресцентная (А) и световая (В) микроскопия клеток *Candida* spp., содержащих в своей клеточной поверхности амилоидные белки, в ткани человека. Окраска тиофлавином-Т (Garcia et al., 2013).

Актуальность



Электронная микроскопия фибрилл, образуемых инсулином (Галзитская и др., 2012)



Просвечивающая электронная микроскопия инкубационной среды, содержащей инсулин и клеточные стенки клеток дрожжей, содержащих Vgl2p (Драгоны, 2021)

Цель и задачи

- **Цель работы:** изучить роль потенциального индуктора амилоидозов – белка клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, Bgl2p – в процессе фибриллизации инсулина.
- **Задачи:**
 1. Исследовать процесс образования кросс-бета-слоёв в инсулине с использованием в качестве модельного белка препарата НовоРапид (инсулин аспарт) в отсутствие индукции
 2. Исследовать процесс образования кросс-бета-слоёв в инсулине в присутствии клеточных стенок дрожжей *S. cerevisiae*, содержащих и не содержащих белок Bgl2p
 3. Исследовать структуры, образующиеся в препарате инсулина НовоРапид (инсулин аспарт) в присутствии и в отсутствие клеточных стенок дрожжей *S. cerevisiae*, содержащих и не содержащих белок Bgl2p.

Материалы и методы

- Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* штаммов BY4742 («дикий тип») и $\Delta bgl2p$ (« Δ -штамм»)
- Коммерческий препарат инсулина для подкожного введения НовоРapid (инсулин аспарт, ООО «Ново Нордикс» Россия)
- Культивирование дрожжей *S. cerevisiae* штаммов BY 4742 и $\Delta bgl2p$ и получение их клеточных стенок
- Инкубация образцов, содержащих инсулин, в различных условиях в отсутствии клеточных стенок
- Инкубация образцов, содержащих инсулин, в присутствии клеточных стенок, содержащих и не содержащих $Bgl2p$
- Исследование образцов методами флуориметрии (Varian Cary Eclipse, окраска тιοфлавином-Т) и спектрофотометрии (Varian Cary 50, окраска Congo Red)
- Работа с флуоресцентным микроскопом (Carl Zeiss Axiovert 200M LSM 510 META)
- Подготовка образцов к трансмиссионной электронной микроскопии
- Работа с ТЭМ (JEOL JEM-1011)

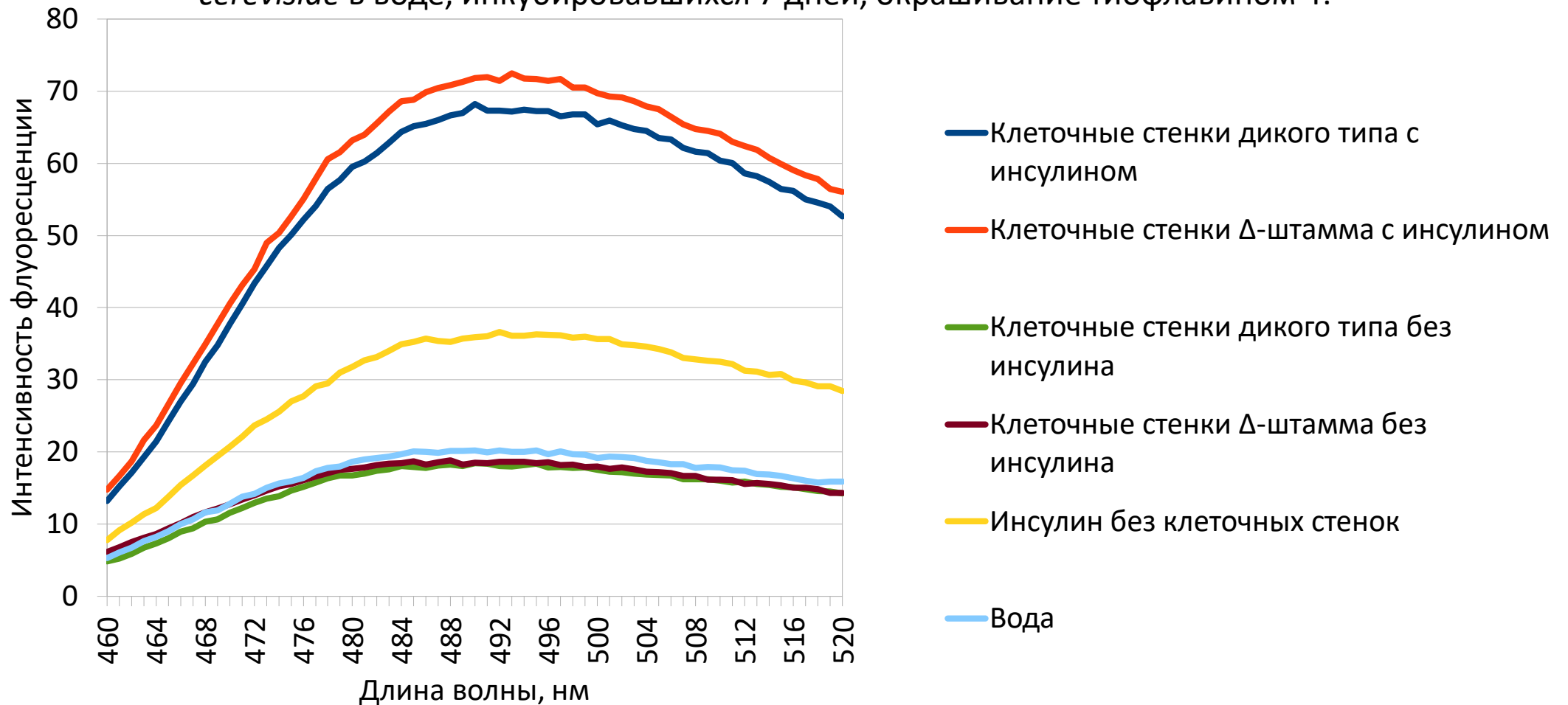
Результаты: Флуориметрия образцов, содержащих инсулин в отсутствие клеточных стенок *S. cerevisiae*

Название среды инкубации	pH	Максимальная интенсивность флуоресценции, у. е.	Время для достижения максимума интенсивности флуоресценции	Уменьшение интенсивности флуоресценции после максимума
Филиппс	7,4	978	5 суток	Есть
Нильсен-1	2	133	8 суток	Есть
Нильсен-2	7,4	511	5 суток	Есть
Нильсен-2'	7,4	1000	5 суток	Есть
Нильсен-3	1,6	1000	8 суток	Нет
Галзитская	2	1000	8 суток	Есть

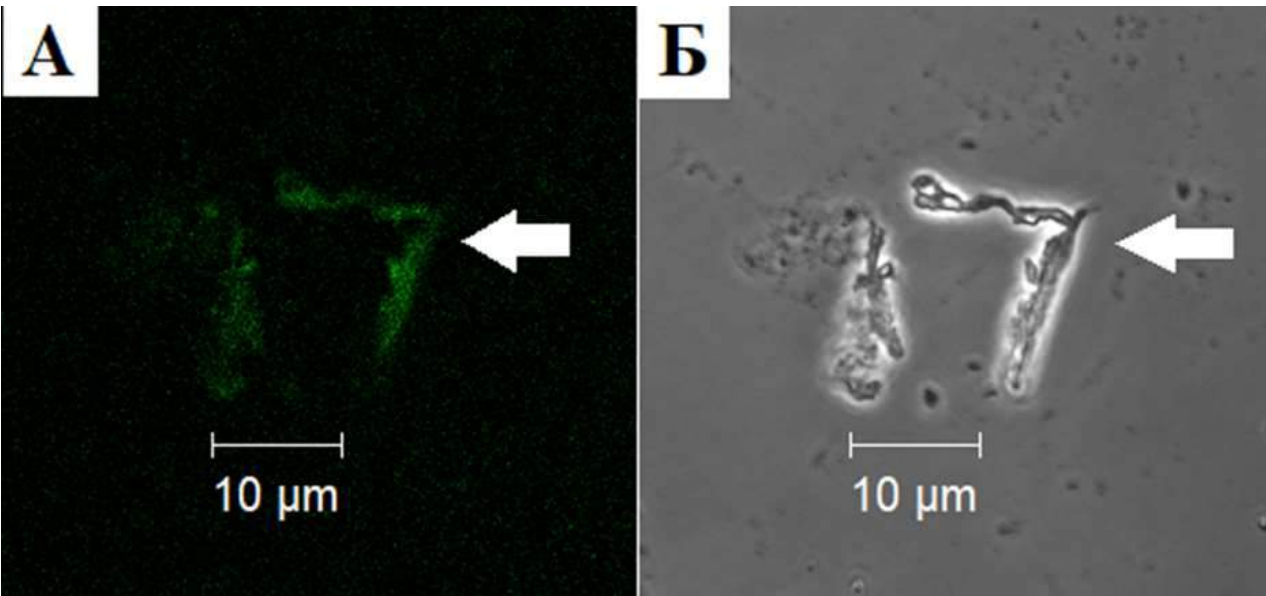
(Phillips et al., 2012; Nielsen et al., 2001, Галзитская и др., 2019)

Результаты. Флуориметрия образцов, содержащих инсулин и клеточные стенки *S. cerevisiae*, содержащие и не содержащие Bgl2p.

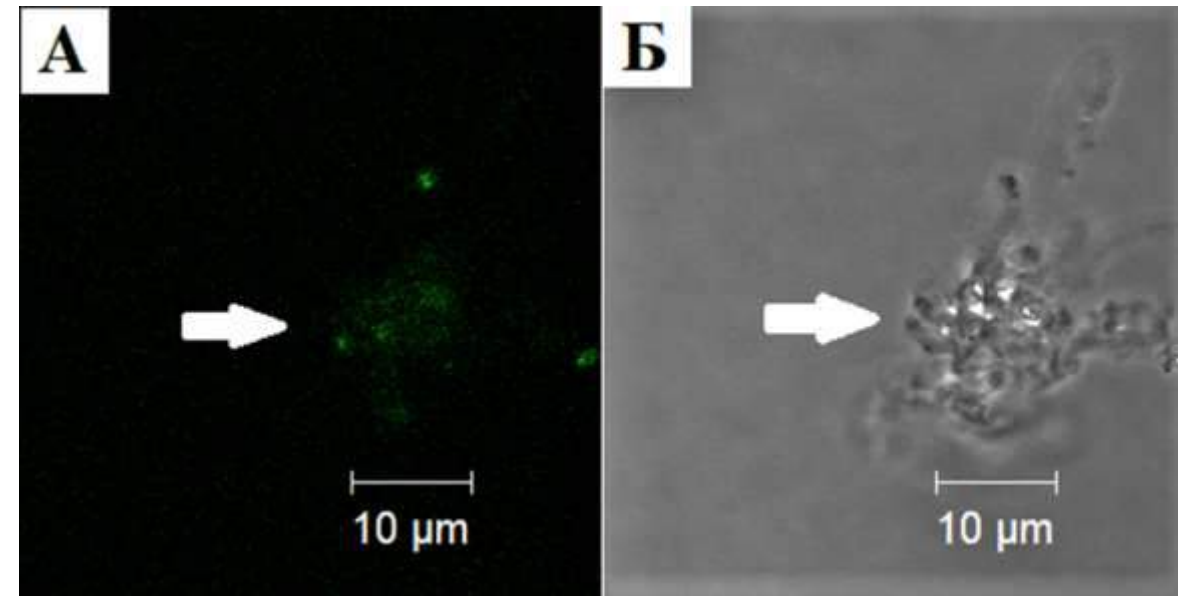
Спектры флуоресценции образцов, содержащих инсулин и клеточные стенки *S. cerevisiae* в воде, инкубированных 7 дней, окрашивание тиофлавином-Т.



Результаты. Флуоресцентная микроскопия образцов, содержащих инсулин и клеточные стенки *S. cerevisiae*, содержащие и не содержащие Bgl2p.

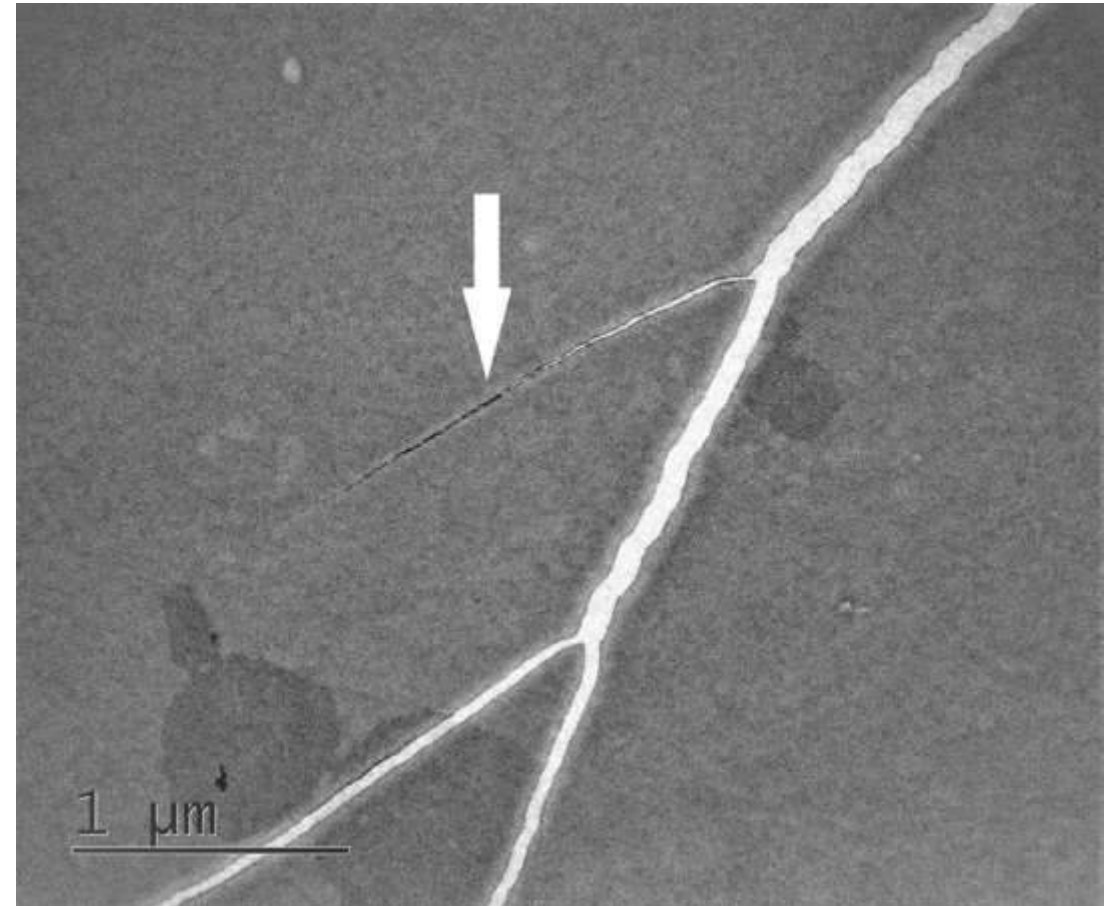
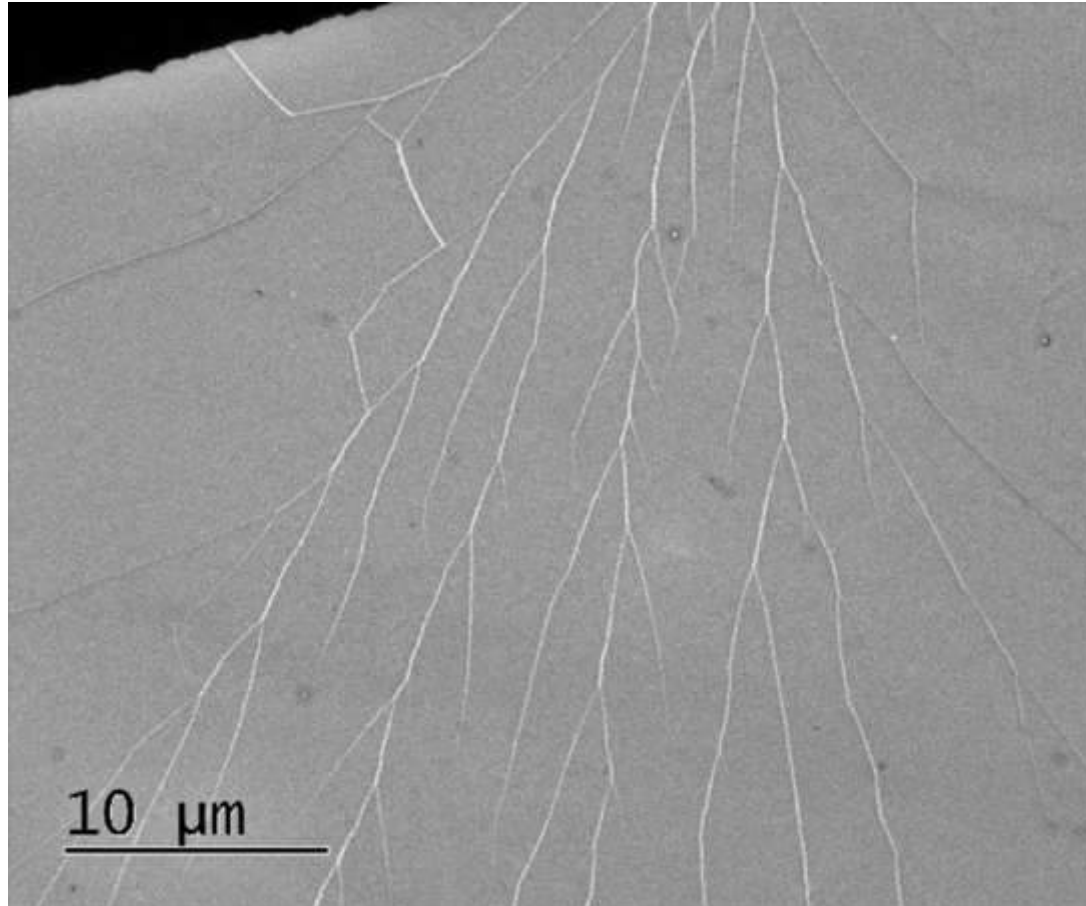


Флуоресцентная и конфокальная микроскопия образца, содержащего инсулин и клеточные стенки дикого типа, 3 дня инкубации



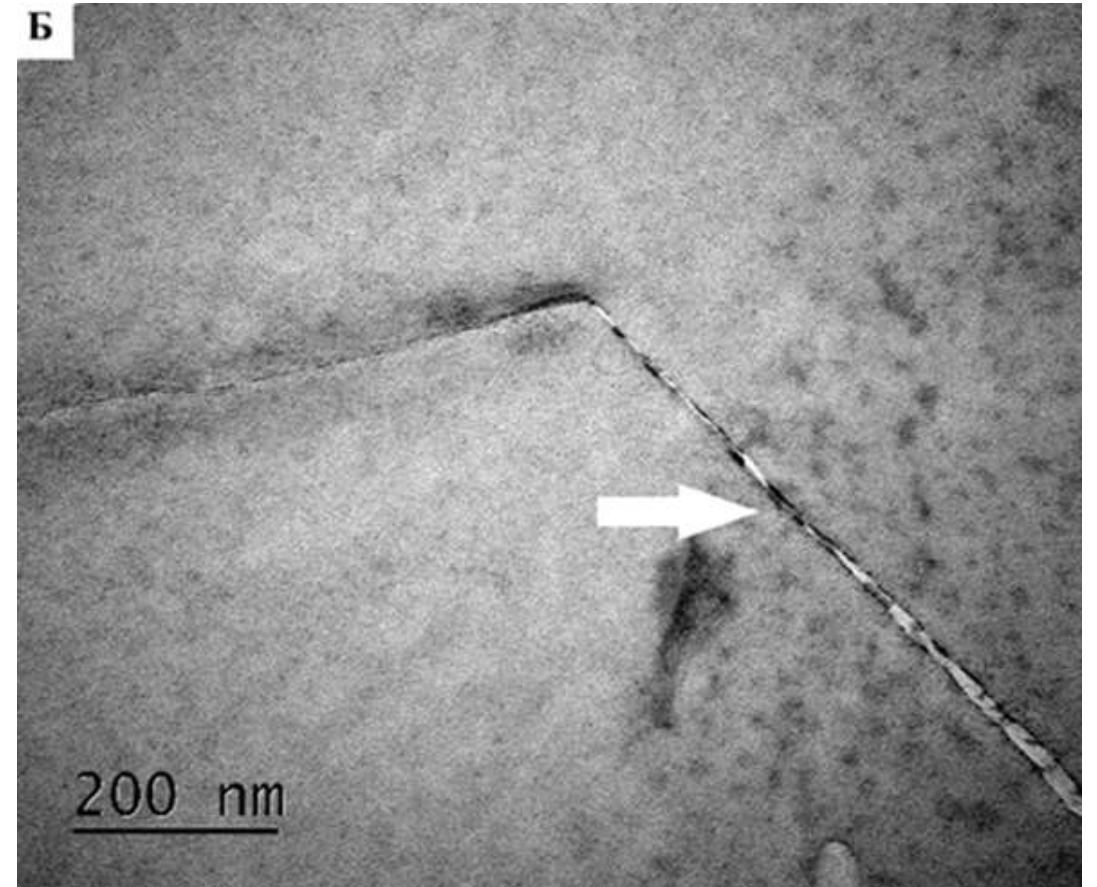
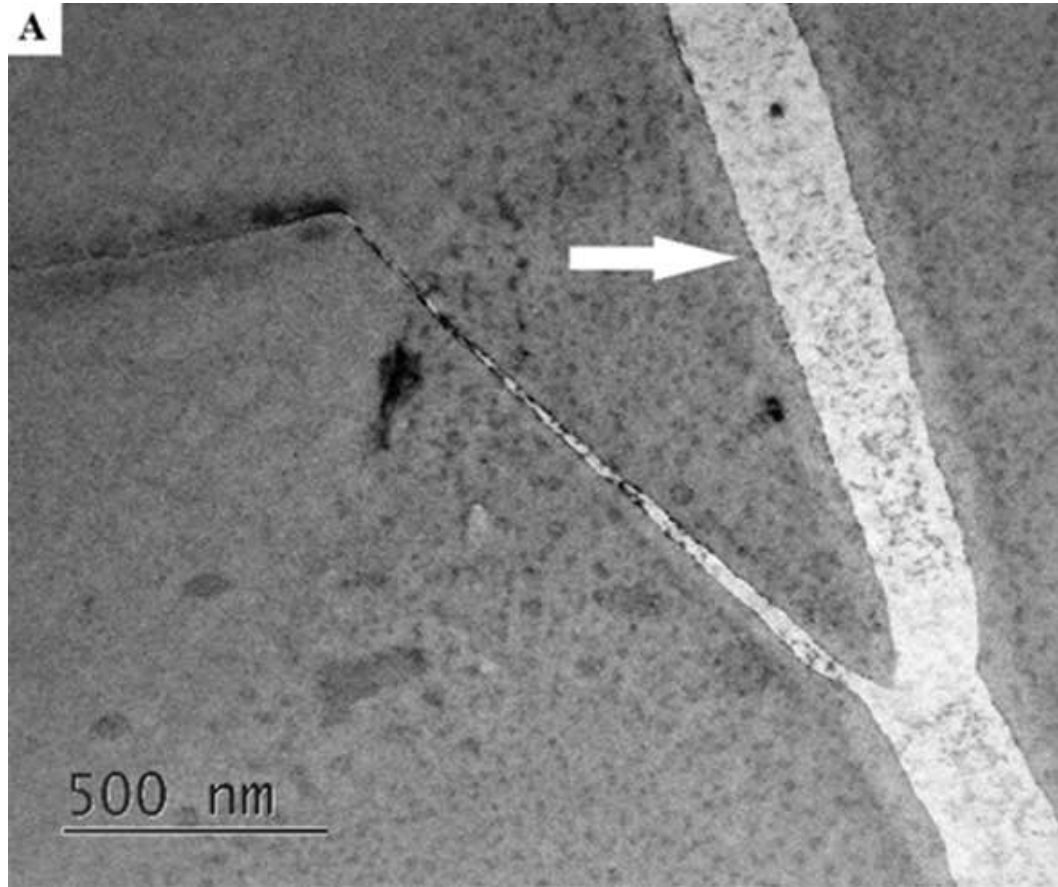
Флуоресцентная и конфокальная микроскопия образца, содержащего инсулин без добавления клеточных стенок, 3 дня инкубации

Результаты. Трансмиссионная электронная микроскопия.



Просвечивающая электронная микроскопия образца, содержащего инсулин и клеточные стенки дикого типа, контрастирование фосфовольфрямовой кислотой.

Результаты. Трансмиссионная электронная микроскопия. Структура фибрилл, образующихся в препарате инсулина в результате инкубации с клеточными стенками *S. cerevisiae*, содержащими Bgl2p



Просвечивающая электронная микроскопия образца, содержащего инсулин и клеточные стенки дикого типа, контрастирование фосфовольфрамовой кислотой и уранилацетатом.

Выводы

- Изучен процесс образования кросс-бета-слоёв в препаратах инсулина НовоРапид (инсулин аспарт) при инкубации в отсутствии индукторов в различных условиях. Корреляции значения pH и образования кросс-бета-слоёв не обнаружено.
- Обнаружена индукция образования кросс-бета-слоёв в инсулине клеточными стенками *S. cerevisiae*, содержащими и не содержащими белок Bgl2p, в различных условиях. Это свидетельствует о том, что белок Bgl2p не является решающим фактором в индукции образования кросс-бета-слоёв в инсулине.
- Показано, что в препарате инсулина в результате инкубации с клеточными стенками *S. cerevisiae*, содержащими Bgl2p, в отличие от препарата, инкубированного с клеточными стенками, не содержащими Bgl2p, образуются фибриллярные структуры. Это свидетельствует о важной роли Bgl2p в индукции фибриллизации инсулина.

Спасибо за внимание!