

Badanie wpływu amyliny na modelowe rafty lipidowe

Daria Gąska

Promotor: dr Joanna Juhaniwicz – Dębińska

Opiekun: mgr Kinga Burdach

Abstrakt:

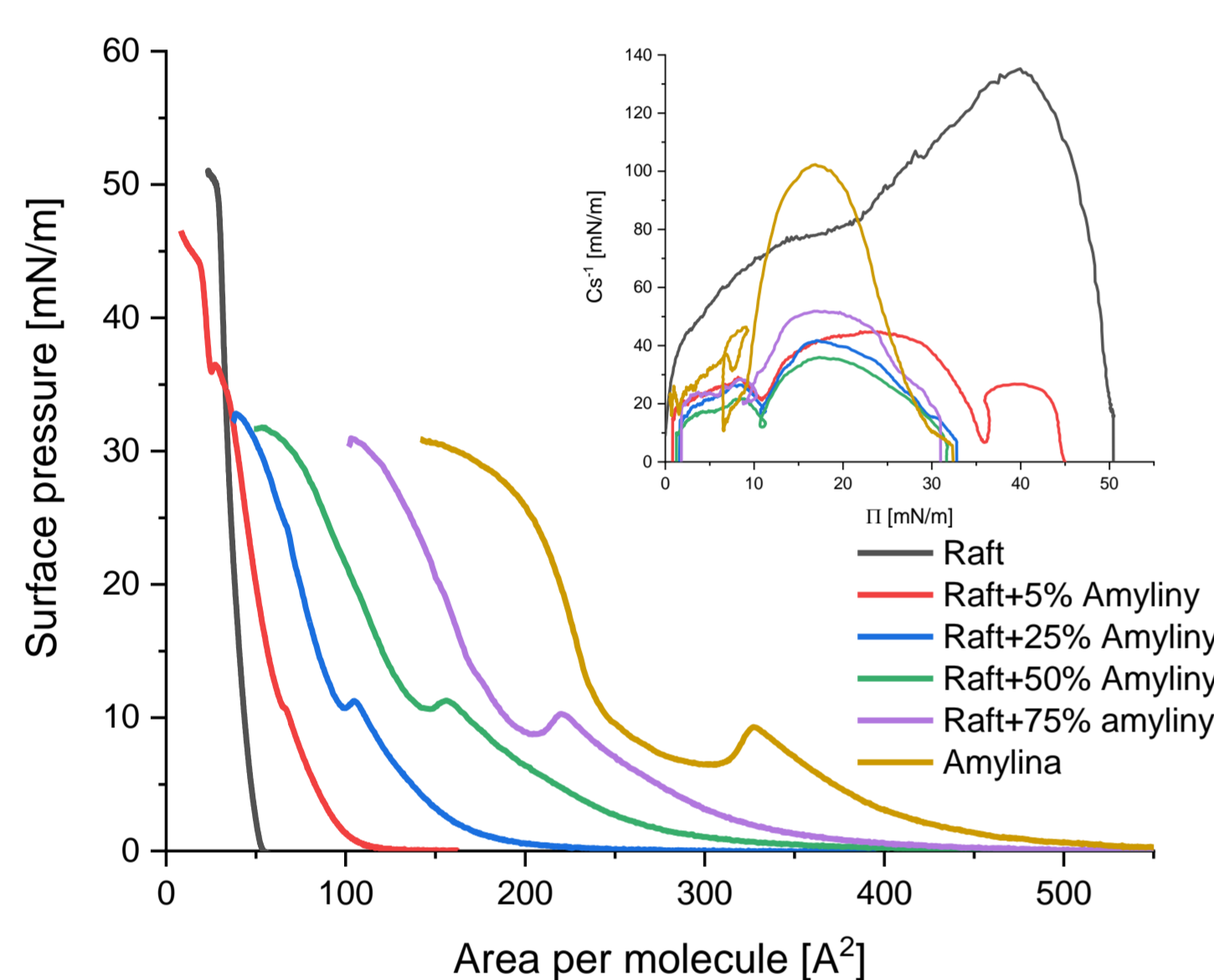
U osób cierpiących na cukrzycę typu II w komórkach β trzustki zaobserwowano występowanie złogów amyloidu, których głównym składnikiem jest amyлина. Amyлина jest hormonem trzustkowym, który z nieznanymi przyczynami w wyniku oddziaływań z błonami komórkowymi wykazuje zdolność do formowania fibryli amyloidowych pełniących funkcję wypełniacza po obumarłych komórkach β wysp Langerhansa trzustki. Śmierć komórek β trzustki produkujących insulinę przyczynia się do rozwoju cukrzycy typu II. Przyjmuje się, że amyлина oddziałuje z gangliozydami, które są jednym ze składników tworzących rafty lipidowe. Rafty lipidowe są to natomiast dynamicznie formujące się struktury w błonie komórkowej. Dlatego też celem mojej pracy było zbadanie wpływu amyliny na modelowe rafty lipidowe zawierające gangliozyd GM3.

Wykorzystane techniki:

- Wanna Langmuira, która służy do otrzymywania oraz badania monomolekularnych warstw na granicy faz ciesz - gaz oraz ciecz - ciecz
- Mikroskopia fluorescencyjna, którą stosuje się do obrazowania modeli błon komórkowych.

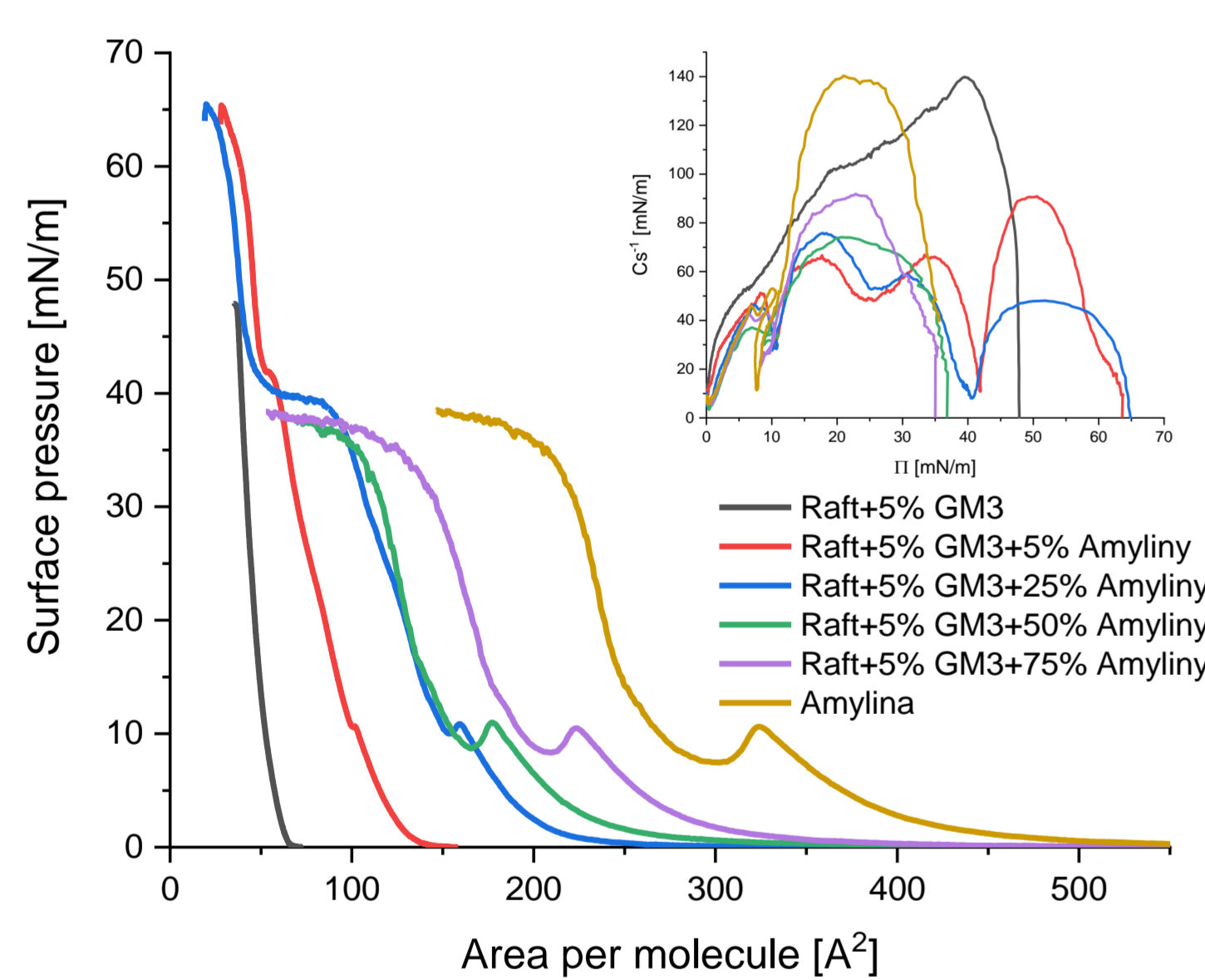
Monowarstwy raft lipidowych utworzono z DOPC, sfingomielinu i cholesterolu. Wykorzystaną subfazą był 10 mM roztwór HEPES z dodatkiem 100 mM NaCl o pH=7,4.

Izotermy raftu z amyliną otrzymane za pomocą wanny Langmuira:



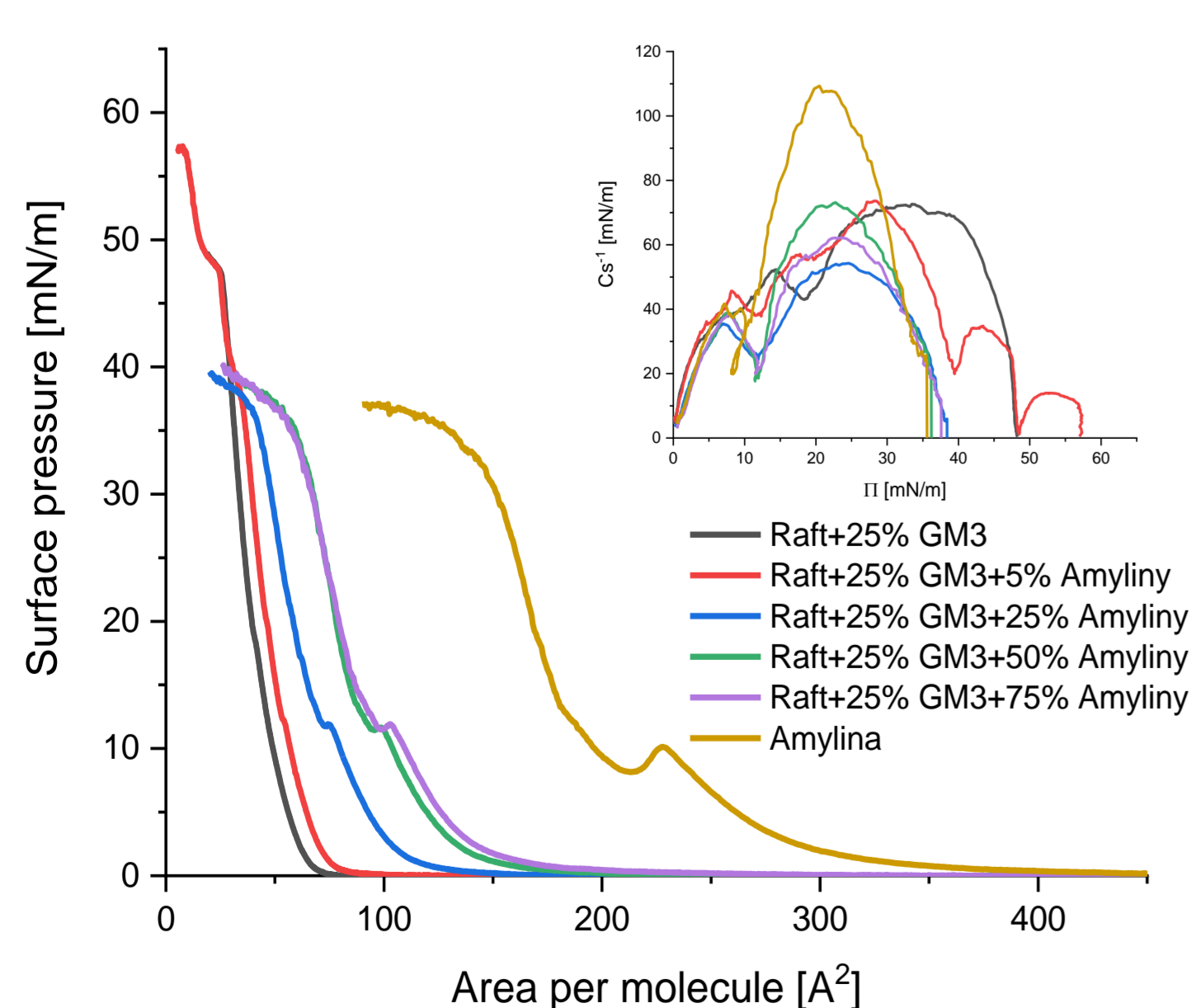
Dodanie amyliny powoduje, że izotermy przesuwają się w stronę większych powierzchni, co oznacza, że tworzy się mniej upakowana monowarstwa. Ponadto dodatek peptydu zmniejsza maksimum wartości Cs^{-1} .

Izotermy raftu z 5% ilością GM3 i amyliną otrzymane za pomocą wanny Langmuira:



W wyniku dodania amyliny ponownie tworzy się mniej upakowana monowarstwa. Małe ilości amyliny powodują spadek maksimum wartości Cs^{-1} natomiast przy dużych ilościach peptydu obserwuje się ich ponowny wzrost.

Izotermy raftu z 25% ilością GM3 i amyliną otrzymane za pomocą wanny Langmuira:



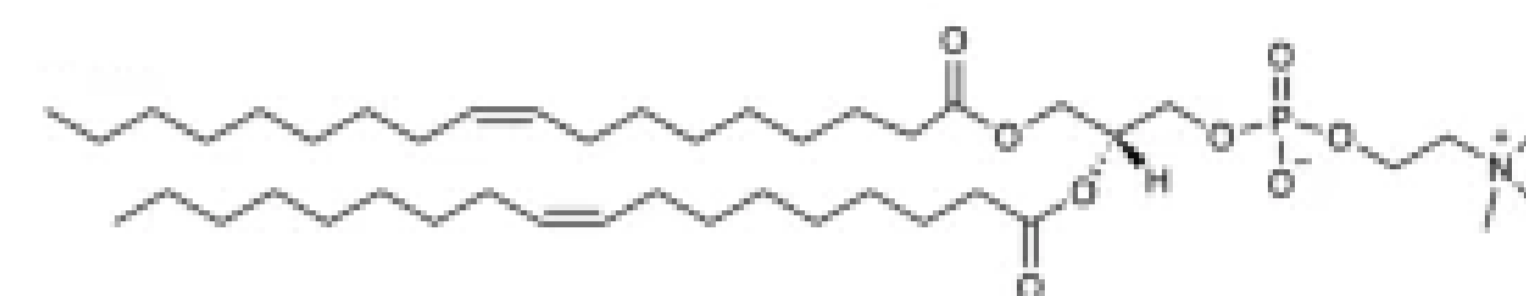
Dodatek amyliny spowodował utworzenie mniej upakowanej monowarstwy oraz spadek jej stabilności. Jednak obserwowane zmiany nie są tak silne jak w przypadku raftu z 5% ilością GM3. Ponadto dodanie peptydu nie wpływa jednoznacznie na maksimum wartości Cs^{-1} .

Struktura amyliny:

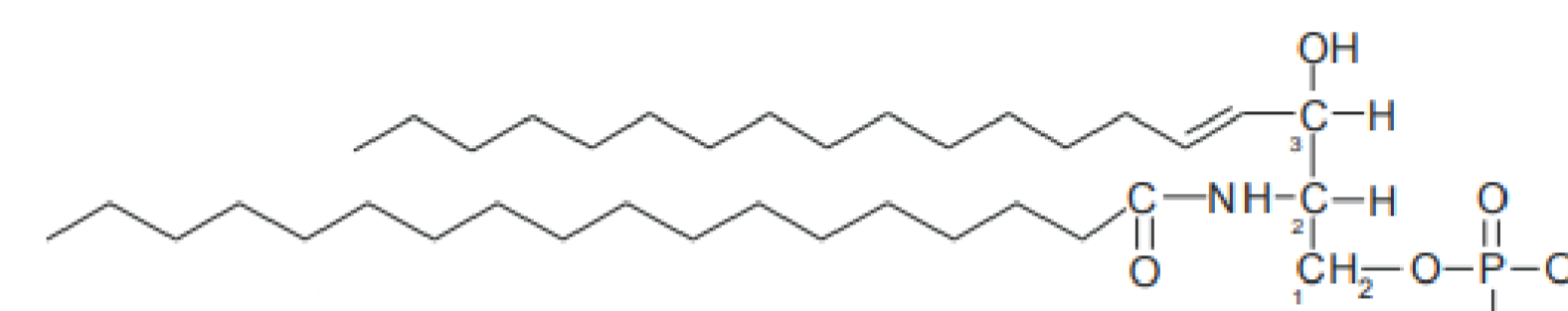


Budowa lipidów:

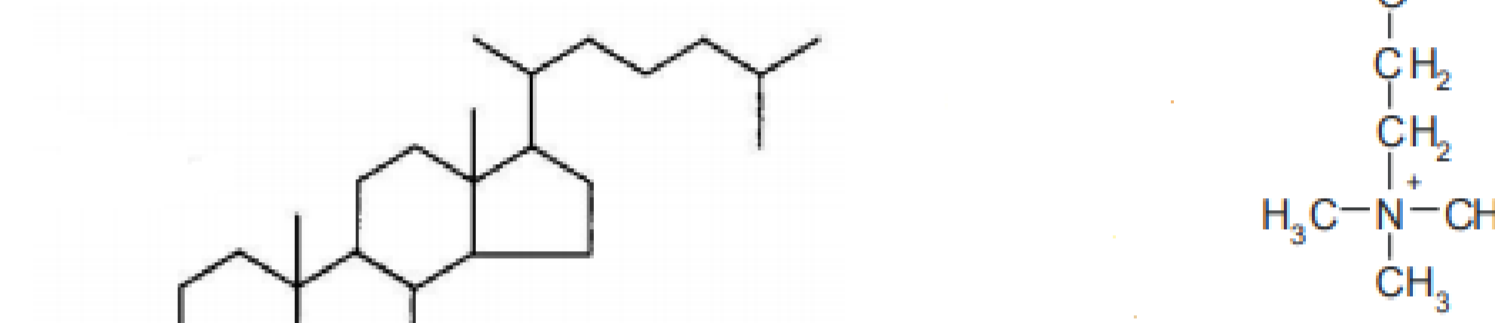
DOPC



Sfingomielin



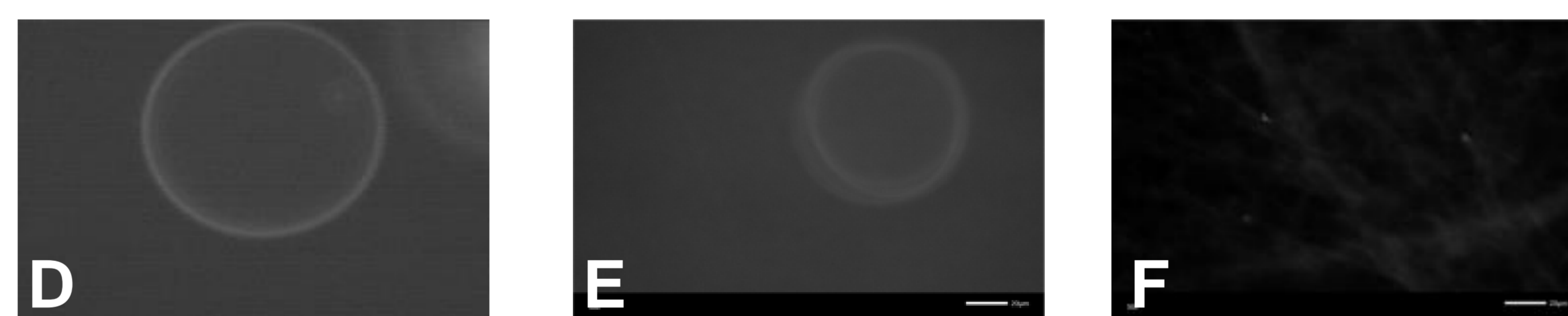
Cholesterol



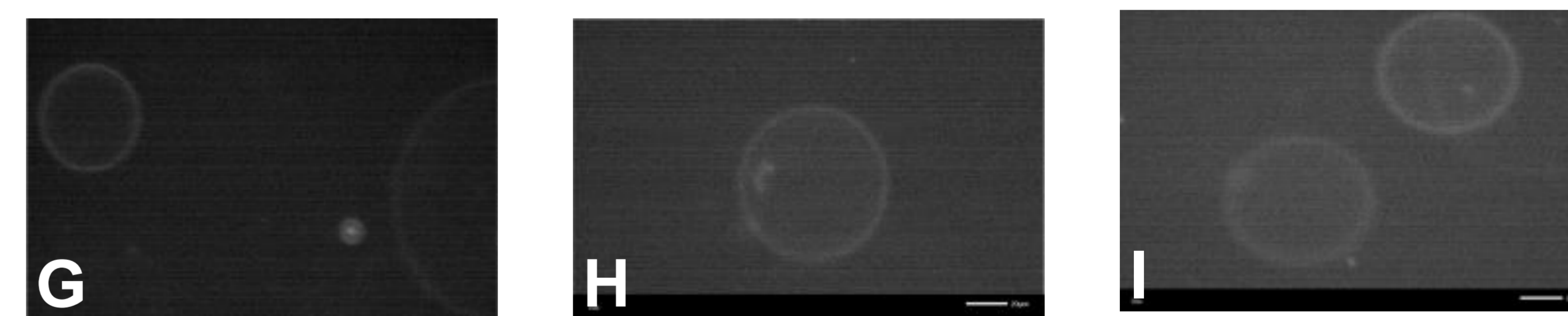
Zdjęcia GUVów wykonanych przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego:



A: GUVy raftu, B: GUVy raftu 1 min po dodaniu amyliny, C: GUVy raftu 20 min po dodaniu amyliny



D: GUVy raftu z 5% ilością GM3, E: GUVy raftu z 5% ilością GM3 1 min po dodaniu amyliny, F: GUVy raftu z 5% ilością GM3 20 min po dodaniu amyliny



G: GUVy raftu z 25% ilością GM3, H: GUVy raftu z 25% ilością GM3 1 min po dodaniu amyliny, I: GUVy raftu z 25% ilością GM3 5min po dodaniu amyliny, J: GUVy raftu z 25% ilością GM3 20 min po dodaniu amyliny

Wnioski:

Amylina wbudowuje się w ściśle upakowaną strukturę raftu usztywniając ją z jednoczesnym zachowaniem jedności lipidów w GUVie.

Wbudowanie się amyliny w warstwę raftu z 5% ilością GM3 prowadzi do upłynnienia warstwy przy małych ilościach peptydu oraz jej usztywnienia gdy ilość peptydu jest znacznie większa. Prowadzi to do szybkiego rozerwania struktury liposomu, a obserwowane złogi są lipidami po rozpadzie pęcherzyków.

25% ilość GM3 utrudnia wbudowanie się amyliny w warstwę, a ilość peptydu nie wpływa jednoznacznie na jej płynność. Dlatego też rozpad struktury liposomów zachodzi po dłuższym czasie.