

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ОБРАЗОВАНИЯ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ НА ОСНОВЕ ИНСУЛИНА

© А. И. Сулацкая,^{1,*} Е. А. Волова,¹ Я. Ю. Комиссарчик,¹ Е. С. Снугиревская,¹
А. А. Маскевич,² Е. А. Дробченко,¹ И. М. Кузнецова,^{1,3} К. К. Туроверов¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

²Гродненский государственный университет им. Я. Купалы, Белоруссия, и

³Санкт-Петербургский государственный политехнический университет;

* электронный адрес: ansul@mail.ru

Исследование структуры упорядоченных белковых агрегатов — амилоидных фибрилл, влияния нативной структуры белка и внешних условий на процесс фибриллообразования в настоящее время является предметом интенсивных исследований. Настоящая работа посвящена изучению кинетики образования амилоидных фибрилл на основе инсулина при низких значениях pH (при которых производятся многие этапы выделения и очистки этого белка) с использованием флуоресцентного зонда тиофлавина Т (ThT). Показано, что рост интенсивности флуоресценции ThT при формировании амилоидных фибрилл описывается сигмоидальной кривой, на которой можно выделить 3 участка — лаг-фазу, рост и выход на плато, характеризующие различные этапы образования фибрилл. Несмотря на обнаруженный разброс в протяженности лаг-фазы при одних и тех же условиях эксперимента (значениях pH и температуры), показано ее сокращение при перемешивании раствора и введении затравки. Данные, полученные с использованием электронной микроскопии, свидетельствуют о том, что образующиеся фибриллы представляют собой длинные неразветвленные нити диаметром ~20 нм. При увеличении времени инкубации диаметр фибрилл не изменяется, в то время как длина их возрастает до 2—3 мкм, что сопровождается значительным ростом количества агрегатов фибрилл. Все полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что вне зависимости от кинетики образования свойства амилоидных фибрилл после завершения процесса фибриллообразования одинаковы. Результаты настоящей работы в сочетании с выполненными ранее исследованиями амилоидных фибрилл на основе инсулина могут быть существенны для формирования представлений о механизме их образования, а также для терапии амилоидозов, связанных с агрегацией инсулина.

Ключевые слова: амилоидные фибриллы, инсулин, тиофлавин Т, электронная микроскопия, интенсивность флуоресценции, спектры поглощения.

Амилоидные фибриллы представляют собой пучки стабильных высокоупорядоченных протеиновых нитей, обогащенных бета-складчатыми структурами. Известно более 35 белков, агрегация которых сопровождается тяжелыми заболеваниями, такие как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, диабет второго рода, прионные заболевания и т. д. Исследования последних лет показали, что способность к фибриллообразованию имеют и многие никак не связанные с заболеваниями белки и пептиды независимо от их функции. Возможно, эта способность обусловлена тем, что образованию амилоидных фибрилл предшествуют конформационные изменения, происходящие в нативном белке под действием химических денатурантов (Ahmad et al., 2003), нагревания (Uversky et al., 2001), изменения pH (Souillac et al., 2002), мутаций (Booth et al., 1997; Li et al., 2002) и др. (Munishkina et al., 2008; Ahmad et al., 2009; Ahmad, 2010). При этом структура амилоидных фибрилл, полученных на основе различных белков или на основе одного и того же белка при различных условиях фибриллогенеза, может существенно различаться. Структура амилоидных фибрилл и влияние нативной структуры белка и внешних условий на процесс фибриллообра-

зования в настоящее время являются предметом интенсивных исследований.

Одним из широко исследуемых амилоидогенных белков является инсулин — гормон белковой природы, вырабатываемый бета-клетками островков Лангерганса поджелудочной железы. Структурной единицей инсулина является мономер с мол. массой около 6000 Да. Каждый мономер содержит 51 аминокислоту, которые располагаются в виде двух пептидных цепей — А и В, соединенных посредством двух дисульфидных мостиков. Раствор инсулина представляет собой равновесную систему мономерной, димерной, тетрамерной и гексамерной форм белка, причем преимущественное содержание той или иной формы определяется свойствами растворителя (Blundell, 1972).

В последнее время существенно возросло число работ, посвященных изучению амилоидозов, вызванных агрегацией инсулина (Storkel et al., 1983; Dische et al., 1988; Swift, 2002; Sahoo et al., 2003; Albert et al., 2007; Yumlu et al., 2009; Shikama et al., 2010). Амилоидные фибриллы на основе инсулина были обнаружены у пациентов с сахарным диабетом II типа после однократного подкожного

введения инсулина и после повторных инъекций. Введенный инсулин способен образовывать фибриллы в организме пациентов независимо от места инъекций, например в бедрах (Dische et al., 1988; Swift, 2002), плечах (Albert et al., 2007), руках (Yumlu et al., 2009) и брюшной стенке (Albert et al., 2007; Yumlu et al., 2009; Shikama et al., 2010). Первоначально считалось, что инсулиновый амилоидоз возникает лишь при использовании свиного или бычьего инсулина, но не инсулина человека. Однако позже это заболевание было детектировано и у больных, использующих при лечении рекомбинантный инсулин человека и его аналоги. Отмечено, что при повторном введении инсулина в места локального амилоидоза наблюдается снижение эффективности терапии вплоть до развития полной резистентности к инсулину, что приводит к потере контроля над уровнем глюкозы в крови пациентов и даже к постановке неверного диагноза (липогипертрофия, липома).

Исследование особенностей образования амилоидных фибрилл на основе инсулина может иметь существенное значение для усовершенствования инсулиновой терапии больных сахарным диабетом. Исследования весьма актуальны, так как количество людей, страдающих от сахарного диабета, огромно: в 2000 г. это заболевание было диагностировано у 171 млн людей в мире, а к 2030 г. это число может увеличиться до 300 млн (Wild et al., 2004).

Настоящая работа посвящена изучению кинетики образования амилоидных фибрилл на основе инсулина при низких значениях pH (при которых происходят многие этапы выделения и очистки инсулина), а также выяснению идентичности структуры и свойств амилоидных фибрилл, многократно получаемых при одних и тех же условиях фибриллогенеза.

Материал и методика

В работе использовали тиофлавин Т (ThT) (AnaSpec, США), NaCl, инсулин и уксусную кислоту (Sigma, США) без дополнительной очистки.

Амилоидные фибриллы получали путем инкубирования инсулина в 20 %-ной уксусной кислоте в присутствии 100 мМ NaCl (pH 2.0) при 37 °С и интенсивном перемешивании (Goers et al., 2002).

Для определения спектров поглощения ThT, связанного с амилоидными фибриллами, использовали раствор образца и раствор сравнения, подготовленные методом равновесного микродиализа. Эксперименты выполняли с использованием аппаратуры фирмы Harvard Apparatus/Amika (США) с объемом камер 500 мкл и мембранами, непроницаемыми для частиц с мол. массой, превышающей 10 кДа (рис. 1, а). Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра U-3900N (Hitachi, Япония). При обработке измеренных спектров поглощения растворов ThT с амилоидными фибриллами исключение из зарегистрированного спектра кажущейся оптической плотности, обусловленной светорассеянием амилоидных фибрилл, проводили с помощью стандартной процедуры (Владимиров, 1964). Флуоресцентные измерения выполняли с использованием спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian, Австралия).

Для визуализации амилоидных фибрилл на основе инсулина использовали электронный микроскоп Carl Zeiss Libra 120. Для негативного контрастирования препа-

ратов использовали 1%-ный водный раствор уранил-ацетата (Миронов и др., 1994). Белок наносили на медные сетки, покрытые коллодиевой пленкой-подложкой с напыленным углем.

Результаты и обсуждение

Для исследования кинетики образования амилоидных фибрилл на основе инсулина использовали бензтиазольный краситель ThT, который широко применяется для диагностики возникновения амилоидных и амилоидоподобных фибрилл *in vivo* и *in vitro* (LeVine, 1993; 1999). Эффективность использования красителя обусловлена высокой специфичностью взаимодействия ThT с фибриллами, а также тем фактом, что при взаимодействии с белками в состоянии амилоидных фибрилл квантовый выход флуоресценции ThT возрастает в несколько тысяч раз, тогда как свободный краситель в водном растворе имеет очень низкий (по нашим данным, около 0.0001) квантовый выход флуоресценции (Sulatskaya et al., 2010).

Раствор ThT с фибриллами представляет собой равновесную систему свободного и связанного с фибриллами красителя. Используя специально разработанный подход (Sulatskaya et al., 2011), основанный на абсорбционной спектрофотометрии растворов, полученных методом равновесного микродиализа, были получены спектры поглощения красителя, связанного с амилоидными фибриллами.

Равновесный микродиализ выполнен с использованием приспособления, состоящего из двух камер равного объема, разделенных мембраной, проницаемой для красителя и непроницаемой для фибрилл (рис. 1, а). В одну из камер помещали раствор красителя, в другую — амилоидные фибриллы. После достижения равновесия концентрации свободного ThT в камерах становились одинаковыми. Суммарная концентрация красителя в камере, содержащей амилоидные фибриллы, превышала концентрацию красителя в другой камере на концентрацию ThT, связанного с фибриллами. Это позволило впервые определить спектр поглощения ThT, инкорпорированного в амилоидные фибриллы, путем вычитания из суммарного спектра поглощения, измеренного в одной камере (с учетом вклада светорассеяния, обусловленного амилоидными фибриллами), спектра поглощения свободного красителя в другой камере. Наши экспериментальные данные свидетельствуют о том, что встраивание ThT в амилоидные фибриллы на основе инсулина сопровождается сдвигом его спектра поглощения в длинноволновую область (рис. 1, б), причем спектр поглощения свободного ThT имеет максимум при длине волны 412 нм, а связанного с фибриллами ThT — при длине волны 450 нм. Более коротковолновое положение спектров поглощения свободного красителя в водном растворе может быть обусловлено существенным диполь-дипольным взаимодействием молекул ThT и молекул растворителя (Maskevich et al., 2007). Поскольку флуоресцирует только связанный ThT, при изучении кинетики образования амилоидных фибрилл флуоресценция возбуждалась при длине волны 450 нм. Регистрацию интенсивности флуоресценции производили в максимуме спектра флуоресценции красителя при длине волны 480 нм.

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что увеличение интенсивности флуоресценции ThT при формировании амилоидных фибрилл, характеризующее

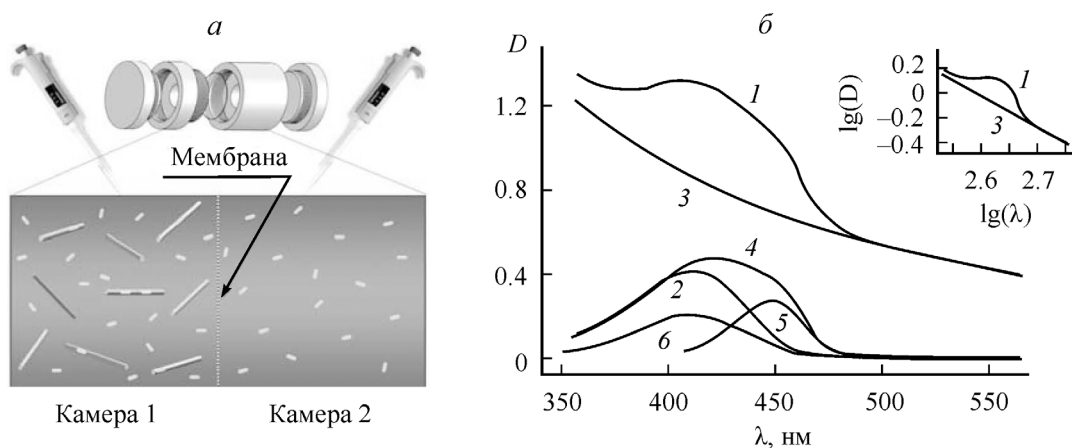


Рис. 1. Определение спектров поглощения ($D(\gamma)$, где D — оптическая плотность, γ — длина волны) тιοфлавина Т (ThT), инкорпорированного в амилоидные фибриллы.

a — приспособление для проведения равновесного микродиализа. Показаны камеры с равным объемом (500 мкл), разделенные мембраной, непроницаемой для частиц с мол. массой, превышающей 10 кДа. В камеру 2 добавляется ThT, в камеру 1 — амилоидные фибриллы. После установления равновесия концентрация свободного красителя в обеих камерах становится одинаковой, при этом суммарная концентрация красителя в камере 1 превосходит концентрацию красителя в камере 2 на концентрацию молекул, связанных с амилоидными фибриллами. *б* — спектры поглощения ThT, инкорпорированного в амилоидные фибриллы. Кривые: 1, 2 — спектры поглощения красителя в камере 1 (поглощение свободного и связанного с фибриллами ThT, а также поглощение, обусловленное рассеянием амилоидных фибрилл) и в камере 2 (поглощение свободного ThT), 3 — поглощение, обусловленное рассеянием амилоидных фибрилл, 4 — спектр поглощения в камере 1 после учета вклада рассеяния (поглощение свободного и связанного с фибриллами ThT), 5 — спектр поглощения связанного с фибриллами ThT, 6 — спектр поглощения свободного ThT в концентрации, равной концентрации связанного красителя. На вставке показан метод вычитания светорассеяния (см. раздел «Материал и методика»).

кинетику их роста, можно описать сигмоидальной кривой (рис. 2, *a*). На рисунке можно выделить 3 участка: участок, характеризующийся отсутствием роста интенсивности флуоресценции (лаг-фаза); участок, характеризующийся ростом интенсивности флуоресценции ThT, и участок, характеризующийся выходом интенсивности флуоресценции ThT на плато. В работах, посвященных исследованию процесса образования амилоидных фибрилл на основе инсулина, показано, что минимальная кинетическая схема их формирования включает в себя следующие основные этапы: олигомер → мономер → промежуточный частично свернутый интермедиат → зародыш → амилоидные фибриллы.

Согласно данным из литературы, в уксусной кислоте при низких значениях pH (условия нашего эксперимента) инсулин присутствует в мономерной форме. Мономеры инсулина в ходе структурных изменений могут переходить в частично свернутое состояние с образованием зародыша, представляющего собой ядро сворачивания фибриллы. Можно предположить, что именно этим процессом определяется этап, характеризующийся отсутствием роста интенсивности флуоресценции ThT (лаг-фаза). Второй участок зависимости, представленной на рис. 2, *a*, характеризуется ростом (удлинением) амилоидных фибрилл. Казалось бы, очевидным является предположение (которое ранее уже сделано в ряде работ) о том, что вы-

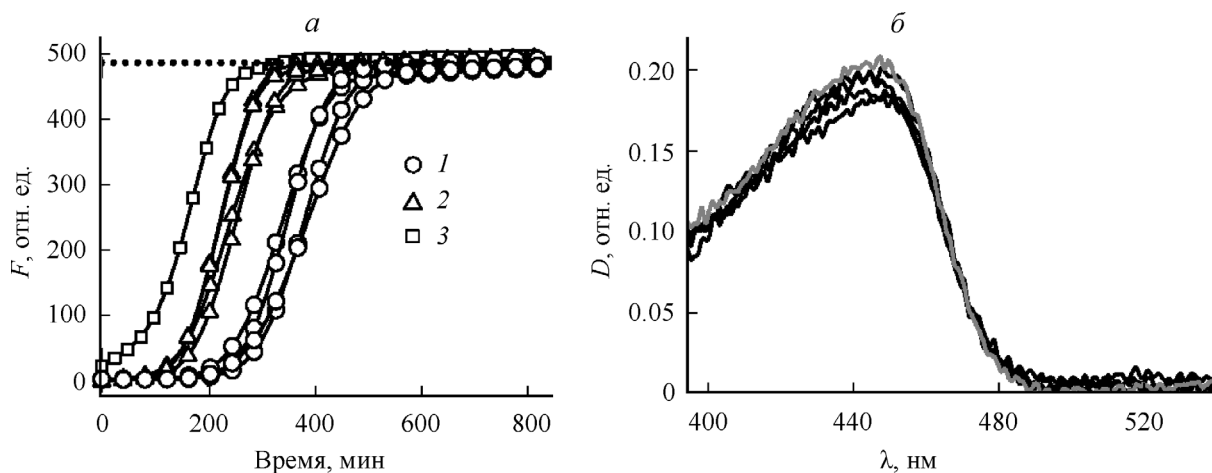


Рис. 2. Влияние ThT, перемешивания раствора и введения в раствор затравки на образование амилоидных фибрилл на основе инсулина.

a — кинетика образования амилоидных фибрилл (кривая 1) без перемешивания, с перемешиванием (2) и в присутствии затравки (3); затравку в концентрации, равной концентрации мономерного белка в инкубируемом растворе (10 мг/мл), добавляли в этот раствор в объемном соотношении 1/100. Штриховой линией показана интенсивность флуоресценции ThT (F) при его введении непосредственно в раствор зрелых амилоидных фибрилл. *б* — спектры поглощения ($D(\gamma)$, где D — оптическая плотность, γ — длина волны) растворов ThT, связанного с амилоидными фибриллами, при введении ThT в раствор до (черные кривые) и после (серая кривая) созревания амилоидных фибрилл.

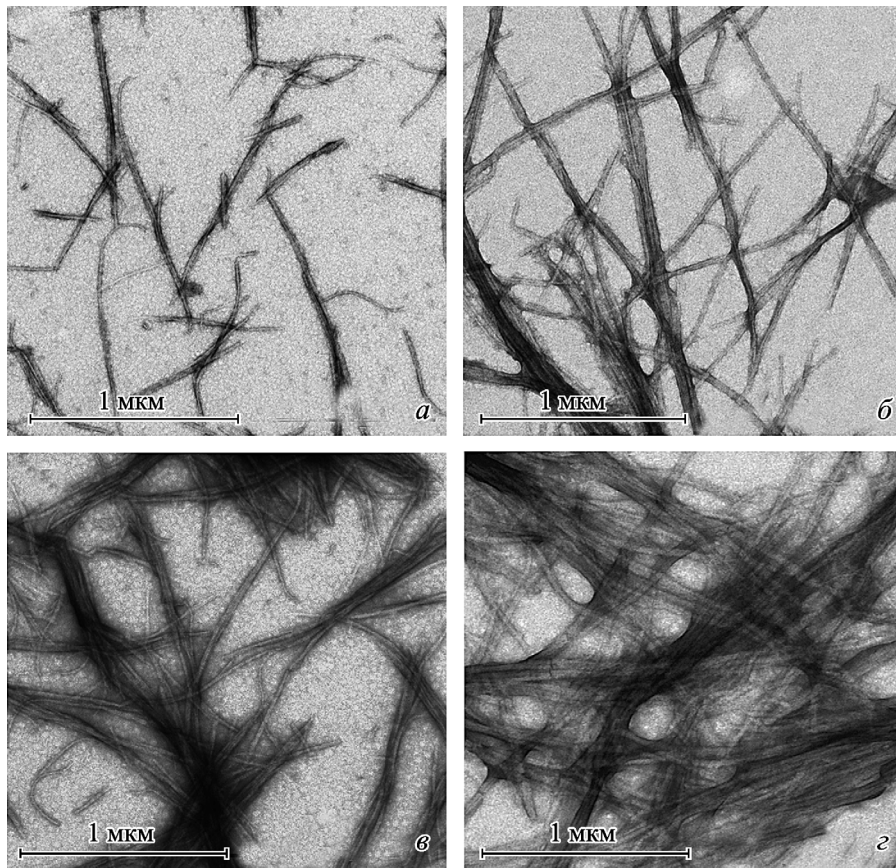


Рис. 3. Кинетика роста амилоидных фибрилл на основе инсулина по данным электронной микроскопии.

Время после начала эксперимента (после растворения инсулина): 1.5 (а), 3 (б), 5 (в) и 10 (г). Видно, что при увеличении срока инкубации увеличивается длина амилоидных фибрилл и происходит их агрегация.

ход зависимости на плато обусловлен насыщением сайтов связывания ThT и формированием зрелых амилоидных фибрилл (Nielsen et al., 2001). Однако необходимо обратить внимание на тот факт, что выход данной зависимости на плато может быть обусловлен и недостаточным количеством добавленного красителя. Таким образом, для того чтобы сделать однозначный вывод о насыщении сайтов связывания и об образовании зрелых амилоидных фибрилл, необходимо корректно подобрать исходное соотношение краситель/белок, для чего нужно иметь представление о стехиометрии связывания ThT с амилоидными фибриллами.

Экспериментальные данные, полученные нами ранее (Sulatskaya et al., 2011, 2012), свидетельствуют о том, что связывание ThT с амилоидными фибриллами на основе инсулина характеризуется наличием двух мод связывания, существенно различающихся по величине константы связывания ($K_{b1} = 2.0 \cdot 10^7$, $K_{b2} = 1.2 \cdot 10^{-5}$) и числу мест связывания в пересчете на молекулу белка ($n_1 = 0.012$, $n_2 = 0.08$), причем вклад во флуоресценцию вносит краситель, связанный с каждой из этих мод. Данные о стехиометрии связывания ThT с амилоидными фибриллами на основе инсулина (Sulatskaya et al., 2011) свидетельствуют о соотношении красителя и белка, составляющем 1/100 и 1/12 для 1-й и 2-й мод соответственно. На основании этих результатов и с учетом концентрации белка, рекомендуемой для наращивания амилоидных фибрилл на основе инсулина (8 мг/мл, или $1.4 \cdot 10^{-3}$ М), была рассчитана достаточная (для избыточности) концентрация кра-

сителя, которая составила $1.1 \cdot 10^{-4}$ М. Нужно отметить, что в других работах по изучению кинетики образования амилоидных фибрилл (в том числе и на основе инсулина) подобных расчетов не производили, в результате чего концентрация красителя могла быть слишком низкой для насыщения всех сайтов связывания амилоидных фибрилл.

Амилоидные фибриллы, образующиеся на разных стадиях, были визуализированы с использованием электронной микроскопии (рис. 3). Можно отметить, что полученные фибриллы представляют собой длинные неразветвленные нити диаметром ~20 нм, причем при увеличении времени инкубации диаметр фибрилл не изменяется, тогда как длина их возрастает до 2—3 мкм. Кроме того, через 10 ч инкубации значительно увеличивается количество агрегатов фибрилл.

Существенным вопросом, возникающим при исследовании процесса образования амилоидных фибрилл, является вопрос о воспроизводимости получаемых результатов, в частности об идентичности амилоидных фибрилл, получаемых в разных экспериментах. Для решения этого вопроса нами многократно было измерено изменение интенсивности флуоресценции ThT при связывании с амилоидными фибриллами, причем исходную концентрацию белка и ThT, а также значения pH и температуры раствора мы не изменяли (рис. 2, а). Несмотря на обнаруженный разброс в протяженности лаг-фазы при одних и тех же условиях эксперимента, показано ее сокращение при перемешивании раствора и введении затравки.

Можно заметить, что вне зависимости от кинетики образования фибрилл, значения интенсивности флуоресценции при выходе зависимости на плато совпадают (рис. 2, а). Кроме того, спектры поглощения этих растворов практически совпадают по форме, положению и амплитуде (рис. 2, б). На основании этих результатов, а также данных электронной микроскопии можно сделать заключение об идентичности структуры и свойств полученных амилоидных фибрилл на основе инсулина.

Были проведены эксперименты, направленные на выявление возможного влияния ThT на процесс фибрилlogenеза и на структуру зрелых амилоидных фибрилл. Показано совпадение значений интенсивности флуоресценции и спектров поглощения красителя вне зависимости от того, присутствовал ли он в растворе во время фибрилlogenеза или был добавлен после его завершения (рис. 2, а, б), что означает отсутствие влияния ThT на процесс образования амилоидных фибрилл на основе инсулина.

Результаты настоящей работы в сочетании с выполненными ранее исследованиями амилоидных фибрилл на основе инсулина (Сулацкая, Кузнецова, 2010; Kuznetsova et al., 2012) могут быть существенны для формирования представлений о механизме образования амилоидных фибрилл, а также для усовершенствования инсулиновой терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.132.21.1311 и стипендия президента РФ № СП-776.2012.4) и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 13-04-02068, 12-04-90022_Bel и 12-04-01651).

Список литературы

- Владимиров Ю. А., Литвин Ф. Ф. 1964. Фотобиология и спектральные методы исследования. М.: Высшая школа. 209 с.
- Сулацкая А. И., Кузнецова И. М. 2010. Взаимодействие тиофлавина Т с амилоидными фибриллами как инструмент для изучения их структуры. Цитология. 52 (11) : 955—959.
- Ahmad A. 2010. DnaK/DnaJ/GrpE of Hsp70 system have differing effects on alpha-synuclein fibrillation involved in Parkinson's disease. Int. J. Biol. Macromol. 4 : 275—279.
- Ahmad A., Millett I. S., Doniach S., Uversky V. N., Fink A. L. 2003. Partially folded intermediates in insulin fibrillation. Biochemistry. 42 : 11 404—11 416.
- Ahmad A., Muzaffar M., Ingram V. M. 2009. Ca(2+), within the physiological concentrations, selectively accelerates Abeta42 fibril formation and not Abeta40 *in vitro*. Biochim. biophys. acta. 1794 : 1537—1548.
- Albert S. G., Obadiah J., Parseghian S. A., Yadira Hurley M., Mooradian A. D. 2007. Severe insulin resistance associated with subcutaneous amyloid deposition. Diabetes Res. Clin. Pract. 75 : 374—376.
- Blundell T. L. 1972. Insulin: the structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology. Adv. Protein Chem. 26 : 279—402.
- Booth D. R., Sunde M., Bellotti V., Robinson C. V., Hutchinson W. L., Fraser P. E., Hawkins P. N., Dobson C. M., Radford S. E., Blake C. C., Pepys M. B. 1997. Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. Nature. 385 : 787—793.
- Dische F. E., Wernstedt C., Westermarck G. T., Westermarck P., Pepys M. B., Rennie J. A., Gilbey S. G., Watkins P. J. 1988. Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in a diabetic patient. Diabetologia. 31 : 158—161.
- Goers J., Permyakov S. E., Permyakov E. A., Uversky V. N., Fink A. L. 2002. Conformational prerequisites for alpha-lactalbumin fibrillation. Biochemistry. 41 : 12 546—12 551.
- LeVine H., 3rd. 1993. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. Protein Sci. 2 : 404—410.
- LeVine H., 3rd. 1999. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. Methods Enzymol. 309 : 274—284.
- Li J., Uversky V. N., Fink A. L. 2002. Conformational behavior of human alpha-synuclein is modulated by familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T. Neurotoxicology. 23 : 553—567.
- Maskevich A. A., Stsiapura V. I., Kuzmitsky V. A., Kuznetsova I. M., Povarova O. I., Uversky V. N., Turoverov K. K. 2007. Spectral properties of thioflavin T in solvents with different dielectric properties and in a fibril-incorporated form. J. Proteome Res. 6 : 1392—1401.
- Munishkina L. A., Ahmad A., Fink A. L., Uversky V. N. 2008. Guiding protein aggregation with macromolecular crowding. Biochemistry. 47 : 8993—9006.
- Nielsen L., Khurana R., Coats A., Frokjaer S., Brange J., Vyas S., Uversky V. N., Fink A. L. 2001. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism. Biochemistry. 40 : 6036—6046.
- Sahoo S., Reeves W., DeMay R. M. 2003. Amyloid tumor: a clinical and cytomorphologic study. Diagn. Cytopathol. 28 : 325—328.
- Shikama Y., Kitazawa J., Yagihashi N., Uehara O., Murata Y., Yajima N., Wada R., Yagihashi S. 2010. Localized amyloidosis at the site of repeated insulin injection in a diabetic patient. Intern. Med. 49 : 397—401.
- Sluzky V., Tamada J. A., Klibanov A. M., Langer R. 1991. Kinetics of insulin aggregation in aqueous solutions upon agitation in the presence of hydrophobic surfaces. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 88 : 9377—9381.
- Souillac P. O., Uversky V. N., Millett I. S., Khurana R., Doniach S., Fink A. L. 2002. Elucidation of the molecular mechanism during the early events in immunoglobulin light chain amyloid fibrillation. Evidence for an off-pathway oligomer at acidic pH. J. Biol. Chem. 277 : 12 666—12 679.
- Storkel S., Schneider H. M., Muntefering H., Kashiwagi S. 1983. Iatrogenic, insulin-dependent, local amyloidosis. Lab. Invest. 48 : 108—111.
- Sulatskaya A. I., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K. 2011. Interaction of thioflavin T with amyloid fibrils: stoichiometry and affinity of dye binding, absorption spectra of bound dye. J. Phys. Chem. B. 115 : 11 519—11 524.
- Sulatskaya A. I., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K. 2012. Interaction of thioflavin T with amyloid fibrils: fluorescence quantum yield of bound dye. J. Phys. Chem. B. 116 : 2538—2544.
- Sulatskaya A. I., Maskevich A. A., Kuznetsova I. M., Uversky V. N., Turoverov K. K. 2010. Fluorescence quantum yield of thioflavin T in rigid isotropic solution and incorporated into the amyloid fibrils. PLoS ONE. 5 : e15385.
- Swift B. 2002. Examination of insulin injection sites: an unexpected finding of localized amyloidosis. Diabet Med. 19 : 881—882.
- Uversky V. N., Li J., Fink A. L. 2001. Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation. J. Biol. Chem. 276 : 10 737—10 744.
- Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care. 27 : 1047—1053.
- Yumlu S., Barany R., Eriksson M., Rocken C. 2009. Localized insulin-derived amyloidosis in patients with diabetes mellitus: a case report. Hum. Pathol. 40 : 1655—1660.

INVESTIGATION OF THE KINETICS OF INSULIN AMYLOID FIBRILS FORMATION

A. I. Sulatskaya,^{1,} E. A. Volova,¹ Ya. Yu. Komissarchik,¹ E. S. Snigirevskaya,¹ A. A. Maskevich,²
E. A. Drobchenko,¹ I. M. Kuznetsova,^{1,3} K. K. Turoverov¹*

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, ² Yanka Kupala Grodno State University, Belarus,
and ³ St. Petersburg State Polytechnical University;
* e-mail: ansul@mail.ru

Investigation of the structure of ordered protein aggregates — amyloid fibrils, the influence of the native structure of the protein and the environment on the process of fibrillation is currently the subject of intensive research. The present work is devoted to the study of the kinetics of insulin amyloid fibrils formation at low pH values (which are produced at many stages of the isolation and purification of the protein) using a fluorescent probe thioflavin T (ThT). It has been shown that the increase of fluorescence intensity of ThT during the formation of amyloid fibrils is described by a sigmoidal curve, in which 3 areas can be distinguished: the lag phase, the growth and the plateau, which characterize the various stages of fibril formation. Despite the variation in the length of the lag phase at the same experimental conditions (pH and temperature), we have found its reduction with stirring the solution and seeding. Data obtained using electron microscopy showed that the formed fibrils are long, linear filament having a diameter of ~20 nm. With increasing incubation time fibril diameter did not change while their length increases to 2—3 μm , which was accompanied by a significant increase in the number of aggregates of fibrils. All the experimental data shows that, regardless of the kinetics of the formation of amyloid fibrils, their properties after the fibrillation process are identical. The results of this work together with the previously studies of insulin amyloid fibrils might be important for clarification the mechanism of their formation, as well as for the treatment of amyloidosis associated with the aggregation of insulin.

Key words: amyloid fibrils, insulin, thioflavin T, electron microscopy, fluorescence intensity, absorption spectra.
