

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОФИЗИКИ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

*На правах рукописи*

**Якупова Эльмира Ильдаровна**

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ГЛАДКОМЫШЕЧНОМ  
ТИТИНЕ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ АГРЕГАТОВ *IN VITRO***

03.01.02 – Биофизика

Диссертация

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н. **Бобылёв Александр Геннадьевич**

Научный консультант:

д.б.н. **Вихлянцев Иван Милентьевич**

ПУЩИНО – 2020

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ .....	6
Цели и задачи работы.....	7
Научная новизна.....	7
Научно-практическая значимость работы .....	8
Основные положения, выносимые на защиту .....	8
Апробация работы.....	9
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	10
1.1. Амилоиды .....	10
1.1.1. Процесс фолдинга и защита против агрегации белков.....	10
1.1.2. История открытия амилоидов .....	12
1.1.3. Свойства амилоидов .....	18
1.2. Титин и его свойства .....	31
1.2.1. Структура и функции титина .....	31
1.2.2. Агрегационные свойства титина.....	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	40
2.1. Выделение титина из желудочков курицы.....	40
2.2. Определение концентрации белковых препаратов.....	40
2.3. ДСН гель-электрофорез титина и расчет м.м. белковых фракций.....	41
2.4. Лиофилизация белка.....	41
2.5. Вестерн-блот анализ .....	41

2.6. Условия формирования титином агрегатов .....	42
2.7. Динамическое светорассеяние .....	42
2.8. Электронная микроскопия .....	43
2.9. Атомно-силовая микроскопия .....	43
2.10. Круговой дихроизм.....	44
2.11. Инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием ...	44
2.12. Рентгеновская дифракция.....	45
2.13. Флуоресцентный анализ с красителем тиофлавином Т.....	45
2.14. Спектральный анализ с красителем Конго красным .....	45
2.15. Поляризационная микроскопия с красителем Конго красным .....	46
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....</b>	<b>47</b>
3.1. ДСН гель-электрофорез и Вестерн-блот анализ титина.....	47
3.2. Исследование скорости агрегации титина методом динамического светорассеяния .....	48
3.3. Электронно-микроскопическое изучение агрегатов титина. ..	49
3.4. Исследование агрегатов титина методом атомно-силовой микроскопии (АСМ).....	51
3.5. Исследование методом атомно-силовой микроскопии мономеров и олигомеров титина в условиях с высокой ионной силой ..	53
3.6. Исследование вторичной структуры титина до и после агрегации методом кругового дихроизма (КД) .....	56
3.7. Исследование вторичной структуры титина методом инфракрасной спектроскопии с Фурье преобразованием.....	57
3.8. Исследование структуры агрегатов титина при помощи дифракции рентгеновских лучей.....	58

3.9. Флуоресцентный анализ связывания агрегатов титина с красителем Тиофлавином Т.....	59
3.10. Исследование связывания агрегатов гладкомышечного титина с красителем Конго красным.....	60
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	63
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	69
ВЫВОДЫ.....	70
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	71

**СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

ДРС – динамическое рассеяние света

ИКС – Инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием

КД – Круговой дихроизм

КК – Конго красный

м.м. – молекулярная масса

РД – рентгеновская дифракция

ср.зн. – среднее значение

ТТ – Тиофлавин Т

Rh – гидродинамический радиус частиц

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Известно, что пептиды и белки обладают способностью переходить из нативных конформационных состояний в амилоидные агрегаты/фибриллы (Chiti & Dobson, 2017). На сегодняшний день амилоиды определяются как агрегаты «неправильно» свернутого пептида или белка, которые имеют  $\beta$ -кросс структуру, что способствует их повышенной устойчивости к протеолитической деградации (Chiti & Dobson, 2017; Crouch et al., 2009). Такие белковые агрегаты могут образовываться в различных тканях человека и животных, что связывают с развитием целого ряда заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, Паркинсона и диабет II типа (Chiti & Dobson, 2017). Однако амилоиды привлекают внимание не только из-за связи с болезнями, но также благодаря их функциональной роли в организме (Нижников и др., 2015). Например, амилоиды, формируемые протеолитическими фрагментами белка Pmel17 в меланосомах, защищают клетки от токсического действия предшественников меланина (Fowler et al., 2006).

К настоящему времени не ясны механизмы формирования амилоидных агрегатов в организме. Модели амилоидообразования *in vitro* являются хорошим инструментом для решения данной научной проблемы, поскольку формирование белками и пептидами амилоидо-подобных структур является универсальным свойством полипептидных цепей (Stefani & Dobson, 2003; Dobson, 2004). К настоящему времени выявлен целый ряд белков, способных при определенных условиях *in vitro* образовывать амилоидо-подобные агрегаты или фибриллы, которые не обнаруживаются *in vivo* (Dorta-Estremera et al., 2010; Goldschmidt et al., 2010). Одним из таких белков является гладкомышечный титин, формирующий аморфные амилоидо-подобные агрегаты *in vitro* (Bobylev et al., 2016). Учитывая ряд особенностей агрегации титина, таких как высокая скорость образования агрегатов и их формирование в условиях близких к физиологическим значениям ионной силы и pH данный белок представляет интерес для изучения механизмов агрегации.

Титин (тайтин/коннектин) – это гигантский мышечный белок, играющий существенную роль в придании мышцам эластичности, способности к растяжению, а также участвующий в поддержании сложной организации саркомера поперечно-полосатых мышц (Ottenheijm & Granzier, 2010). В саркомерах сердечной и скелетных мышц молекулы титина протягиваются от М-линии до Z-диска, формируя третий тип нитей, получивших название эластичных. Расположение и функции титина в

гладкомышечных клетках не известны. Нельзя исключить, что обнаруженное ранее свойство гладкомышечного титина формировать *in vitro* амилоидо-подобные агрегаты (Bobylev et al., 2016) является следствием его способности агрегировать в миоцитах для выполнения определённых функций. Данная работа посвящена исследованию структурных изменений в титине гладких мышц при формировании им различных типов агрегатов *in vitro*.

### **Цели и задачи работы**

Учитывая важное фундаментальное значение исследований свойств амилоидов различных белков для понимания механизмов амилоидообразования, **цель** настоящей работы заключалась в изучении структурных изменений в гладкомышечном титине при формировании различных типов агрегатов *in vitro*.

Исходя из цели, были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Методами электронной и атомно-силовой микроскопии изучить морфологию агрегатов титина, сформированных в различных *in vitro* условиях: с ионной силой ниже физиологических значений (0.15 М глицин-КОН, pH 7.0-7.4, «глицин-агрегаты») и с ионной силой близкой к физиологической (0.2 М KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0-7.4, «KCl-агрегаты»);
- 2) Методом динамического рассеяния света (ДРС) изучить процесс агрегации титина;
- 3) Вышеуказанными методами изучить способность «глицин-агрегатов» и «KCl-агрегатов» титина дезагрегировать в растворе с высокой ионной силой (содержащем 0.6 М KCl);
- 4) Методами кругового дихроизма и инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье исследовать изменения во вторичной структуре титина при агрегации;
- 5) При помощи дифракции рентгеновских лучей исследовать структурные характеристики агрегатов титина;
- 6) Для подтверждения амилоидной/неамилоидной природы агрегатов титина исследовать их связывание с красителями тиофлавином Т и Конго красным.

### **Научная новизна**

Методами электронной, атомно-силовой микроскопии и методом динамического рассеяния света впервые показано, что гладкомышечный титин формирует *in vitro* два

типа аморфных агрегатов: «KCl-агрегаты» и «глицин-агрегаты», которые отличались по способности дезагрегировать/не дезагрегировать при помещении их в условия с более высокой ионной силой (в растворе, содержащем 0.6 М KCl). Методом дифракции рентгеновских лучей двух типов агрегатов титина выявлены рефлексы, характерные для кросс-β структуры амилоидов. Амилоидная природа «глицин-агрегатов» титина была также подтверждена их связыванием с тиофлавином Т. Методами кругового дихроизма и Фурье-ИКС показано, что при агрегации титина не происходит изменений во вторичной структуре его молекул.

Методом атомно-силовой микроскопии впервые исследована морфология молекул гладкомышечного титина в растворе с высокой ионной силой (0.6 М KCl). Обнаружено, что молекула гладкомышечного титина имеет нитевидную форму с толщиной 3-4 нм, длиной ~300 нм с глобулярной головкой на одном конце. При этом также были визуализированы два типа олигомеров титина: (1) взаимодействующие друг с другом головками и имеющими уплотнение в центре с отходящими от него молекулами титина; (2) имеющие вид филаментов длиной 2 мкм и более, на протяжении которых наблюдались периодически расположенные глобулярные утолщения. Полученные данные свидетельствуют о высокой агрегационной способности гладкомышечного титина.

### **Научно-практическая значимость работы**

Полученные результаты расширяют фундаментальные представления об особенностях процесса амилоидной агрегации белков и, в частности, агрегации мультидоменного мышечного белка титина. Проведённые морфологические исследования открывают перспективы изучения локализации титина в гладкомышечных клетках, а также выяснения роли возможной его агрегации *in vivo*. Выявлены недостатки «традиционных» методов подтверждения амилоидной природы белковых агрегатов, основанных на краситель-связывающих свойствах. В частности, показана неспецифичность связывания красителя Конго красного с амилоидными агрегатами титина. Эти результаты открывают перспективы для поиска новых подходов/методов подтверждения амилоидной природы белковых агрегатов *in vitro*.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1) Гладкомышечный титин формирует *in vitro* два типа аморфных агрегатов с четвертичной кросс-β структурой: способных дезагрегировать при помещении в раствор



с более высокой ионной силой (0.6 М КСl) и неспособных дезагрегировать в вышеуказанных условиях;

2) Гладкомышечный титин быстро агрегирует (в течение 20 мин) в условиях сниженной и близкой к физиологической ионной силы;

3) При агрегации титина не изменяется вторичная структура белка;

4) Гладкомышечный титин формирует олигомеры при высокой ионной силе (в растворе, содержащем 0.6 М КСl).

### **Апробация работы**

По материалам диссертационной работы опубликовано 5 статей в рецензируемых отечественных и зарубежных изданиях.

Результаты исследований и основные положения работы были представлены и обсуждены на многих российских и международных конференциях, в частности, на: Российской конференции с международным участием «Experimental and computational biomedicine» (Екатеринбург, 2016); международных симпозиумах “Biological motility” (Пушино, 2016, 2019); Всероссийских конференциях «Экспериментальная и теоретическая биофизика (Пушино, 2016, 2017, 2018, 2019); форуме «Наука будущего – наука молодых» (Нижний Новгород, 2017); Международных Пушинских школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020); XXX зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2018); Отчетной годовой конференции ИТЭБ РАН (Пушино, 2018); 47-ой Европейской мышечной конференции (Budapest, Hungary, 2018); Международной школе-конференции EMBO “Protein quality control: From mechanisms to disease” (Costa de la Calma (Mallorca), Spain, 2019); 64-ой Ежегодной международной конференции Biophysical Society (San Diego, California, 2020).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 89 страницах, содержит 23 рисунка и 4 таблицы. Список литературы включает 227 источников.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Амилоиды

#### 1.1.1. Процесс фолдинга и защита против агрегации белков

В организме белковые молекулы принимают участие в химических процессах непосредственно или через их контроль. Белки различаются по присущему им индивидуальному набору аминокислот в полимерной последовательности (Branden & Tooze J, 1999). Биологическая роль белка зависит от его пространственной укладки. Так после биосинтеза большинство белков должно быть преобразовано в плотно сложенные компактные (нативные) структуры для того, чтобы выполнять характерную для них функцию (Dobson, 2004). Процесс такого сворачивания аминокислотной цепи называется фолдинг белка (Dobson, 2004).

Белки синтезируются в клетках на специальных органоидах – рибосомах. Сворачивание белка может начаться в то время, когда зарождающаяся аминокислотная цепь все еще прикреплена к рибосоме (Hardesty & Kramer, 2001), хотя большая часть белковых молекул организуется непосредственно в цитоплазме после высвобождения аминокислотной цепи из рибосомы.

Поскольку неполностью свернутые аминокислотные цепи имеют открытые участки, которые в нативной форме белка скрыты, они могут быть подвержены неспецифическим контактам с другими молекулами внутри клетки. Кроме того, такие контакты могут образовываться специально, для того чтобы временно скрыть участки цепи с высокой склонностью к агрегации, такие как открытые гидрофобные поверхности (Hore et al., 1997; Capaldi et al., 2002). Для предотвращения нежелательного взаимодействия белка с другими молекулами до завершения процесса его свертывания с ним взаимодействуют специальные белки, шапероны. Шапероны присутствуют во всех типах клеток и клеточных компартментах (Gething & Sambrook, 1992; Hartl & Hayer-Hartl, 2002; Dobson, 2003; Hristozova, 2016). Несмотря на их сходную общую роль в обеспечении эффективной укладки белков, специфические функции шаперонов могут существенно различаться, и многие из них работают в тандеме друг с другом (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Было обнаружено, что одни из шаперонов взаимодействуют с зарождающимися белковыми молекулами, когда они выходят из рибосомы. Другие участвуют в управлении более поздними стадиями процесса фолдинга у сложных белков, включающих олигомерные и

более сложные формы (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Механизм действия шаперонов может заключаться в изоляции от внешней среды неполностью свернутых полипептидных цепей, благодаря наличию специальной полости в своей структуре, как это показано для бактериального шаперона GroEL (Ellis, 2003).

В дополнение к шаперонам существует несколько классов катализаторов, которые ускоряют фолдинг белка, происходящий в противном случае чрезвычайно медленно. Например, пептидилпролилизомеразы увеличивают скорость цис/транс изомеризации пептидных связей с участием пролиновых остатков, а протеиндисульфид изомеразы увеличивают скорость образования и реорганизации дисульфидных связей в белках (Gething & Sambrook, 1992; Hartl & Hayer-Hartl, 2002).

Учитывая огромную сложность процесса фолдинга, сложно представить, чтобы в этом процессе никогда не возникали ошибки. Известно, что некоторые шапероны имеют способность связываться с неправильно свернутыми белками, чтобы дать им второй шанс на правильную укладку. Также в некоторых обстоятельствах шапероны способны повышать растворимость некоторых агрегатов белков (Parsall et al., 1994).

Стоит упомянуть и о наличии специальных систем контроля качества белка в клетках, который ярко прослеживается на примере экскреторных белков, синтезирующихся в клетке для того, чтобы секретироваться во внеклеточную среду. Такие белки перемещаются в эндоплазматический ретикулум, где происходит фолдинг белка перед секрецией его через аппарат Гольджи (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Помимо того, что эндоплазматический ретикулум содержит широкий спектр шаперонов и катализаторов фолдинга, способствующих эффективному сворачиванию полипептидной цепи, в нем происходит строгий «контроль качества» белков (Hammon & Helenius, 1995). Механизм такого контроля включает в себя последовательные процессы гликозилирования и дегликозилирования и предотвращает выделение неправильно свернутых белков из клетки. Развернутые и неправильно свернутые белки распознаются и направляются на деградацию по убиквитин-протеасомному пути (Kaufman et al., 2002). Функционирование такого процесса как аутофагия также имеет важное значение для гомеостаза клеток и тканей, обеспечивая регуляцию синтеза и деградации белков. Она начинается с поглощения части цитоплазмы двойной мембраной с образованием аутофагосомы, которая, сливаясь с лизосомами, приводит к деградации захваченного материала (Linton et al., 2015).

Важность процесса контроля качества фолдинга подтверждается тем фактом, что до половины всех полипептидных цепей не проходят контроль в эндоплазматическом ретикулуме, а для некоторых белков вероятность успеха еще ниже (Schubert et al., 2000).

Все эти регуляторные системы были установлены эволюцией для сведения к минимуму последствий неправильной укладки белков. Это особенно необходимо во время клеточного стресса, в том числе теплового, при котором наблюдается усиление контроля качества в эндоплазматическом ретикулуме и со стороны шаперонов, названных в последствии белками теплового шока (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Процесс «контроля качества белка» направлен на предотвращение заболеваний, связанных с неправильным сворачиванием белков (Dobson, 2004).

От состояния свернутости полипептидной цепи в клетке зависят многие процессы. К примеру, для такого процесса как встраивание белков в мембраны (мембранные белки), может требоваться, чтобы белки находились в развернутом или частично свернутом состоянии (Matouschek, 2001). Кроме того, развернутая белковая цепь является предшественником деградации белка (Matouschek, 2001). Показано, что такие процессы как секреция, иммунный ответ и регуляция клеточного цикла зависят от состояния свернутости/развернутости белков (Radford & Dobson, 1999). Следовательно, неспособность сложить необходимым образом белковую цепь приводит к неправильной работе живых систем и к развитию заболеваний. К настоящему моменту известен целый ряд заболеваний человека, связанных с отклонениями в процессе фолдинга белков (Dobson, 2001; Dobson, 2004). Причиной развития таких заболеваний может являться невозможность выполнения биологических функций белком за счет неправильной укладки, например, как в случае муковисцидоза (Scoffone et al., 2019). В других случаях неправильно свернутые белки, избежавшие всех защитных механизмов клетки, образуют нерастворимые агрегаты во внутриклеточном или во внеклеточном пространстве, в частности, в случае таких заболеваний как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, диабета II типа. (Chiti & Dobson, 2017). Сейчас такие белковые агрегаты отнесены в отдельную группу, называемую амилоиды.

### **1.1.2. История открытия амилоидов**

В 1814 году Colin и Claubry продемонстрировали голубое окрашивание крахмала в реакции с йодом и серной кислотой (Kyle, 2001). Один из основателей «клеточной теории» Маттиас Шлейден (1804-1881) применил данную окраску при изучении растений и в своих работах постулировал, что в последних происходит образование крахмала. М. Шлейден употребил относительно него термин «амилоид», подразумевая «крахмало-подобный». Сам термин «амилоид» происходит от латинского слова “amylym” (крахмал) (Kyle, 2001).

Рудольф Вирхов использовал термин «амилоид» в 1854 году, когда описал своеобразную реакцию с йодом включений, обнаруживаемых при амилацеи нервной системы (соgroга amylose). Интересно то, что в настоящее время эти включения признаны неамилоидными (Kyle, 2001). В тоже время Вирхов предложил углеводную природу церебральных включений амилацеи и отложений, наблюдаемых при «восковых» изменениях в печени. В 1859 году Шмид высказался против этого мнения, сообщая о высокой доле азота в органах, инфильтрированных амилоидом (Schmidt, 1859). В том же году Фридрих и Кекуле показали, что «восковая» селезенка не содержит материалов, которые бы химически соответствовали крахмалу или целлюлозе (Friedreich & Kekule, 1859). Как впоследствии станет известно, амилоиды имеют белковую природу.

По некоторым данным амилоидные отложения в органах человека были обнаружены задолго до Вирхова. Самое первое описание амилоидоза (заболевания, связанного с амилоидными отложениями) относится ещё к 1639 г., когда Nicolaus Fontanus была описана сильно увеличенная селезенка человека, содержащая крупные белые включения, имеющие, по-видимому, амилоидное происхождение (Fonteyn, 1639). В 1789 г. Antoine Portal впервые описал амилоидоз печени (Kyle, 2001). В 1842 году Карл Рокитанский сообщил, что печень от пациентов с туберкулезом или сифилисом была сильно увеличена из-за инфильтрации серым белковым студенистым веществом. Именно он заявил, что отложения амилоидов происходят в случаях туберкулеза, сифилиса и отравления ртутью (Kyle, 2001).

После, в 1856 году, Samuel Wilks, изучая «восковые» висцеральные органы пожилого пациента, пришел к выводу, что наблюдаемые им изменения не были связаны с сифилисом или туберкулезом (Kyle, 2001). В 1867 году Вебер обнаружил амилоидоз у пациента с множественной миеломой. При этом амилоиды были обнаружены в левом желудочке гипертрофированного сердца, в почках и селезенке (Kyle, 2001).

В дальнейшем стало известно, что амилоидоз может быть наследственным или приобретенным, первичным или вторичным (Chiti and Dobson, 2017). Если амилоидные отложения обнаруживаются только в одной конкретной ткани или органе это локальный амилоидоз, если одновременно в нескольких органах человеческого тела – системный амилоидоз (Buxbaum & Linke, 2000; Chiti & Dobson, 2017). Амилоидные отложения были обнаружены и в мышечной ткани при различных заболеваниях (Табл. 1).

Таблица 1. Амилоидные отложения в мышечной ткани.

Мышечная	Заболевание	Амилоидогенный	Ссылки
----------	-------------	----------------	--------

ткань/орган		белок/пептид	
<b>Сердце</b>	Амилоидоз легкой цепи	Легкая цепь $\kappa$ или $\lambda$	Fikrlea et al., 2013
	Семейный амилоидоз	Мутантный транстиретин	Fikrlea et al., 2013
	Сенильный системный амилоидоз	Транстиретин дикого типа	Fikrlea et al., 2013
	Изолированный предсердный амилоидоз	Предсердный натрийуретический пептид	Fikrlea et al., 2013
	Вторичный амилоидоз	Сывороточный амилоид А	Fikrlea et al., 2013
	Спинальная и бульбарная мышечная атрофия	Белок – андрогеновый рецептор	Liewluck & Milone, 2017
<b>Скелетные мышцы</b>	Амилоидоз, связанный с гемодиализом	$\beta_2$ -микроглобулин	Uversky & Fink, 2004
	Инъекционно-локализованный амилоидоз	Инсулин	Uversky & Fink, 2004
	GNE миопатия	A $\beta$ -пептид	Bosch-Morató et al., 2016
	Изолированная амилоидная миопатия	Аполипопротеин А1/A4/E, сывороточный амилоидный компонент Р	Liewluck & Milone, 2017
<b>Кровеносные сосуды и пери-эндомизий</b>	Первичный или амилоидоз ассоциированный с миеломой	Предположительно, легкая цепь $\kappa$ или $\lambda$	Yamada et al., 1988
	Вторичный амилоидоз		
	Преальбуминовый амилоидоз		
<b>Аорта</b>	Амилоидоз аорты	Медин (245–294 фрагмент лактадгерина)	Uversky & Fink, 2004

В начале 80-х годов прошлого века Прузинером были открыты прионы (Prusiner, 1982). Прионы представляют собой уникальный класс инфекционных агентов,

инфекционность которых связана исключительно с белком. У млекопитающих они приводят к смертельным нейродегенеративным заболеваниям, таким как болезнь Крейтцфельдта-Якоба человека, овечий скреппи и губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота (Houston & Andréoletti, 2018). Все эти заболевания связаны с белком PrP, чья конформационно измененная форма (PrP<sup>Sc</sup>) способна переводить нормальный кодируемый белок (PrP<sup>C</sup>) в эту измененную прионную форму (Kushnirov et al., 2007). Такая форма белка PrP<sup>Sc</sup> имеет амилоидную кросс-β структуру. Следовательно, прионы также относятся к амилоидам.

Помимо амилоидов, ответственных за развитие заболеваний, включающих прионы, к настоящему времени открыты белковые агрегаты с кросс-β структурой, которые образуются в организме для выполнения специальных функций. Такие амилоидные агрегаты были названы функциональными, и они были обнаружены как у прокариот (Romling et al., 1998; Claessen et al., 2003; Otzen & Nielsen, 2008), так и у эукариот (Si et al., 2003; Chiti & Dobson, 2006; Fowler et al., 2006; Iconomidou et al., 2006; Slotta et al. 2007; Ranganathan et al., 2012; Pulze et al., 2016; Vogler et al., 2018; Franchi et al., 2019). Показано, что у человека в меланосомах образуются функциональные амилоидные фибриллы из протеолитических фрагментов белка Pmel17 (Fowler et al., 2006). Они ускоряют полимеризацию предшественника меланина в меланин, защищая при этом клетки от токсического действия таких предшественников (Fowler et al., 2006). Было также высказано предположение, что амилоиды играют важную роль в формировании долговременной памяти у животных. Эта идея основана на исследовании, показывающем, что трансляционный регулятор CREB у *Aplysia californica* имеет прионо-подобные свойства и играет ключевую роль в длительных синаптических изменениях (Si et al., 2003). Данные последних лет указывают на то, что амилоидные агрегаты могут участвовать в иммунном ответе, поскольку они входят в состав внеклеточной нейтрофильной ловушки (Pulze et al., 2016).

Функциональные амилоиды также обнаружены в мышечной ткани. Было показано, что при регенерации скелетных мышц у мышей и людей цитоплазматический РНК-связывающий белок TDP-43 образует амилоидо-подобные олигомеры, названные миогранулами (Vogler et al., 2018).

Стоит отметить, что исследования амилоидных свойств различных белков, активно ведутся *in vitro*. Это стало возможно благодаря тому, что многие белки при определенных условиях *in vitro* способны формировать амилоидные агрегаты (Табл. 2). При этом такие агрегаты могут и не наблюдаться в организме человека или животных (Goldschmidt et al., 2010; Dorta-Estremera et al., 2013). В настоящее время считается общепринятым

представление о том, что формирование белками и пептидами амилоидо-подобных структур является универсальным свойством полипептидных цепей (Stefani & Dobson, 2003; Dobson, 2004). При этом совокупности известных амилодогенных белков, способных формировать амилоиды как *in vitro*, так и *in vivo*, был присвоен специальный термин «амилом» (Goldschmidt et al., 2010).

Из таблицы 2 можно заключить, что известные белки способны формировать амилоиды *in vitro* при помещении их в жесткие условия (кислые или щелочные значения pH, высокая температура, большая продолжительность инкубации – несколько суток или месяцев, в присутствии этанола, мочевины).

Таблица 2. Условия формирования некоторых амилоидов *in vitro*.

Амилоидо-генный белок/пептид	Тип структуры	Условия агрегации <i>in vitro</i>	Ссылки
A $\beta$ 1-40/1-42*	Развернутая	Инкубация в течение двух суток в буферном растворе, содержащем 50 мМ трис-HCl, pH 7.4.	Schmidt et al., 2009
		Фибриллы образуются при значениях pH от 3 до 4.	Stine et al., 2003
		Инкубация в течение 24 часов в ddH <sub>2</sub> O при 37°C.	
$\alpha$ -Синуклеин*	Развернутая	Инкубация более 44 часов в буферном растворе 10 мМ HEPES, 100 мМ NaCl, 5 мМ ДТТ, pH 7.4 при 37°C.	Necula et al., 2003
		Инкубация в течение 1-4 месяцев в растворе, содержащем 10 мМ фосфатного буфера, 2.7 мМ KCl, 137 мМ NaCl, pH 7.4 при 37°C.	Conway et al., 2000
Инсулин*	$\alpha$ -спираль	Инкубация ~10 часов в 20% -ной уксусной кислоте (pH 2.0) с 0.5 М NaCl при 45°C.	Vestergaard et al., 2007
		Инкубация в водном растворе HCl (pH 2.0) с 0.01% (w/v) NaN <sub>3</sub> при 55 °C.	Wang et al., 2010
		Инкубация в течение 12 суток в	Amini et al.,



		Глицин–HCl буферном растворе (50 мМ, рН 2) с 0.02% NaN <sub>3</sub> при 50°C.	2013
<b>Транстиретин*</b>	β-структура	Фибриллы образуются при значениях рН от 3 до 4.5.	Lai et al., 1996
<b>Тау-белок*</b>	Развернутая	Инкубация в течение 4 суток в растворе, содержащем 0.1 М MES, 0.5 мМ MgCl <sub>2</sub> , 2 мМ EGTA и 50 мМ NaCl, рН 6.4 в присутствии (до 0.5 мкг/мл) гепарина при 4°C.	Pérez et al., 1996
		Инкубация в растворе, содержащем 0.5 М Трис, 1.25 М ацетата калия, рН 6.9-7.4 при комнатной температуре.	Crowther et al., 1994
<b>γD-кристаллин</b>	β-структура	Инкубация в течение двух суток в 50 мМ ацетатном буферном растворе, рН 3 при 37°C.	Apanikolopou-lou et al., 2008
<b>Лизоцим*</b>	α/β	Инкубация в различных условиях: кислые значения рН при повышенной температуре; концентрированные растворы этанола; умеренные концентрации гидрохлорида гуанидина при щелочном значении рН при комнатной температуре.	Swaminathan et al., 2011
<b>β-лактоглобулин</b>	β-структура	Инкубация в течение 10-30 суток в растворе, содержащем 3-5 М мочевины, рН 7.0 при 37°C.	Hamada & Dobson, 2002
<b>Монеллин</b>	α/β	Инкубация 24 часа в растворе, содержащем 10 мМ глицина, рН 2.5, при 85°C.	Konno et al., 1999
<b>Миоглобин</b>	α-спираль	Инкубация апомиоглобина в растворе, содержащем 50 мМ бората натрия, рН 9.0 при 65°C.	Fändrich et al., 2001
<b>α-лактальбумин</b>	α/β	Инкубация в течение 20-60 мин в растворе, содержащем 100 мМ NaCl (рН 2.0) при температуре 37-55°C.	Goers et al., 2002

\*Амилоиды белков обнаруживаются при заболеваниях, включая амилоидозы.

### 1.1.3. Свойства амилоидов

В многоэтапном процессе формирования белками своей пространственной структуры в клетке могут возникать развернутые или неправильно свернутые ненативные формы белков, склонные к агрегации (Frydman, 2001; Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Агрегации белков способствуют различные мутации, посттрансляционные модификации, окислительные процессы, изменения окружающей среды (рН, температура, УФ-излучение) через повреждения трехмерной структуры или образование развернутых форм вновь синтезированных полипептидных цепей. Все эти факторы могут действовать в совокупности или независимо друг от друга (Uversky, 2014). В результате потери белками своего нативного состояния они могут самоассоциироваться и формировать различные надмолекулярные структуры, включая олигомеры, аморфные агрегаты и фибриллы (Dobson, 2004).

Процесс агрегации белков обычно включает три этапа. Первый этап – лаг-фаза включает трансформацию растворимых нативных белков в склонные к агрегации интермедиаты («зародыши»), имеющие частично развернутую конформацию (Kodaka, 2004). Второй этап характеризуется нуклеацией и представляет собой относительно медленную стадию формирования «ядер», структур предшествующих быстрому росту агрегатов. Ядра при этом образуются путем присоединения новых молекул белка (Kodaka, 2004). Последний этап включает дальнейший рост белковых агрегатов, который может происходить двумя путями: агрегация «мономер-кластер» (добавление мономера к растущему мультимеру) или агрегация «кластер-кластер» (добавление мультимера к другому мультимеру) (Рис. 1) (Speed et al., 1997). Агрегация может происходить как одним путем, так и одновременно двумя (Tomski & Murphy, 1992; Lomakin et al., 1997; Speed et al., 1997; Uversky et al., 1999).

Последовательная агрегация (мономер-кластер)



Мультимерная агрегация (кластер-кластер)



Рис. 1. Возможные механизмы агрегации белков (Speed et al., 1997).

В ходе процесса агрегации белков могут образовываться амилоиды. Само понятие амилоидов основывается на их общей внутренней структуре, присущей образуемым агрегатам вне зависимости от пептида/белка-предшественника. Так благодаря структурным исследованиям стало известно, что амилоиды – это неветвящиеся белковые фибриллы, представляющие собой уложенные в стопку антипараллельные  $\beta$ -структуры (Довидченко, 2014). Однако это характерно не для всех белков, формирующих амилоидные агрегаты, есть и те, у которых на протяжении фибриллы  $\beta$ -стренды расположены параллельно (Toyama & Weissman, 2011; Wickner et al., 2013). Дальнейшие исследования этого объекта раскрывают структурную неоднородность амилоидных агрегатов, образуемых различными белками, но помогают заключить, что универсальным свойством можно назвать специфическую кросс- $\beta$  структуру (Рис. 2).

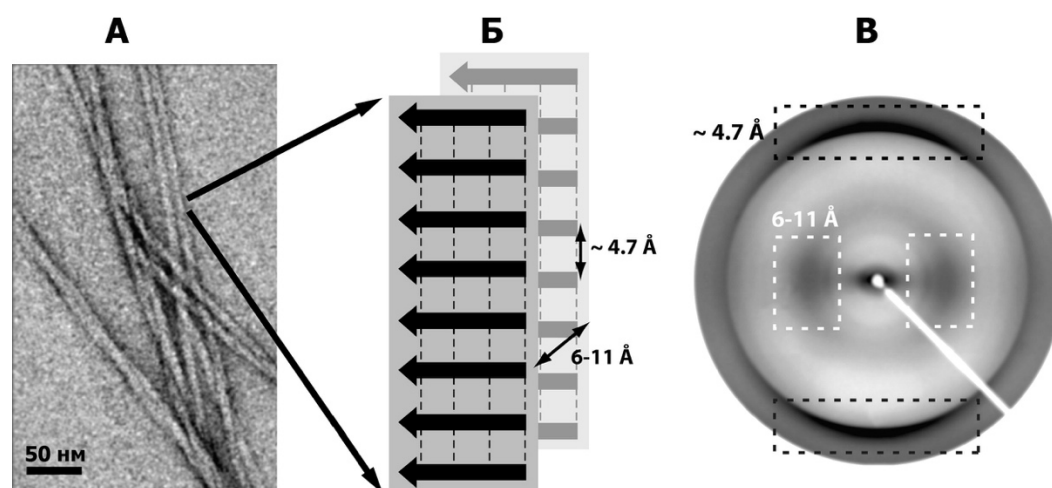


Рис. 2. Кросс- $\beta$  структура амилоидов. (А) Электронная микрофотография амилоидных агрегатов в виде фибрилл при негативной окраске. (Б) Схематическое изображение поперечных  $\beta$ -листов с водородными связями (представлены пунктирными линиями) в фибрилле. (В) типичная дифракционная картина с рефlekсами  $\sim 4,7 \text{ \AA}$  (черная пунктирная рамка) и  $6\text{--}11 \text{ \AA}$  (белая пунктирная рамка) (Greenwald & Riek, 2010).

Показана различная морфология для амилоидных агрегатов, имеющих вид фибрилл. Например,  $A\beta(1\text{--}40)$ -пептид и инсулин образуют зрелые структуры разного типа (Рис. 3): «ветвящиеся», «спиральные» и «ленточные» (Goldsbury et al., 2000). Полиморфизм фибрилл был показан и для таких белков, как кальцитонин (Bauer et al., 1995), амилин (Goldsbury et al., 1997), инсулин (Jimenez et al., 2002; Селиванова и Галзитская, 2012) и X-белок скелетных мышц (Подлубная и Марсагишвили, 2008).

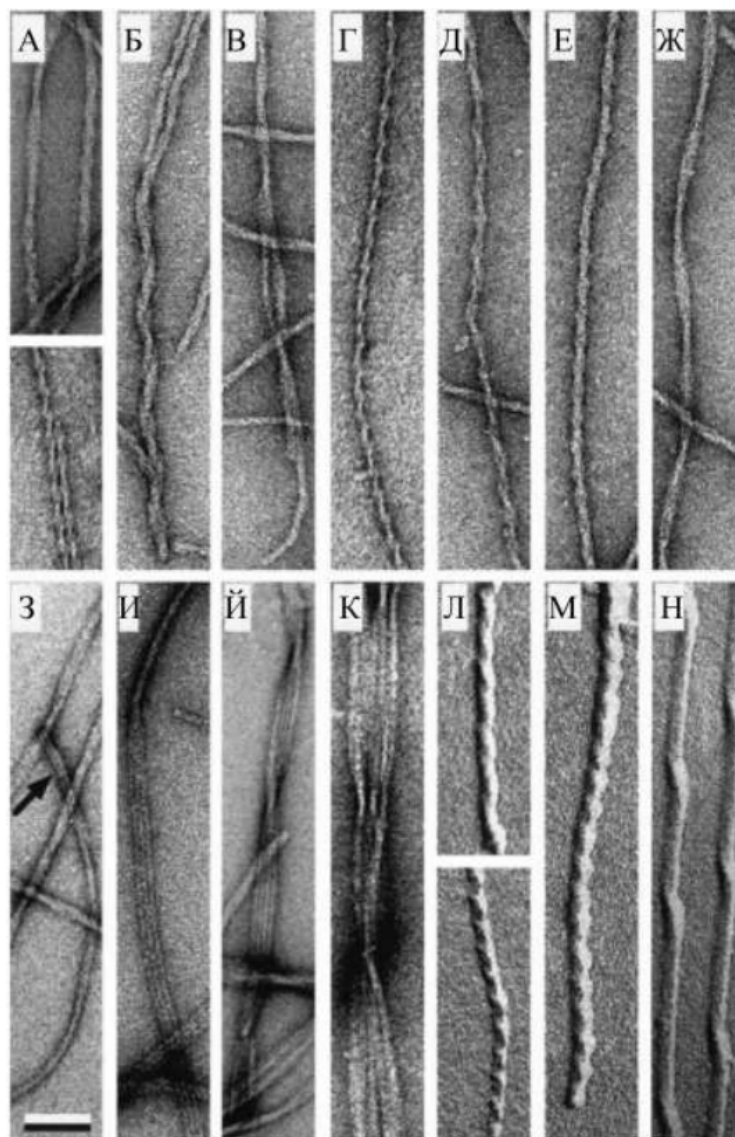


Рис. 3. Полиморфизм зрелых фибрилл  $A\beta(1-40)$ -пептида. (А) Изменения морфологии фибриллы могут происходить путем закручивания предварительно сформированных фибрилл. (Б и В) Ветвящиеся фибриллы. (Г) Спиральная фибрилла «1 типа». (Д) Спиральные фибриллы «2 типа». (Е) Спиральная фибрилла «3 типа». (Ж) Фибриллы без отчетливой спиральной периодичности. Ленточные фибриллы, содержащие две (З, стрелка), три (И), четыре (Й) или более (К) составляющих их нитей шириной 5 нм. Однонаправленное затенение структуры говорит о том, что фибриллы скручиваются в левом направлении (Л, М и Н). Шкала 50 нм (Goldsbury et al., 2000).

Помимо фибрилл, амилоидные структуры могут быть представлены в виде аморфных агрегатов, что было показано, к примеру, для эластичного фактора элонгации (Rubber elongation factor), бета-2-микроглобулина (Рис. 4) и др. (Karsai et al., 2006; Berthelot et al., 2012; Kumar et al., 2014).

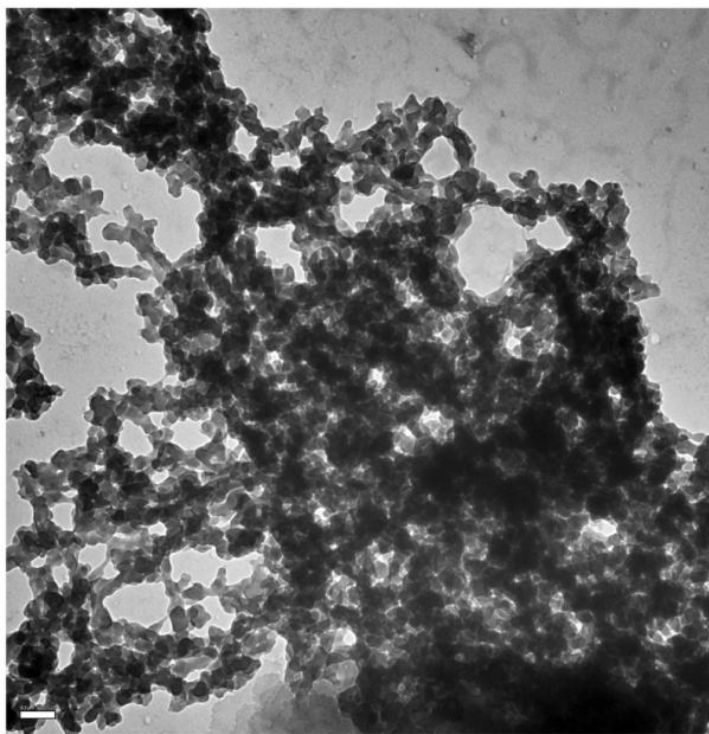


Рис. 4. Электронная микрофотография аморфных амилоидных агрегатов бета-2-микроглобулина. Шкала составляет 0.2 мкм (Kumar et al., 2014).

В дополнение к этому, определяют уникальные физические и химические свойства амилоидов: специфическое связывание с красителями Конго красным и тиофлавином Т, двойное лучепреломление в поляризованном свете, нерастворимость в большинстве растворителей и устойчивость к протеазам (Chiti & Dobson, 2017). Хотя эти свойства и приписывают всем амилоидам, они не являются высокоспецифичными и без подтверждения наличия кросс- $\beta$  структуры при помощи рентгеновской дифракции об амилоидной природе объекта говорить преждевременно.

Исходя из всего изложенного видно, что с момента открытия амилоидов по настоящее время понимание об их структуре и свойствах сильно расширилось. Это стало возможно благодаря развитию специальных методов исследования (Табл. 3). С помощью этих методов можно обнаружить амилоиды *in vitro* и *in vivo*, определить их структуру и морфологию в срезах тканей и *in vitro*, а также исследовать кинетику агрегации амилоидогенных белков (Yakupova et al., 2018). Таким образом, современные исследователи имеют возможность подбирать методы под свои задачи, чтобы пополнить имеющиеся представления об амилоидной агрегации белков. В данной работе также применялся ряд методов для исследования морфологии агрегатов титина, их внутренней структуры и процесса агрегации.

Таблица 3. Методы исследования амилоидов *in vivo* и *in vitro* (Yakupova et al., 2019)

Метод исследования	Характеристика и особенности	Основная область применения				Ограничения
		Обнаружение	Изучение структуры	Исследование морфологии	Изучение процесса агрегации	
<b>Иммуногистохимия и иммунохимия</b>	Метод применяется для обнаружения и оценки амилоидных отложений в срезах тканей (Galvin, пробел 2003). Используются моноклональные антитела, направленные на амилоидогенные белки-предшественники (Strege et al., 1998; Genst et al., 2014). Уже разработаны специфичные для конформации антитела, которые распознают растворимые олигомеры (Kayed & Glabe, 2006; Murakami et al., 2016) или фибриллы многих белков (Dumoulin & Dobson, 2004; Kayed et al., 2007; Sarsoza et al., 2009; Genst & Dobson, 2012), независимо от их аминокислотной последовательности.	да	нет	нет	нет	Коммерчески доступные антитела к различным белкам часто неоптимальны для идентификации их агрегированной формы (Westermarck et al, 2018). Новые конформационно-специфические антитела в настоящее время еще не получили широкого применения и требуют дополнительного тестирования.

<p><b>Окрашивание с Конго красным</b></p>	<p>Связывание КК с амилоидами <i>in vitro</i> вызывает характерное увеличение поглощения красителя, приводящее к смещению его спектра поглощения от 490 до 512 нм и наличию уникального пика ~ 540 нм (Meehan et al., 2004; Frid et al., 2007). «Яблочно-зеленое двулучепреломление», обусловленное оптической анизотропией после связывания с красителем, используется для выявления амилоидных отложений в срезах тканей и определения амилоидной природы белковых агрегатов <i>in vitro</i> (Elghetany &amp; Saleem, 1988; Linke, 2006; Howie &amp; Owen-Casey, 2010).</p>	да	нет	нет	нет	<p>Сегодня этот метод широко используется в гистопатологических лабораториях, за счет простоты применения, но он имеет низкую специфичность (Yakupova et al., 2018).</p>
<p><b>Окрашивание с тиофлавином Т</b></p>	<p>Считается, что флуоресцентный краситель ТТ селективно локализуется в амилоидных отложениях, что сопровождается увеличением его флуоресценции (Westermarck et al., 1999). При связывании с амилоидными фибриллами <i>in vitro</i> ТТ дает сильный флуоресцентный сигнал при длине волны 482 нм и возбуждении при 450 нм (Naiki et al., 1989). Интенсивность</p>	да	нет	нет	да	<p>Окрашивание ТТ является простым в применении, но требуется флуоресцентная микроскопия (Westermarck et al., 1999). Структуры такие как хрящ, эластичные волокна и мукополисахариды, также могут окрашиваться этим красителем (Vassar et al., 1959; Kelényi et al, 1967; LeVine,</p>

	<p>флуоресценции линейно зависит от массы амилоидных фибрилл (например, от количества доступных сайтов связывания), за счет чего рассчитывают кинетику агрегации белка (Cohen et al., 2013). Снижение интенсивности эмиссии ТТ часто интерпретируют как показатель ингибирования роста фибрилл (Groenning et al., 2007).</p>					<p>1995). Использование этого красителя для исследования кинетики процесса агрегации требует предварительных экспериментов, так как флуоресценция ТТ может быть подвержена самозатуханию (Lindberg et al., 2017). Флуоресценция ТТ обычно не подходит для обнаружения олигомеров во время роста амилоидных фибрилл (Persichilli et al., 2011). Хотя этот краситель связывается с олигомерами некоторых белков (Lindgren et al., 2005; Grudzielanek et al., 2006; Maezawa et al., 2008).</p>
<b>Круговой дихроизм</b>	<p>КД — это спектроскопический метод, основанный на оптической анизотропии, проявляющийся в различии коэффициентов поглощения света, поляризованного по правому и левому кругу хиральными молекулами в растворе. Этот метод используется для определения вторичных структур белков и</p>	нет	да	нет	нет	<p>Этот метод может использоваться только для определения изменений во вторичной структуре и чувствителен к ароматическим соединениям, присутствующим в образце. Он может быть использован только в исследованиях <i>in vitro</i>.</p>



	пептидов в нативной форме и в виде амилоидных агрегатов (McCubbin et al., 1988; Abe & Nakanishi, 2003).					
<b>Инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием</b>	ИК-спектроскопия представляет собой абсорбционную спектроскопию, которая обнаруживает переходы, возникающие в результате колебательных мод связей с участием гетероатомов (Smith, 1995; Stuart, 1997). При помощи этого метода можно определять наличие и относительное содержание $\beta$ -складчатых структур в пептидах и белках, в том числе, когда они формируют амилоидные агрегаты/фибриллы (Bouchard et al., 2000; Calero & Gasset, 2005; Zou et al., 2013). Существуют методики получения спектров от белков, включая мембраносвязанные белки, в любом физическом состоянии, включая кристаллы, порошки, тонкие пленки, а также в растворе (Calero & Gasset, 2005).	нет	да	нет	нет	Необходима очень высокая концентрация образцов (Calero & Gasset, 2005). Этот метод может быть использован только в исследованиях <i>in vitro</i> .
<b>Ядерный магнитный</b>	Молекулярные и супрамолекулярные структуры амилоидных фибрилл могут быть исследованы	нет	да	да	да	Этот метод дорог, сложен и анализ ограничен небольшими белками

<b>резонанс</b>	различными методами твердотельного ядерного магнитного резонанса (Jaroniec et al., 2004; Scheidt et al., 2011; Tycko, 2011).					(Karamanos et al., 2015). Этот метод может быть использован только в исследованиях <i>in vitro</i> .
<b>Рентгеновская дифракция</b>	Метод используется для изучения структуры амилоидных фибрилл. С помощью этого метода можно выявить наличие специфической кросс- $\beta$ структуры: рефлексы от 4 до 5 Å и от 10 до 12 Å (Inouye et al., 1993; Sunde et al., 1997; Makin & Serpell, 2005; Morris & Serpell, 2012).	нет	да	нет	нет	Этот метод можно использовать только тогда, когда образец находится в кристаллизованной форме. Также его сложно использовать для изучения промежуточных звеньев на начальных этапах агрегации. Этот метод может быть использован только в исследованиях <i>in vitro</i> .
<b>Малоугловое рентгеновское рассеяние</b>	Этот метод применяется для исследования структуры, сворачивания и конформационных изменений глобулярных белков, включая мультидоменные и мультисубъединичные белки (Jacques & Trewella, 2010). Метод является мощным и гибким для определения структурных изменений амилоидных фибрилл (Oliveira et al., 2009; Chatani et al., 2009; Dahal et al., 2017).	нет	да	да	нет	Этот метод дорогой и сложный в исполнении и может быть использован только в исследованиях <i>in vitro</i> .
<b>Криоэлектронная</b>	Техника криоэлектронной микроскопии	нет	да	да	нет	Процесс пробоподготовки очень

<b>микроскопия</b>	позволяет с высокой разрешающей способностью (менее 5 Å) определять атомные структуры амилоидных фибрилл <i>in vitro</i> (Gremer et al., 2017; Fitzpatrick et al., 2017; Li et al., 2018). Также с помощью этой техники можно исследовать амилоиды, экстрагированные из тканей ( <i>ex vivo</i> ) (Jiménez et al., 2001; Fitzpatrick et al., 2017).					сложный. С помощью этого метода трудно или невозможно изучать аморфные амилоидные агрегаты.
<b>Трансмиссионная электронная микроскопия</b>	Метод применяется для обнаружения амилоидных отложений в биопсиях, поскольку амилоидные фибриллы имеют уникальные морфологические характеристики (Merlini & Bellotti, 2003; Leung et al., 2012). Все типы амилоидных отложений, наблюдаемые в разных тканях, в основном состоят из неразветвленных, прямых фибрилл, диаметром от 6 до 13 нм (в среднем 7,5-10 нм) и длиной 100-1600 нм (Sipe & Cohen, 2000). Могут быть обнаружены и другие морфологические характеристики (Markowitz, 2004). Для повышения диагностической значимости метода может	да	нет	да	нет	В некоторых случаях этот метод не подходит для диагностики амилоидоза. Например, иммунотактоидная гломерулопатия и фибриллярный гломерулонефрит могут быть неправильно диагностированы как амилоидоз легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов (Sethi et al., 2010).

	<p>быть использована электронная микроскопия с применением антител с нанозолотом, метод, который объединяет иммуногистохимию с ЭМ (Herrera et al., 1986). С помощью этого метода можно исследовать как амилоиды, выделенные из тканей, так и амилоиды, генерируемые <i>in vitro</i> (Sipe &amp; Cohen, 2000).</p>					
<b>Атомно-силовая микроскопия</b>	<p>Этот метод может быть использован для исследования размера и морфологии белковых агрегатов в растворе (Crespo et al., 2016). Также он используется для исследования внутренних свойств амилоидных фибрилл, таких как механическая прочность и модуль Юнга (Adamcik &amp; Mezzenga, 2012).</p>	нет	нет	да	да	<p>Чаще всего пробоподготовка требует высушивания образца, следовательно, амилоиды и амилоидогенез исследуется не напрямую и, в результате, могут наблюдаться потенциальные артефакты от дегидратации (например, кристаллы соли, поврежденные фибриллы) (Gosal et al., 2006). Методики атомно-силовой микроскопии, включая использование опорных поверхностей (например, липидных бислоев), часто трудны в использовании (Gosal et al., 2006).</p>
<b>Динамическое светорассеяние</b>	<p>ДРС — это метод лазерного рассеяния, способный анализировать распределение по</p>	нет	нет	нет	да	<p>Измеряемый параметр, гидродинамический радиус частицы,</p>

<b>(ДРС)</b>	размерам для рассеивающих частиц в диапазоне размеров от нанометра до микрометра (Berne & Pecora, 2000). Метод используется для количественного исследования образования амилоидных фибрилл различными белками (Georgalis et al., 1998; Hill et al., 2009; Streets et al., 2013).					может отличаться от истинного радиуса. В результате, определение реального размера и формы макромолекул затруднено.
<b>Флуоресцентная корреляционная спектроскопия</b>	Метод используется для измерения динамических молекулярных параметров, таких как время диффузии (из которого можно рассчитать размер частиц), конформация и концентрация флуоресцентных молекул (Tjernberg et al., 1999; Sahoo et al., 2016). Он особенно эффективен для характеристики распределений по размерам в молекулярных ассоциациях (например, образование димера/мультимера и фибрилл) как в термодинамически уравновешенных системах <i>in vitro</i> , так и в более сложных средах <i>in vivo</i> (Tjernberg et al., 1999).	нет	нет	нет	да	Этот метод требует использования флуоресцентных меток для маркировки амилоидов в образцах, что делает его трудным и редко используемым.
<b>Размер-</b>	Метод используется для разделения	нет	нет	нет	да	Невозможно изучать белковые агрегаты

<b>эксклюзионная хроматография</b>	разнообразных по размеру частиц путем пропускания раствора, их содержащего, через частично проницаемую гелевую среду. Он используется для анализа промежуточных соединений (в основном, олигомеров) и выявления растворимых агрегатов в тканях (Erlich et al., 2010; Esparza et al., 2016).					с высокой молекулярной массой.
<b>Аналитическое центрифугирование</b>	Этот метод основан на анализе скорости седиментации, который используется для определения размера, формы и гидродинамического поведения растворимых макромолекул, включая амилоидные фибриллы (Schuck, 2000; Mok & Howlett, 2006; Pham et al., 2011; Mok et al., 2015).	нет	нет	нет	да	Этот метод применяется только под специфические задачи.

## 1.2. Титин и его свойства

### 1.2.1. Структура и функции титина

Объект, который исследуется в данной работе, представляет собой мышечный белок титин. Титин (тайтин/коннектин) – самый большой из известных на сегодняшний день белков. Кодирован он геном *TTN*, который включает 364 экзона (Chauveau et al., 2014). Самым длинным вариантом считается «каноническая» изоформа, которую экспериментально еще не обнаружили. Размер ее должен достигать 3960 кДа (35991 аминокислота) (Nackman et al., 2017). К настоящему времени самая длинная N2A-изоформа белка была обнаружена в скелетной мышце soleus (3700 кДа), которая образуется при экспрессии 312 экзонов из канонических 363 экзонов (Prado et al., 2005). Самым коротким вариантом титина в скелетных мышцах является С-концевая усеченная новекс-3 изоформа (625 кДа) (Bang et al., 2001; Krüger & Linke, 2011). Подобная варибельность титина, возможна благодаря альтернативному сплайсингу, обеспечивающему в теории экспрессию более 1 миллиона вариантов белка (Guo et al., 2010). Экспрессия того или иного варианта зависит как от типа мышечной ткани, так и от адаптации мышц к факторам внешней или внутренней среды (Вихлянцев и Подлубная, 2012).

Титин имеет многодоменную структуру и его ген кодирует белок, в состав которого входят: протеинкиназный домен, 152 Ig-домена, 132 FnIII-домена, 31 домен PEVK (участки богатые аминокислотными остатками: пролином, глутаминовой кислотой, лизином и валином), 7 Z-повторов и 33-неидентифицированных домена (по базе UniProt).

Молекулы титина длиной около 1 мкм и диаметром 3–4 нм (Suzuki et al., 1994; Tskhovrebova & Trinick, 1997; Вихлянцев, 2011; Вихлянцев и др., 2011) перекрывают половину саркомера от М-зоны до Z-диска, формируя третий тип нитей, получивших название эластичных (Рис. 5) (Cola et al., 2005; Вихлянцев и Подлубная, 2012).

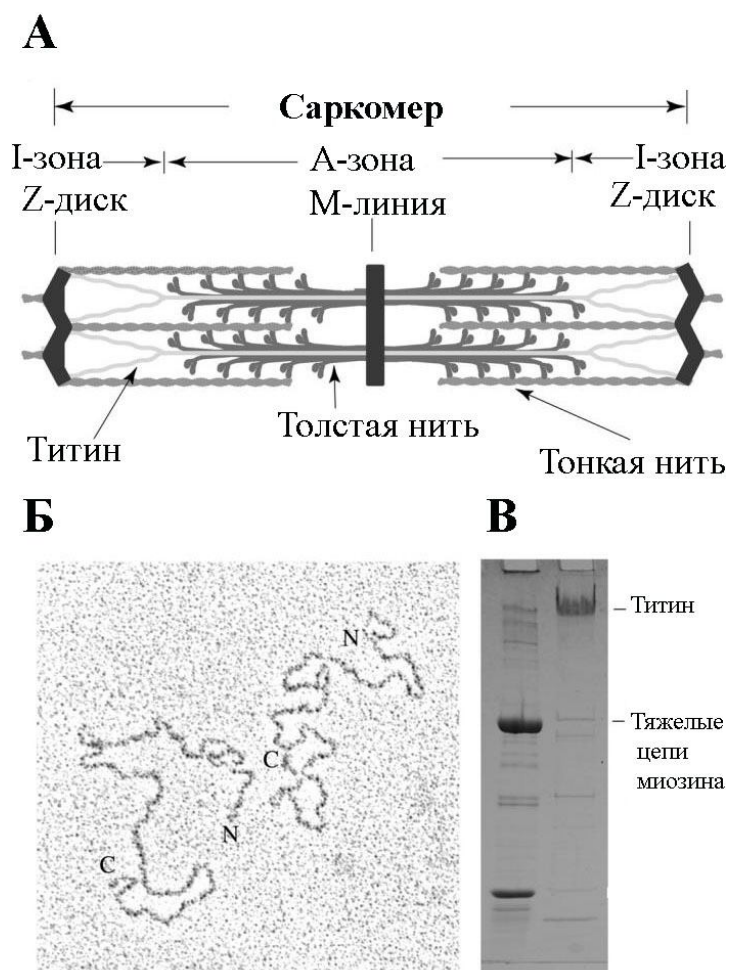


Рис. 5. (А) Схематическое изображение саркомера (I-область молекулы титина прикреплена к Z-диску. В А-зоне молекулы титина прочно связаны с толстыми (миозиновыми) нитями). (Б) Электронная микрофотография очищенных молекул титина (длина молекулы составляет ~ 1 мкм). (В) ДСН-гель-электрофорез препарата титина (Cola et al., 2005).

В саркомерах сердечной и скелетных мышц позвоночных титин является третьим по количеству (после актина и миозина) белком (Labeit et al., 1997). Исследования показали, что этот гигантский полипептид имеет различное строение в разных зонах саркомера (Tskhovrebova & Trinick, 2010). Расположение титина во всех зонах саркомера, эластические свойства и взаимодействие со многими белками создают основу для полифункциональности этого белка. Показано, что титин:

- 1) является каркасом для сборки миозиновых нитей и саркомера (Peckham et al., 1997; Gregorio et al., 1998; Ayoob et al., 2000; Van der Ven et al., 2000);
- 2) участвует в поддержании высокоупорядоченной саркомерной структуры и, вследствие этого, сократительной функции мышцы (Horowitz et al., 1986; Higuchi, 1992);



3) участвует в запуске и регуляции актин-миозинового взаимодействия как через связывание с белками тонких нитей (Kulke et al., 2001; Podlubnaya et al., 2003; Lee et al., 2010), так и посредством изменения АТФ-азной активности миозина (Kimura et al., 1984; Вихлянцев и Подлубная, 2003; Вихлянцев и др., 2011);

4) предполагается, что в комплексе с сигнальными белками, объединенными титином в единую сеть, он играет роль сенсора растяжения и напряжения, участвуя в процессах внутриклеточной сигнализации, в частности, в регуляции экспрессии генов мышечных белков и белкового обмена в саркомере (Lange et al., 2005; Tskhovrebova & Trinick, 2005; Granzier & Labeit, 2006; Linke, 2008; Puchner et al., 2008; Linke & Krüger, 2010; LeWinter & Granzier, 2010; Ottenheijm & Granzier, 2010; Buyandelger et al., 2011; Gautel, 2011; Stahl et al., 2011).

В 2002 году Kim и Keller отметили, что в висцеральных гладких мышцах и сосудах птиц также содержатся мегадальтоновые белки, которые по своей структуре и способности взаимодействовать с миозином похожи на титин поперечнополосатой мышечной ткани. Однако сложность в изучении гладкомышечного титина заключается в том, что не известно точное расположение сократительных единиц в гладкомышечных клетках и расположение титина в них. Сами клетки гладких мышц структурно не похожи на многоядерный синцитий скелетных и сердечной мышц. Гладкомышечные клетки имеют удлиненную веретенообразную форму длиной 2-50 мкм. В центре клеток располагается единственное ядро. Эти клетки могут располагаться как по отдельности (в собственной пластинке кишечных ворсинок), так и располагаться слоями в стенках широкого круга трубчатых систем организма: пищеварительной, мочеполовой, дыхательной и сердечно-сосудистой (Ross & Pawlina, 2006).

При электронной микроскопии в гладкомышечных клетках не прослеживается поперечной исчерченности как в скелетных и сердечной мышцах (рис. 6). Толстые нити миозина разбросаны по всей саркоплазме клеток, а тонкие (актиновые) нити прикреплены к цитоплазматическим плотным телам, являющимся аналогами Z-дисков (Zhang & Gunst, 2008).

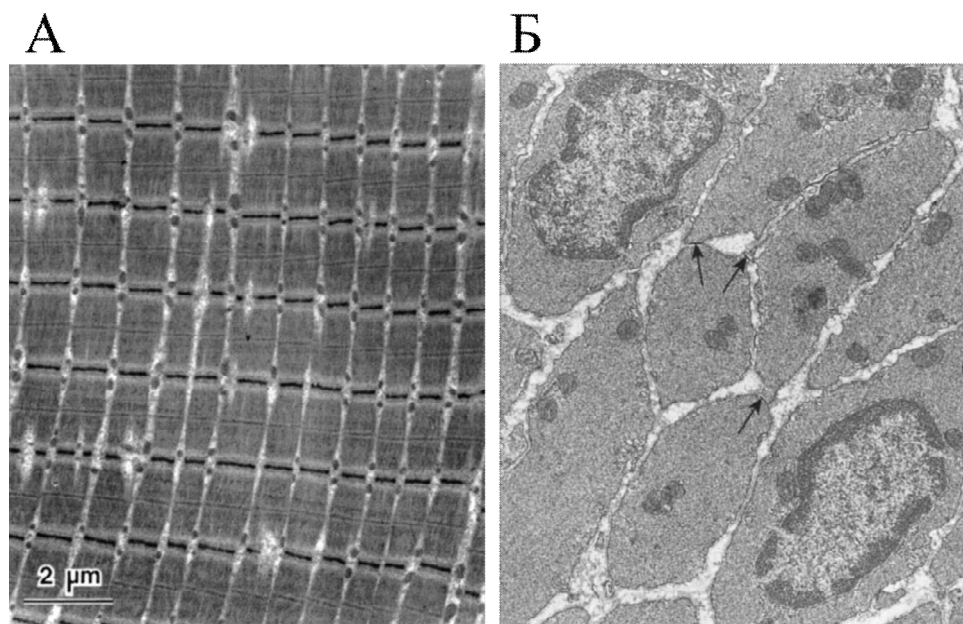


Рис. 6. Электронно-микроскопические фотографии срезов поперечнополосатой мышечной ткани (А) и гладкомышечной (Б). Стрелочками указаны щелевидные контакты между соседними гладкомышечными клетками (дополнено и модифицировано (Ross & Pawlina, 2006)).

На данный момент исследователями предполагается, что актиновые нити охватывают всё расстояние от одного плотного тела к другому, и сократительные единицы располагаются параллельно телу клетки (рис. 7) (Ali et al. 2005). Гладкомышечные клетки используют сократительный аппарат, основанный на взаимодействии актина с миозином II, для поддержания различных физиологических функций, включая регулирование артериального давления и кишечной перистальтики. Организация сократительного аппарата гладких мышц аналогична таковому с поперечнополосатыми и сердечными мышцами, но остается самой неизученной. В частности, функциональные характеристики молекулы титина гладких мышц не известны, как и расположение его молекул относительно плотных тел и сократительных единиц в гладкомышечных клетках. Считается, что функциональная роль этого белка состоит в поддержании пассивного напряжения и выполнении других функций, приписываемых титину поперечно-полосатых мышц.

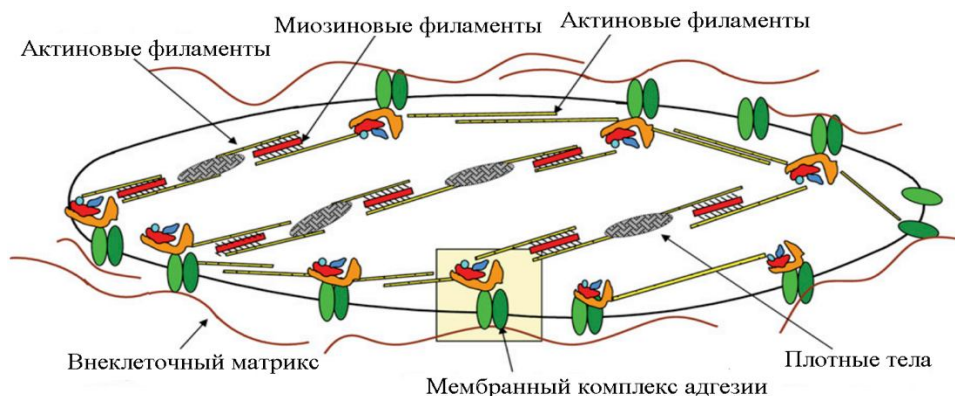


Рис. 7. Схематическое изображение организации цитоскелета гладкомышечной клетки. Актиновые филаменты прикреплены к разбросанным в клетках плотным телам. Миозиновые филаменты располагаются между двумя актиновыми нитями и соединяют соседние сократительные единицы (дополнено и модифицировано (Ali et al. 2005)).

Предполагается, что молекулы титина могут играть центральную роль в организации миозиновых нитей в сократительном аппарате и других структур гладкомышечных клеток (Kim & Keller, 2002).

В гладкой мускулатуре курицы были выявлены 700 кДа и 2000 кДа изоформы титина, известные сначала как титин-подобные белки зегматин (zeugmatin) (Maher et al., 1985) и смитин (smitin) (Kim & Keller, 2002) соответственно. Дальнейшие исследования, подтверждающие, что эти белки кодируются геном *TTN*, не оставили сомнений в том, что были обнаружены новые изоварианты титина (Labeit et al., 2006). Таким образом, в результате альтернативного сплайсинга в гладких мышцах животных (аорты, мочевого пузыря, желудка и др.) экспрессируется только 80-100 экзонов гена. Эти экзоны кодируют части титина Z-диска, I- и A-зоны, что позволяет укороченной гладкомышечной изоформе связывать плотные тела (аналоги Z-дисков поперечно-полосатых мышц) с толстыми нитями (Labeit et al., 2006). В ходе данной диссертационной работы исследовались агрегационные свойства гладкомышечной изоформы титина с молекулярной массой 500 кДа из желудков курицы. Однако стоит отметить, что интерес к агрегационным свойствам титина возник не впервые.

### 1.2.2. Агрегационные свойства титина

Ещё в 1993 году Koretz et al. провели первые исследования агрегации скелетномышечного титина *in vitro*. Было показано, что в растворах с низкой ионной силой (0.1 М KCl) вблизи нейтрального значения pH (6.5) титин собирается в агрегаты более высокого порядка. С начала 2000-х годов сотрудниками нашей лаборатории

проводились исследования агрегационных свойств титина поперечно-полосатых мышц млекопитающих. Было показано, что в условиях с ионной силой  $\sim 0.1$  титин сердечной и скелетных мышц образует плотные пучки линейных фибрилл, а также аморфные агрегаты (Вихлянцев, 2005, кандидатская диссертация).

В 2003 году при помощи атомно-силовой микроскопии было обнаружено, что при понижении ионной силы выделенные молекулы титина из поперечно-полосатых мышц способны самоорганизовываться в олигомеры в течение всего 10 минут. При этом перед использованием образцы белка находились в буферном растворе, содержащем 30 мМ К-фосфата, 0.6 М KCl, 0.1 мМ EGTA, 0.3 мМ DTT, 0.1% NaN<sub>3</sub>, 40 мкг/мл леупептина, 20 мМ E-64 и 0.05% Tween-20, pH 7.0, после чего разводились в растворе, содержащем 25 мМ имидазола-HCl, 0.2 М KCl, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ EGTA, 0.01% NaN<sub>3</sub>, 1 мМ DTT, 20 мкг/мл леупептина, 10 мМ E-64, pH 7.4 и размещались на поверхность слюды для связывания на 10 минут (Kellermayer et al., 2003). В таких условиях можно было наблюдать как отдельные молекулы титина, так и образованные им олигомеры (Рис. 8А). Такие олигомеры можно было разделить от низкого (бимолекулярного) до более высокого порядка, но в каждом случае у молекулы титина наблюдалась глобулярная головка, через которую она связывалась с другими, формируя скопления нитей (Рис. 8Б). Такая головка являлась единственным местом соединения соседних молекул титина, так как остальные контуры молекул не связывались между собой и были независимы в пространстве (Kellermayer et al., 2003).

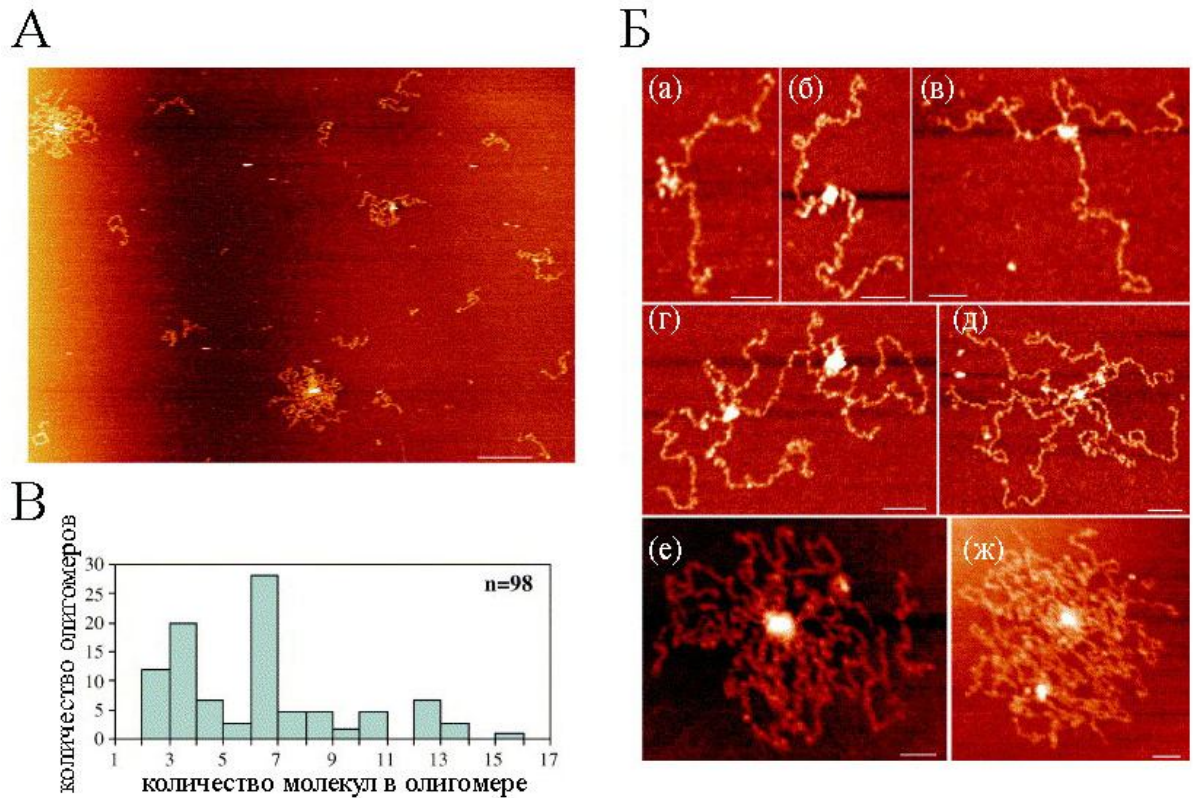


Рис. 8. Атомно-силовая микроскопия олигомеров титина поперечно-полосатых мышц (Kellermayer et al., 2003). (А) Поле зрения небольшого участка покрытой титином поверхности слюды (шкала 0.5 мкм). (Б) Олигомеры титина в диапазоне от бимолекулярных (а,б) до комплексов более высокого порядка (в,г,д,е,ж). На изображениях Б (г,ж) два олигомера лежат близко друг к другу (шкала 0.1 мкм). (В) Распределение количества молекул титина в олигомерах.

Подсчет распространения олигомеров с различным количеством молекул (Рис. 8В) позволил заключить, что некоторые олигомерные структуры являются более распространенными, чем другие (Kellermayer et al., 2003). Свойство молекул титина сцепливаться головками, по-видимому, является следствием роли этой части титина в формировании структуры М-линии саркомера (Kellermayer et al., 2003).

Исследование структуры титина проводилось на отдельных доменах или на последовательностях из нескольких доменов этого белка. В 1999 году при помощи атомно-силовой микроскопии были проведены исследования на восьми последовательно связанных доменах титина из I-зоны саркомера (I27) *in vitro* (Borgia et al, 1999). Такую последовательность доменов подвергали механическому растяжению для того, чтобы развернуть вторичную структуру. При этом было показано, что после релаксации

(прекращения воздействия) система доменов возвращалась в своё первоначальное состояние. Однако после повторяющихся циклов механического растяжения/релаксации в таком доменном конструкторе могли образовываться структуры, в которых аминокислотные цепи одного из доменов перекрывались с аминокислотными цепями другого (Oberhauser et al, 1999). В данном случае также можно говорить об агрегации доменов титина между собой.

В 2005 г. Wright et al. при изучении агрегации между различными доменами титина сделали вывод о том, что способность к агрегации возрастает, когда идентичность аминокислотных последовательностей доменов превышает 40%. При помощи молекулярного моделирования, проведенного в 2015 году, было показано, что при повторном сворачивании тандемов из нескольких доменов титина (иммуноглобулин-подобных доменов I27–I27 и I27–I28), независимо от идентичности последовательностей, более половины всех молекул временно образуют широкий диапазон неправильно свёрнутых конформаций (Borgia et al., 2015). Моделирование также показало, что большая часть таких сформированных структур напоминает внутримолекулярное амилоидоподобное состояние, названное «внутримолекулярные амилоиды» (Borgia et al., 2015). В этой связи следует отметить, что в работах нашей лаборатории ранее амилоидные свойства были обнаружены у агрегатов таких белков семейства титина, как титин, X- C- и H-белки (миозин-связывающиеся белки), сформированных при понижении ионной силы (Marsagishvili & Podlubnaya, 2005; Марсагишвили и др. 2005; Подлубная и Марсагишвили, 2008; Бобылёв и др., 2013). Амилоидная природа агрегатов вышеуказанных белков была подтверждена люминесцентной и поляризационной микроскопией, а также спектральными методами с использованием красителей Конго красного и тиофлавинаГ. В 2016 году при помощи рентгеновской дифракции и ряда других методов нами была подтверждена амилоидная природа аморфных агрегатов титина гладких мышц (Bobylev et al., 2016). Эти результаты послужили импульсом для проведения дальнейших исследований агрегационных и амилоидных свойств титина гладких мышц.

Завершая обзор литературы, необходимо отметить следующее. Кроме своих нативных конформаций белки способны формировать аморфные агрегаты/фибриллы с внутренней кросс-β структурой. Такая форма белка может быть ассоциирована с каким-либо заболеванием, либо может играть функциональную роль в организме. Благодаря развитию методов исследования агрегации белков как *in vivo*, так и *in vitro*, понимание процессов амилоидной агрегации значительно выросло в настоящее время. Этому способствуют и исследования на *in vitro* моделях, что стало возможно благодаря тому, что

многие белки образуют амилоиды *in vitro*, даже если их агрегированные формы не обнаруживаются в тканях человека или животных. К одному из таких белков относится гигантский мышечный белок титин. Исследованию структурных изменений в титине гладких мышц при формировании им различных типов агрегатов *in vitro* и посвящена данная работа.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Выделение титина из желудков курицы

Титин из гладких мышц желудков курицы выделяли по методу (Trinick et al., 1984) с модификациями. Мышцы желудков гомогенизировали в 3-х – 5-ти кратном (по отношению к массе мышц) объеме раствора, содержащего 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 10 мМ имидазола, pH 7.0. Для уменьшения деградации белка в процессе выделения в раствор добавляли набор ингибиторов протеаз: 0.2 мМ фенилметилсульфонилфторида, 0.5 мМ ДТТ, 0.05 мМ леупептина. Полученный мышечный гомогенат центрифугировали в течение 10 минут при 5000g. Супернатант удаляли, а процедуру промывки повторяли 3-5 раз. К промытому осадку добавляли 3-х кратный объем экстрагирующего раствора, содержащего 0.6 М KCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 0.5 мМ ДТТ, 0.2 мМ фенилметилсульфонилфторида, 10 мМ имидазола, pH 7.0. Раствор также содержал 0.05 мМ леупептина. Экстракция проводилась на холоде при 4°C в течение 60 минут при непрерывном перемешивании. Экстракт осветляли в течение 60 минут при 15000 g и супернатант разбавляли в 2.5 раза охлажденной бидистиллированной водой для преципитации актомиозина (конечная ионная сила ~0,2). Через 1 час супернатант осветляли в течение 90 минут при 20000g. Для осаждения титина супернатант разбавляли в 4 раза (конечная ионная сила ~0.05) охлажденной бидистиллированной водой. Через 60 минут осадок, содержащий преимущественно титин, собирали центрифугированием в течение 60 минут при 15000g. Осадок растворяли в минимальном объеме колоночного («К») буферного раствора, содержащего 0.6 М KCl, 30 мМ KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, 0.5 мМ ДТТ, 0.1 М NaN<sub>3</sub>, pH 7.0 и осветляли в течение 10 минут при 20000g. Титин очищали методом гель-фильтрации на колонке с носителем Sepharose–CL2B, уравновешенным в этом же буфере.

### 2.2. Определение концентрации белковых препаратов

Концентрацию белков определяли спектрофотометрически с помощью спектрофотометра SPECOD UV VIS, используя для титина значение коэффициента экстинкции ( $E_{280}^{1 \text{ мг/мл}}$ ) 1.37 (Trinick et al., 1984).



### **2.3. ДСН гель-электрофорез титина и расчет м.м. белковых фракций**

Чистоту выделенного титина проверяли с помощью ДСН-гель-электрофореза по методу (Laemmli, 1970) с модификациями. В частности, в наших экспериментах был использован гель с 6.5% содержанием полиакриламида, а также 0.75 М трис-НСl буфер, рН 8.8, 0.1% ДСН, 10% глицерина, 0.05% тетраметилэтилендиамина и 0.05% персульфата аммония. При этом гель готовился однородным, без деления на концентрирующий и разделяющий гели. Эти модификации способствовали лучшему прохождению белковых полос титина в геле. Электродный буфер при проведении электрофореза содержал 0.192 М глицина, 0.025 М трис и 0.1% ДСН, рН 8.3. Электрофорез проводили при токе 7 мА первые 30–60 минут, после этого постепенно поднимали напряжение до 15 мА. По окончании электрофореза гели фиксировали в растворе, содержащем 10% этанола и 10% уксусной кислоты, в течение 20–30 минут. Затем гели окрашивали в течение 30–40 минут в растворе, содержащем 0.1% кумасси G-250 и R-250 (смешанных в пропорции 1:1), 45% этанола и 10% уксусной кислоты. Отмывка окрашенных гелей проводилась в 7% уксусной кислоте при постоянном перемешивании на качалке в течение 40–50 мин. Отмытые гели сканировали, а затем проводили анализ видимых полос с помощью компьютерной программы Total Lab v1.11.

### **2.4. Лиофилизация белка**

В образцы белка, растворенного в буферном растворе К, добавлялся 1% тригалоzy, после чего они замораживались при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . Далее образцы подвергались лиофилизации в приборе FreeZone 1L (Labconco, USA) при температуре  $-56^{\circ}\text{C}$  и давлении 0.013 мБ. Контроль деградации белка после лиофилизации осуществлялся при помощи электрофореза, описанного в пункте 2.3.

### **2.5. Вестерн-блот анализ**

Проводили электрофорез в 6.5% ПААГ образцов с гомогенатом мышц суслика, кролика, курицы и образцов с выделенным титином из желудков курицы. Раствор для проб, в котором находился белок перед нанесением на гель, имел конечную концентрацию следующих веществ: 0.125 М Трис НСl, 10% глицерин, 4% ДСН, 4 М мочевины, 10%  $\beta$ -меркаптоэтанол, 0.001% бромфеноловый синий, рН 6.8. Перенос белков на PVDF мембрану проводили по методу (Towbin et al., 1979). Затем мембраны блокировали в PBS с 5% сухого молока, 0.05% Tween 20, рН 7.4 в течение 1 часа. Гибридизацию с первичными антителами проводили при комнатной температуре в течение 2 часов. В работе использовались следующие первичные антитела:

моноклональные 9D10-с (1:1000, DSHB, США). Эти антитела специфичны к участкам молекулы титина, расположенным в I-зоне саркомера поперечно-полосатых мышц, а также к титину гладких мышц. Мембраны промывали 3 раза PBS и проводили гибридизацию в течение 1 часа со вторичными антителами, конъюгированными с щелочной фосфатазой (1:3000, Abcam, ab6790). Раствор NBT/BCIP (Roche, Германия) был использован для визуализации белковых полос на PVDF мембранах.

## 2.6. Условия формирования титином агрегатов

В экспериментах использовали очищенные на колонке препараты белка, в том числе образцы после лиофилизации (концентрация 0.2-0.4 мг/мл), растворенные в буферном растворе «К». Одни агрегаты титина («KCl-агрегаты») были сформированы путем диализа против буферного раствора, содержащего 0.2 М KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0-7.4 в целлюлозной мембране (Sigma-Aldrich) (size 25×16 mm) 3 и 24 часа (изоформа с м.м. 500 кДа) при 4°C. Вторые агрегаты титина («глицин-агрегаты») были сформированы также при помощи диализа в целлюлозной мембране (Sigma-Aldrich) (size 25×16 mm) против буферного раствора содержащего 0.15 М глицина-KOH, pH 7.0-7.4 3 и 24 часа. Способность к дезагрегации белка детектировалась после диализа обоих типов агрегатов титина против буферного раствора «К».

## 2.7. Динамическое светорассеяние

Образцы агрегатов титина исследовали через: 20, 40, 60, 120, 180 мин диализа против соответствующих буферных растворов. Последний образец оставляли в приборе для непрерывных измерений в течение 21 часа. В этом эксперименте образец титина, растворенный в буферном растворе «К» принимали за начальную точку агрегации (0 мин). Поскольку вязкость препаратов белка варьировалась из-за разного буферного состава, а расчеты размеров на основе ДРС зависят от вязкости. Вязкости растворов измеряли для более точного определения гидродинамического радиуса частиц. Для этого мы определили произведение динамической вязкости на плотность раствора титина, содержащегося в буферном растворе «К», который составил  $1.39 \text{ сП} \cdot \text{г}/\text{см}^3$ . После измерения плотности раствора ( $1.025 \text{ г}/\text{см}^3$ ) мы рассчитали значение динамической вязкости ( $1.36 \text{ сП}$ ). Эта величина была принята во внимание при измерениях размеров частиц в образцах титина. Произведение динамической вязкости по плотности раствора ( $1 \text{ г}/\text{см}^3$ ), содержащего титин в буферном растворе, содержащем 0.15 М глицина-KOH (pH 7.0–7.4), составляло  $0.92 \text{ сП} \cdot \text{г}/\text{см}^3$ . Соответственно значение динамической вязкости составляло  $0.92 \text{ сП}$ . Эта величина была принята во внимание при измерении размеров

частиц в образцах титина, собранных через 180 минут после диализа. ДРС выполняли в приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) с He-Ne лазером 4 мВт (632.8 нм) и контролем температуры кюветы образца (10°C). После термического уравнивания (обычно 5 мин) автокорреляционные функции собирали каждые 15 прогонов, используя время сбора прогонов 15 сек. Автокорреляционные функции были преобразованы в распределения частиц по размерам с использованием алгоритма «общего назначения», предоставляемого Zetasizer. Распределения частиц по размерам, полученные из альтернативных алгоритмов инверсии, дали сопоставимые результаты. Динамическую вязкость растворов определяли с использованием синусоидального виброметра Vibro SV-10 (A&D Company Ltd, Япония). Плотность определяли путем взвешивания 1 мл раствора. В экспериментах по дезагрегации агрегаты титина диализовали в течение 3 часов против раствора К.

### **2.8. Электронная микроскопия**

Для приготовления электронно-микроскопических образцов использовали препараты с концентрациями 0.2-0.4 мг/мл белка. Каплю раствора или суспензии наносили на медные сетки, покрытые коллодиевой пленкой (2% коллодий в амилацетате фирмы SPI-CHEM, США), укрепленной углеродом на 30-60 сек. После удаления избытка суспензии полоской фильтровальной бумаги образцы окрашивали 2% водным раствором уранилацетата. Электронно-микроскопические исследования проводили на микроскопе JEM100B.

### **2.9. Атомно-силовая микроскопия**

Образцы с агрегатами белка выдерживали на слюде в течение 5 мин, затем дважды промывали в течение 30 сек водой, сушили и анализировали структуру полученных комплексов с помощью AFM Integra-Vita (NT-MDT, Россия) с использованием кантилеверов NSG03 с радиусом кривизны наконечника 10 нм. Резонансная частота 47–150 кГц. Измерения проводились в полуконтактном (постукивающем) режиме. Полученные изображения были проанализированы с помощью Soft Nova (NT-MDT, Россия).

Для исследования отдельных молекул белка и его олигомеров 20 мкл образца титина, разведенного в буфере «К», наносили на поверхность свежесколотой слюды и инкубировали в течение 1 мин. Затем, чтобы убрать несвязанные молекулы и соли, поверхность промывали дистиллированной водой и сушили газообразным азотом. Поверхностно-адсорбированные молекулы анализировали с помощью Nanoscope III

(Digital Instruments) с использованием кремниевых кантилеверов в режиме постукивания. Скорость сканирования составляла  $\sim 1.5$  Гц. Полученные изображения были импортированы и проанализированы с помощью программного обеспечения Image 1.61 (Wayne Rasband, NIH). Для пространственной калибровки использовалась внутренняя калибровка АСМ. Автокорреляцию данных осевой высоты выполняли с использованием программного обеспечения IgorPro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR).

### 2.10. Круговой дихроизм

Спектры кругового дихроизма титина до и после образования им агрегатов, регистрировали на спектрополяриметре Jasco J-815 CD Spectrometer (JASCO, Япония), используя кварцевые кюветы с длиной оптического пути 0.1 см. Спектры кругового дихроизма измерялись в диапазоне длин волн 250–190 нм. Вторичную структуру белка рассчитывали с помощью модуля CONTINLL программы CDPro (Sreerama & Woody, 2000).

### 2.11. Инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием

Измерения проводились на ИК-Фурье спектрометре Nicolet 6700 производства компании Thermo Scientific, оснащенный приставкой Smart Proteus с Пельтье-контролируемым кюветодержателем в режиме пропускания в кювете из кристаллического фторида кальция с оптическим путем 4 мкм, используя МСТ детектор (охлаждение жидким азотом). Сканирование в диапазоне волновых чисел от  $650\text{ см}^{-1}$  до  $4\ 000\text{ см}^{-1}$  с разрешением  $1\text{ см}^{-1}$ , усреднение по 256 спектрам. Прибор откалиброван в соответствии с инструкциями компании-производителя прибора.

ИК спектры растворов препаратов титина в соответствующем буфере и спектры самого буфера измеряли при  $20^\circ\text{C}$ . Концентрация белка 36-42 мг/мл. Белок был сконцентрирован путем разведения лиофилизированного образца в наименьшем количестве буферного раствора. После агрегации, образцы также были центрифугированы и использовался осадок, разведенный в 30-50 мкл. Оптический путь кюветы из  $\text{CaF}_2$  рассчитывали для каждого измерения, исходя из величины оптической плотности исследуемого образца на  $3\ 404\text{ см}^{-1}$ , используя величину поглощения воды при оптическом пути 1 мкм, равную 0.533 AU, с поправкой на концентрацию белка в пробе (Venyaminov & Prendergast, 1997). Оптический путь кюветы составлял  $(4.52 \pm 0.04)$  мкм. ИК спектр препарата белка измеряли два раза и два раза прописывали спектр буфера. Из каждого спектра белка вычитали ИК спектр буфера SP1, учитывая различие величин оптического пути в измерениях. Каждый разностный спектр поправляли на спектральный

вклад паров воды и  $\text{CO}_2$  с последующим анализом в диапазоне волновых чисел 1725 – 1481  $\text{cm}^{-1}$  на предмет содержания элементов вторичной структуры в белке, следуя принципам, описанным в работе (Yang et al., 2015). Полученные оценки содержания элементов вторичной структуры в белке усредняли. Приведены стандартные отклонения величин содержания элементов вторичной структуры в белке.

### **2.12. Рентгеновская дифракция**

Агрегаты титина для рентгеноструктурного анализа готовили после 24-часовой инкубации при  $4^\circ\text{C}$  в соответствующих растворах. «KCl-агрегаты» титина первого типа, а также «KCl»- и «глицин-агрегаты» после диализа в растворе «К» подвергали диализу в течение 24 часов при  $4^\circ\text{C}$  против раствора, содержащего 0.15 М глицина-КОН, pH 7.2–7.4. Для достижения концентрации образцов более 10 мг/мл использовалось центрифугирование при 12000 об/мин в течение 60 мин. Капли полученных препаратов белка помещали между концами покрытых воском стеклянных капилляров (диаметром около 1 мм), разделенных примерно на 1.5 мм для дальнейшего высушивания на воздухе. Дифракционные изображения были получены, используя Microstar X-ray генератор с оптикой HELIOX, который оснащен Platinun135 CCD detector (X8 Proteum system, Bruker AXS). Использовалось  $\text{Cu K}\alpha$ -излучение с  $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$  ( $1 \text{ \AA} = 0.1 \text{ нм}$ ). Образцы располагали под прямым углом к рентгеновскому лучу с использованием четырехосного каппагонометра.

### **2.13. Флуоресцентный анализ с красителем тифлавином Т**

Амилоидная природа агрегатов титина оценивалась по интенсивности флуоресценции ТТ (1 ТТ: 5 титина (w/w)). Флуоресценцию измеряли при  $\lambda_{\text{ex}}=440 \text{ нм}$  и  $\lambda_{\text{em}}=488 \text{ нм}$  с использованием Спектрофотометра Cary Eclipse (Varian, США). Спектр препарата белка измеряли пять раз и пять раз прописывали спектр буфера. В результатах представлены средние значения всех пяти измерений для всех образцов.

### **2.14. Спектральный анализ с красителем Конго красным**

Суспензию агрегатов титина (100 мкл, 0.4 мг/мл) добавляли к 1800 мкл раствора, содержащего 0.2 М KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0– 7.4 или 0.15 М глицина-КОН, pH 7.2–7.4 с КК (0.02 мг/мл). Конечное соотношение белок/КК в образце составляло 1:1 (w/w). Такое же соотношение белка к КК использовали в экспериментах по реагрегации. Спектры поглощения КК в отсутствие и в присутствии белка регистрировали при 450–650 нм с использованием спектрофотометра CARY 100 (Varian, США).

### **2.15. Поляризационная микроскопия с красителем Конго красным**

Использовались соотношения агрегатов титина к раствору Конго красного (1:125 (w/w)). Образцы центрифугировали при 12000–14000 об/мин для концентрирования агрегатов, после чего убирался супернатант и образцы промывались дистиллированной водой 2–3 раза. Затем к осадку белка добавляли небольшое количество воды (5–10 мкл) и наносили его на предметное стекло микроскопа. Высушенные на воздухе образцы анализировали в поляризованном свете. Все процедуры проводились в режиме ламинарного потока на чистых покровных стеклах. Исследования проводились с использованием микроскопа, оборудованного двумя поляризаторами.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. ДСН гель-электрофорез и Вестерн-блот анализ титина

Идентификация белковых фракций и определение их чистоты после выделения белка проводилась при помощи ДСН гель-электрофореза (Рис. 9А,Б) и Вестерн-блот анализа (Рис. 7В,Г).

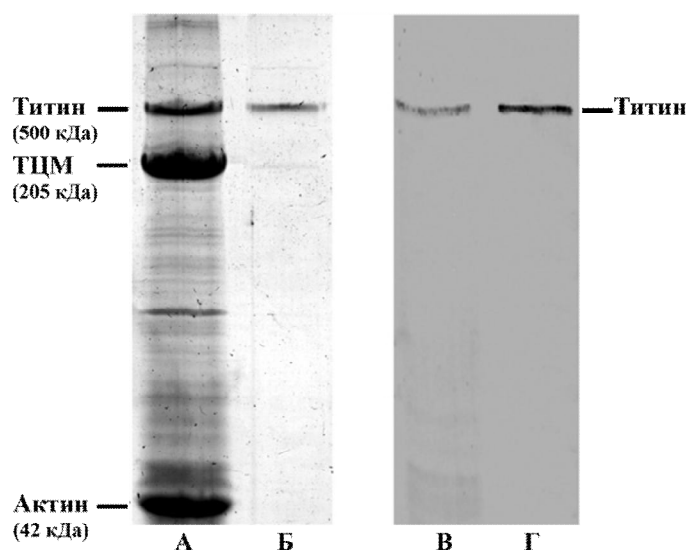


Рис. 9. Исследование чистоты белковых препаратов и идентификация титина. ДСН-гель-электрофорез белкового экстракта желудка курицы (А) и препарата очищенного гладкомышечного титина (Б); Молекулярная масса титина в зависимости от электрофоретической подвижности его полосы в геле составила ~500 кДа (оценка проводилась с использованием программного обеспечения Total Lab v1.11). Вестерн-блот анализ с применением антител 9D10 экстракта желудка курицы (В) и препарата очищенного гладкомышечного титина (Г).

Используя логарифмическую зависимость между молекулярной массой и подвижностью белка в геле, мы определили, что выделенный белок имеет м.м. ~500 кДа (Рис 9А,Б). Вестерн-блот анализ подтвердил, что выделенный белок является титином (Рис. 9Г).

### 3.2. Исследование скорости агрегации титина методом динамического светорассеяния

На рисунке 10 представлены результаты, полученные методом ДРС, по формированию агрегатов титина первого («KCl-агрегаты») и второго («глицин-агрегаты») типов по истечении 180 минут эксперимента. Именно по истечению этого времени титин формировал очень крупные агрегаты белка, дальнейшая агрегация которых уже выходила за рамки чувствительности данного метода. Не было выявлено существенных различий в размерах частиц и в их процентном соотношении у агрегатов обоих типов. Так в препаратах гладкомышечного титина (до начала формирования агрегатов наблюдалось две фракции частиц, средний гидродинамический радиус (Rh) которых был приблизительно 12-15 нм (доминирующий пик ~90%) и ~45 нм (минорный пик ~10%). Первый пик, скорее всего, соответствует отдельным молекулам титина, тогда как второй пик может свидетельствовать о незначительном присутствии олигомеров белка. После 180 минут агрегации в препаратах белка наблюдалось три фракции частиц. При агрегации «KCl-агрегатов» им соответствовали следующие значения гидродинамических радиусов (Rh): ~20 нм, ~200 нм, ~8000 нм (Рис. 10). При агрегации «глицин-агрегатов» им соответствовали значения Rh: ~20 нм, ~700 нм, ~8000 нм (Рис. 10).

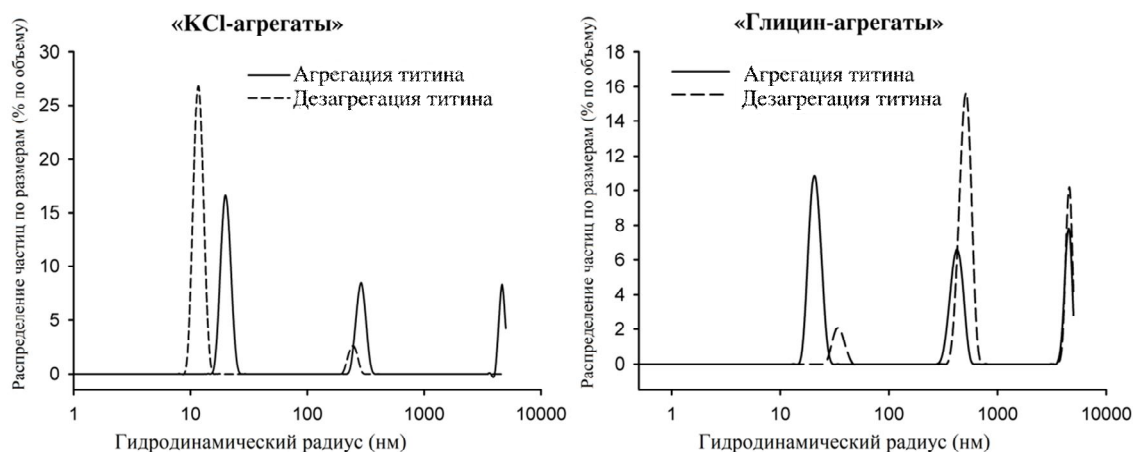


Рис. 10. Распределение размеров частиц титина, полученное методом ДРС. Образование крупных агрегатов и их рост в зависимости от времени. Слева представлены данные для «KCl-агрегатов» (сформированы путем диализа в течение 180 минут против буферного раствора, содержащего 0.2 М KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0-7.4), справа – «глицин-агрегатов» (диализ в течение 180 минут против буферного раствора, содержащего 0.15 М глицина-KOH, pH 7.0-7.4).



Не было выявлено различий в скорости образования агрегатов обоих типов. Скорость агрегации титина в двух вышеуказанных растворах была высокой: за 20 минут уже формировались достаточно крупные агрегаты белка (Rh: ~700 нм), а после 3 часов формировались агрегаты, размеры которых выходили за рамки чувствительности метода. Исходя из этого, было принято решение использовать в последующих экспериментах две временные точки агрегации: 3 часа и 24 часа.

Таким образом, методом ДРС была выявлена относительно высокая скорость агрегации титина. Интересным является также тот факт, что при повторном повышении ионной силы раствора (диализ против буферного раствора «К») в образцах «КСI-агрегатов» методом ДРС была обнаружена их частичная дезагрегация (Рис. 10, пунктирная линия). В частности, только в «КСI-агрегатах» после повышения ионной силы раствора была обнаружена фракция частиц с Rh ~12 нм, что указывает на появление неагрегированных отдельных молекул этого белка. В случае «глицин-агрегатов» подобная фракция частиц не наблюдалась. Более того, процент частиц с самыми малыми значениями Rh даже после повышения ионной силы раствора в образцах «глицин-агрегатов» уменьшался, а число частиц с большими гидродинамическими радиусами увеличивался, что указывает на необратимость агрегации титина у агрегатов второго типа.

### **3.3. Электронно-микроскопическое изучение агрегатов титина.**

На рисунке 11 представлены электронно-микроскопические данные, подтверждающие аморфную морфологию «КСI-агрегатов» и «глицин-агрегатов» (Рис. 11).

Не было выявлено различий в морфологии между двумя типами агрегатов титина как через 3 часа (Рис. 11А,Б) так и 24 часа (Рис. 11Д,Е) агрегации белка. Различия в морфологии агрегатов были обнаружены после повышения ионной силы раствора, в которых находились агрегаты. «КСI-агрегаты» после помещения их в раствор «К» (ионная сила 0.6) приобретали более рыхлый вид как после 3 часов (Рис. 11В), так 24 часов (Рис. 11Д) дезагрегации. Иная картина наблюдалась при помещении в раствор «К» «глицин-агрегатов» (Рис. 11Г,З). Эти агрегаты приобретали более плотную структуру через 24 часа дезагрегации (Рис. 11З). Результаты электронно-микроскопических наблюдений согласуются с данными, полученными методом ДРС: в образцах «глицин-агрегатов» при повышении ионной силы раствора, не наблюдались моно/димерные формы белка, которые

присутствовали в образцах «КСI-агрегатов» (Рис. 10). Присутствие подобных форм свидетельствует о дезагрегации белка.

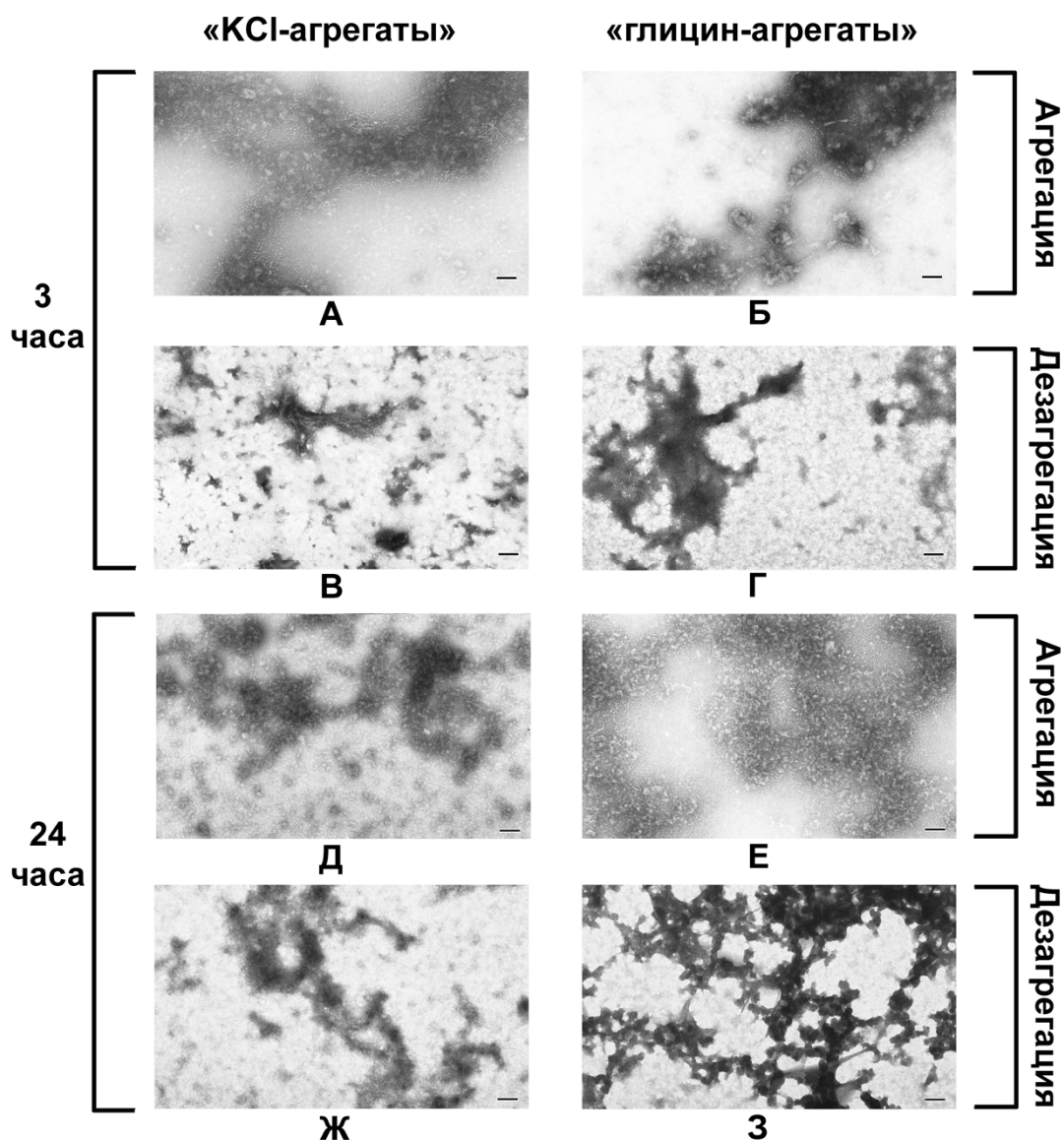


Рис. 11. Электронная микроскопия негативно окрашенных агрегатов гладкомышечного титина. Аморфные «КСI-агрегаты» титина через 3 часа (А) и через 24 часа (Д) агрегации. Аморфные «глицин-агрегаты» титина через 3 часа (Б) и через 24 часа (Е) агрегации. «КСI-агрегаты» титина после их помещения в раствор с ионной силой  $\sim 0.6$ : через 3 часа (В) и через 24 часа (Ж) дезагрегации. «Глицин-агрегаты» титина через 3 часа (Г) и через 24 часа (З) дезагрегации. Для окрашивания использовался 2% водный раствор уранилацетата. Шкала 100 нм.

### 3.4. Исследование агрегатов титина методом атомно-силовой микроскопии (АСМ)

Данные АСМ не противоречили электронно-микроскопическим данным. Во всех исследуемых образцах агрегаты титина (Рис. 12) имели аморфный вид.

По данным АСМ «КСI-агрегаты» титина после 3 часов агрегации имели размер от 30-50 нм до одного микрометра по ширине и до 25 нм по высоте (Рис. 12А). Трехчасовая дезагрегация приводила к значительному уменьшению количества и размера белковых агрегатов (Рис. 12В). В поле зрения были обнаружены единичные сферической формы, агрегаты диаметром не более 100 нм и высотой до 20 нм. В препарате преобладали структуры высотой до 8-10 нм (Рис. 12В).

После 24 часов агрегации «КСI-агрегаты» титина образовывали пористые структуры высотой 8-10 нм (Рис. 12Д). После 24 часов дезагрегации эти структуры не наблюдались, а были видны сфероидальные агрегаты высотой 10-12 нм (Рис. 12Ж). Т.о., полученные результаты свидетельствуют о дезагрегации «КСI-агрегатов» титина при ионной силе  $\sim 0.6$ , что согласуется с данными, полученными методом ДРС (Рис. 10).

«Глицин-агрегаты» титина после 3 часов агрегации по данным АСМ имели больше морфологических различий и отличий по размеру и высоте (Рис. 12Б). Наблюдались их скопления сферической формы до 4 мкм в ширину и 400 нм в высоту (самые крупные). При этом диаметр отдельных сферических агрегатов составлял  $\sim 1$  мкм (Рис. 12Б). Наблюдались также и другие более мелкие (ветвящиеся) агрегаты, высота которых составляла  $\sim 100$  нм (Рис. 12Б, стрелка). По форме эти агрегаты были похожи на «КСI-агрегаты» (Рис. 12А).

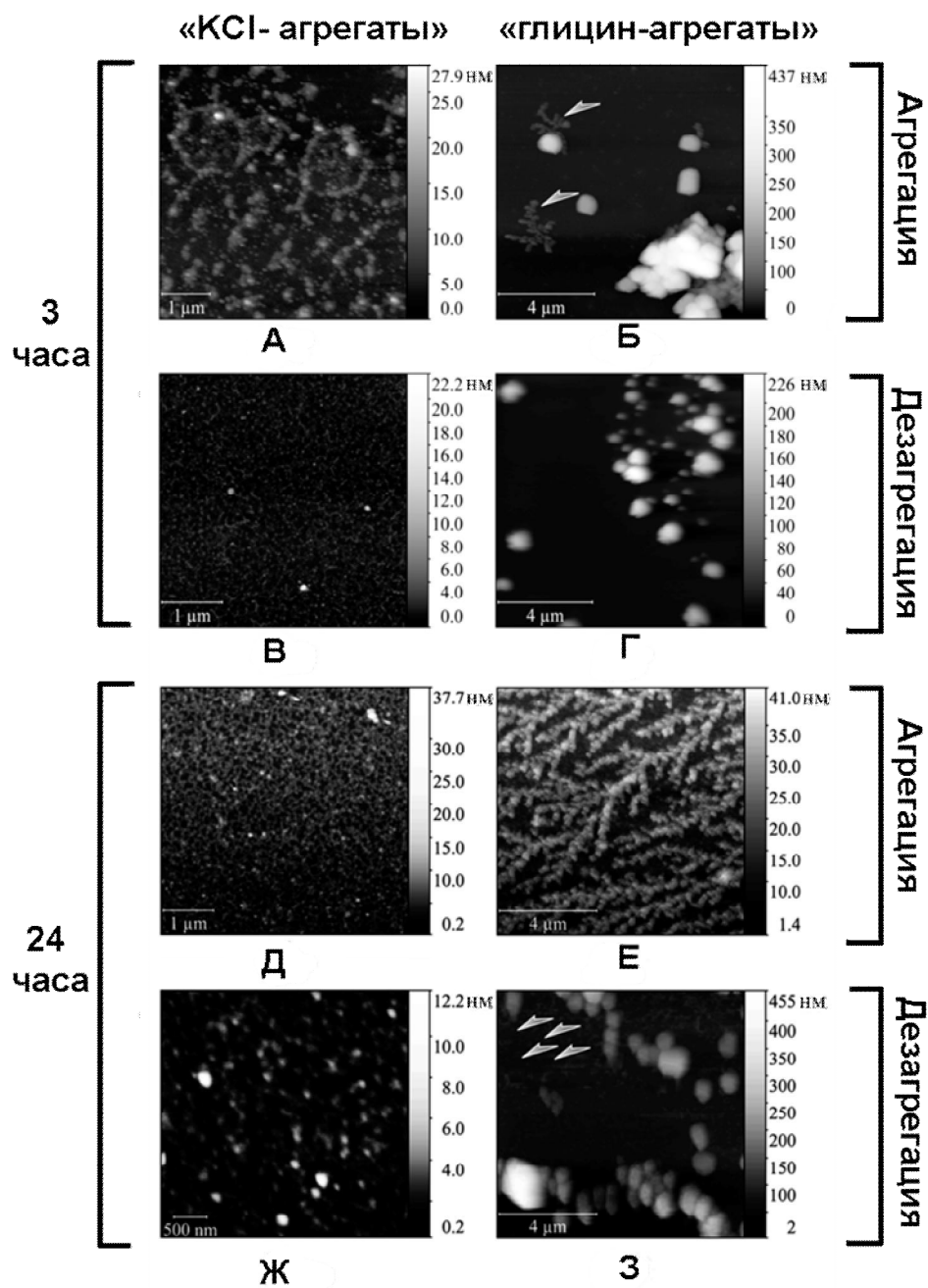


Рис. 12. Атомно-силовая микроскопия агрегатов титина. «KCl-агрегаты» через 3 часа (А) и 24 часа (Д) агрегации. «Глицин-агрегаты» через 3 часа (Б) и 24 часа (Е) агрегации. «KCl-агрегаты» титина после их помещения в раствор с ионной силой  $\sim 0.6$ : после 3 часов (В) и 24 часов (Ж) дезагрегации. «Глицин-агрегаты» после 3 часов (Г) и 24 часов (З) дезагрегации.

После помещения «глицин-агрегатов» в раствор с высокой ионной силой ( $\sim 0.6$ ) через 3 часа можно было наблюдать только сфероидные агрегаты шириной до 1.5 мкм и

высотой до 200 нм (Рис. 12Г), что свидетельствует о некоем уменьшении размера белковых агрегатов титина, но не их дезагрегации.

«Глицин-агрегаты» титина через 24 часа агрегации по данным АСМ представляли собой разветвленные цепи, состоящие из сферических агрегатов диаметром около 300-500 нм и высотой до 35 нм (Рис. 12Е). По-видимому, зарождение данных агрегатов происходило по истечении 3 часов агрегации (Рис. 12Б, стрелочка). После 24 часов дезагрегации (т.е., после помещения «глицин-агрегатов» в раствор с высокой ионной силой) разветвленные цепи, состоящие из сферических агрегатов, не наблюдались (Рис. 12З). Однако при этом были видны крупные сферические агрегаты, диаметр которых составлял 2 мкм и более, а высота 200-400 нм (Рис. 12З). Эти результаты согласуются с данными, полученными методом ДРС, указывающими на дальнейшее увеличение гидродинамического радиуса частиц «глицин-агрегатов» после повышения ионной силы раствора (Рис. 10). Т.о. несмотря на то, что в поле зрения наблюдались и более мелкие агрегаты белка (Рис. 12З, стрелочки), на основании полученных результатов можно утверждать, что агрегация «глицин-агрегатов» была необратимой.

### **3.5. Исследование методом атомно-силовой микроскопии мономеров и олигомеров титина в условиях с высокой ионной силой**

Поскольку методом ДРС нами было показано наличие олигомеров титина в растворе с высокой ионной силой (~0.6), а также учитывая данные Келлермайера (2003), показавшего, что в препаратах титина, выделенного из поперечнополосатых мышц, наблюдаются не только одиночные молекулы, но и олигомеры белка, мы задались целью провести подобные исследования и с гладкомышечным титином. Эти исследования были проведены совместно с Келлермайером в его лаборатории Биофизики и Радиационной биологии (Семмельвеский Университет, Будапешт, Венгрия) в период с 5 августа по 1 сентября 2019 и с 10 января по 21 марта 2020.

На рисунке 13 представлена фотография мономеров (одиночных молекул), а на рисунках 14 и 15 – фотографии олигомеров гладкомышечного титина, полученные с помощью АСМ.

Как и молекула титина поперечнополосатых мышц (Kellermayer et al., 2003; Tskhovrebova & Trinick, 1997; Вихлянцев, 2011), молекула гладкомышечного титина имеет нитевидную форму с толщиной нити 3-4 нм, длиной ~300 нм с глобулярной головкой на

одном конце (Рис. 13). По нашим расчетам такие молекулы должны иметь м.м. 500-600 кДа.

Кроме отдельных молекул титина были видны олигомеры этого белка. Одни олигомеры, связываясь головками, имели уплотнение в центре с отходящими от него молекулами титина (Рис. 14).

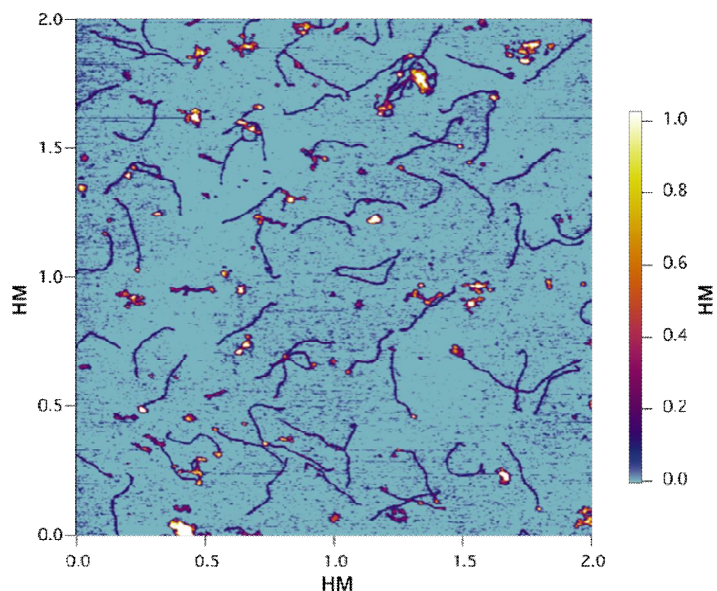


Рис. 13. Атомно-силовая микроскопия мономеров гладкомышечного титина. В поле зрения можно наблюдать нитевидные мономеры белка. В ряде случаев, на одном из концов наблюдается глобулярное утолщение.

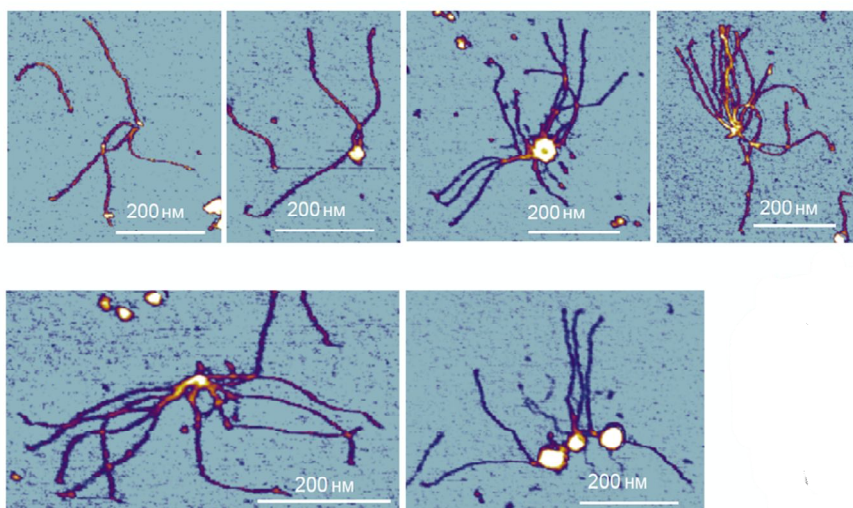


Рис. 14. Атомно-силовая микроскопия олигомеров гладкомышечного титина. В поле зрения можно наблюдать нитевидные мономеры белка, которые собираются в олигомеры, формирующие центральное утолщение.

Другие олигомеры имели вид длинных филаментов, длина которых достигала в отдельных случаях 2 мкм и более (Рис. 15). На всем протяжении структур наблюдались периодически расположенные двойные глобулярные утолщения 26 нм высотой. Расстояние между утолщениями составляло 105 нм.

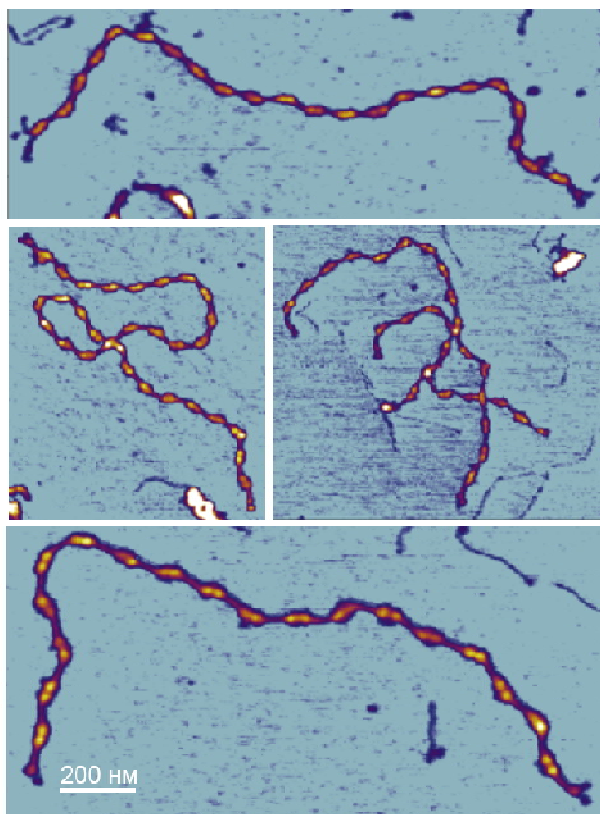


Рис. 15. Атомно-силовая микроскопия нитевидного олигомера гладкомышечного титина.

Первый тип олигомеров (Рис. 14) наблюдался ранее в препаратах титина, выделенного из скелетных мышц кролика (Рис. 8) (Kellermayer et al., 2003). Предполагается, что в центральной части олигомеров собираются концы молекул белка с глобулярной головкой. Эта головка, вероятно, соответствует участку белка, расположенного в М-линии саркомера (Kellermayer et al., 2003). Второй тип олигомеров (Рис. 15) был обнаружен впервые и они, по-видимому, являются характерными для титина гладких мышц. Подобная морфология олигомеров гладкомышечного титина позволяет предположить, что именно в такой форме этот белок находится внутри гладкомышечных клеток.

### 3.6. Исследование вторичной структуры титина до и после агрегации методом кругового дихроизма (КД)

На рисунке 16 представлены данные КД для гладкомышечного титина до и после формирования «глицин-агрегатов». Никаких изменений во вторичной структуре белка при образовании агрегатов обнаружено не было. Белок после хроматографии имел 6.1%  $\alpha$ -спиралей и 40.5%  $\beta$ -складчатых структур, в то время как в агрегированной форме их содержание было 5.5% и 40.2%, соответственно.

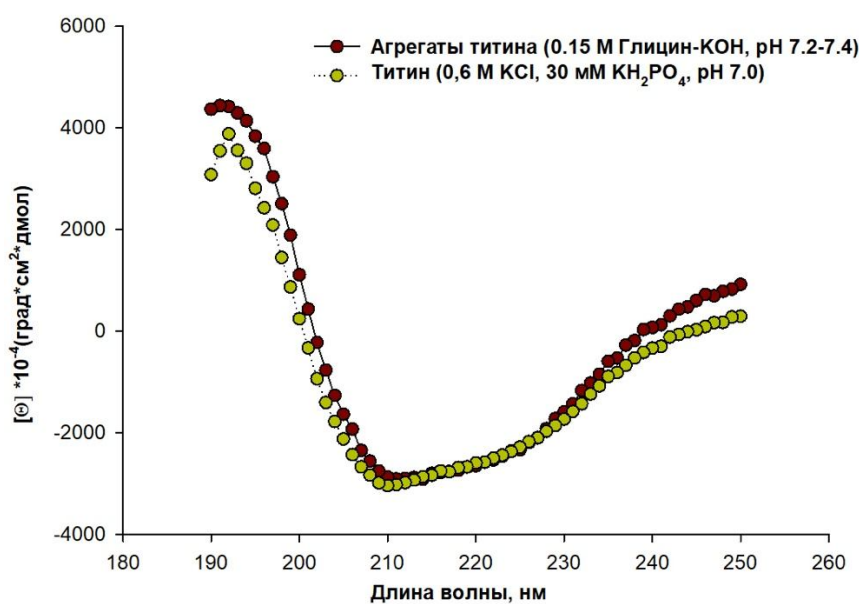


Рис. 16. Спектры кругового дихроизма для неагрегированного белка и «глицин-агрегатов» титина.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высоком содержании неупорядоченной вторичной структуры и  $\beta$ -складчатых структур в молекуле гладкомышечного титина.

Получить данные о вторичной структуре титина для «КСl-агрегатов» не представлялось возможным из-за содержания имидазола в буферной системе. Поэтому вторичная структура «КСl-агрегатов» была исследована методом ИК-спектроскопии. При этом были исследованы и «глицин-агрегаты».



### 3.7. Исследование вторичной структуры титина методом инфракрасной спектроскопии с Фурье преобразованием

На рисунке 17 представлены данные ИК-спектроскопии с Фурье преобразованием, полученные при 20°C и поправленные на спектральный вклад паров воды и CO<sub>2</sub>. Анализ экспериментальных данных был проведен, следуя принципам, описанным в работе (Yang et al., 2015).

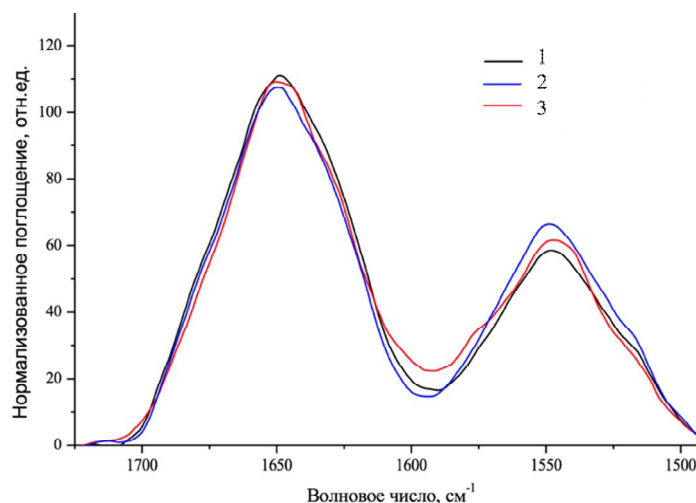


Рис. 17. ИК-Фурье спектры титина и его агрегатов при 20°C. Концентрация белка составляла 36-42 мг/мл. 1 – мономерная форма белка; 2 – «КСI-агрегаты» титина; 3 – «глицин-агрегаты».

Полученные оценки содержания элементов вторичной структуры в образцах титина и его двух типов агрегатов представлены в Таблице 4.

Из полученных данных видно, что в образцах белка до его агрегации содержится большое количество β-складок (31.47±0.47%) и неупорядоченных структур (31.7±1.21%), которое лишь незначительно изменяется при агрегации. Таким образом, данные ИК-спектроскопии с Фурье преобразованием, как и данные КД, показали, что в процессе агрегации титина не происходит изменений во вторичной структуре белка.

Таблица 4. Оценка содержания вторичной структуры в образцах титина и его агрегатов.

Образец	$\alpha$ -спирали, %	$\beta$ -складки, %	Повороты, %	Неупорядоченная структура, %
Мономеры титина	20.38±1.92	31.47±0.47	12.38±0.69	31.7±1.21
«КСI-агрегаты»	22.03±2.22	29.23±2.3	12.96±0.61	31.66±0.72
«Глицин-агрегаты»	20.33±2.13	30.85±1.96	12.42±2.18	31.62±1.03

\* Представлены средние величины содержания элементов вторичной структуры в препаратах и соответствующие величины стандартного отклонения.

### 3.8. Исследование структуры агрегатов титина при помощи дифракции рентгеновских лучей

При помощи дифракции рентгеновских лучей были выявлены следующие рефлексы для «КСI-агрегатов» титина: диффузный 8.19-12.69Å (среднее значение которого равно 9.52Å) и 4.89Å (Рис. 18А); для «глицин-агрегатов» титина этим рефлексам соответствовали значения: 8.24-11.68Å (ср. зн. =9.31Å) и 4.83Å (Рис. 18Б).

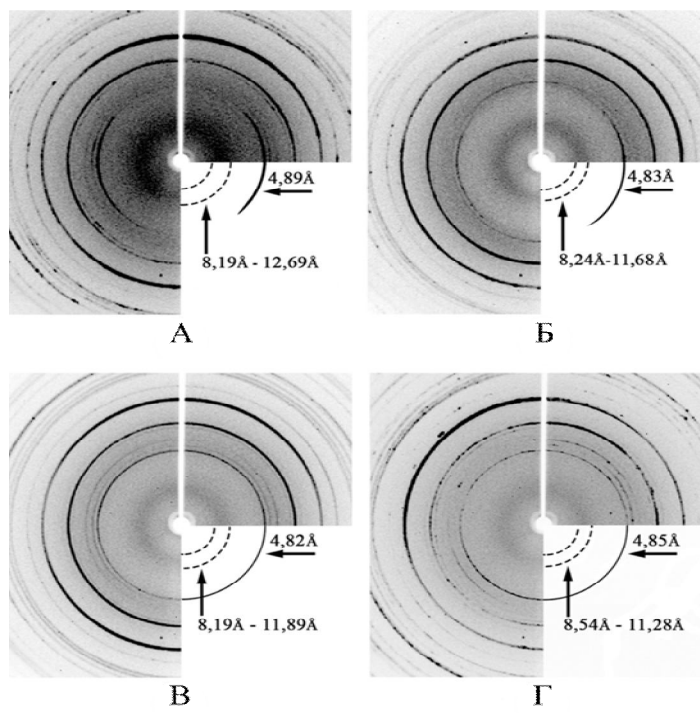


Рисунок 18. Рентгеновская дифракция агрегатов титина гладких мышц после 24 часов агрегации. (А) Значения рефлексов для «КСI-агрегатов»: 26.61, 9.52, 4.89, 4.62, 4.30, 3.83,

3.67, 3.09, 2.85, 2.44 и 2.19 Å. (Б) Значения рефлексов для «глицин-агрегатов»: 28.34, 9.31, 4.83, 4.54, 3.69, 3.08, 2.84, 2.63, 2.56, 2.51, 2.43 и 2.18 Å. (В) Значения рефлексов для «KCl-агрегатов» титина после дезагрегации: 27.32, 10.00, 4.82, 4.66, 4.31, 3.67, 3.10, 2.86, 2.65, 2.52, 2.45 и 2.18 Å. (Г) Значения рефлексов для «глицин-агрегатов» титина после дезагрегации: 28.52, 10.00, 4.85, 4.32, 3.81, 3.67, 3.09, 2.85, 2.63, 2.54 и 2.23 Å.

После помещения агрегатов титина обоих типов в условия с повышенной ионной силой (~0.6) были обнаружены следующие рефлексы: диффузный 8.19-11.89Å (ср. зн. =10.00Å) и 4.82Å для «KCl-агрегатов» (Рис. 18В); диффузный 8.54-11.28Å (ср. зн. =10.00Å) и 4.85Å для «глицин-агрегатов» (Рис. 18Г), соответственно.

Полученные рефлексы соответствуют четвертичной структуре, напоминающей кросс-β, характерной для амилоидных агрегатов.

### 3.9. Флуоресцентный анализ связывания агрегатов титина с красителем Тиофлавином Т

Этот метод применяется для идентификации амилоидных агрегатов в растворе. Считается, что флуоресцентный краситель ТТ селективно локализуется в амилоидных отложениях, что сопровождается увеличением его флуоресценции (Westermarck et al., 1999). В ходе эксперимента мы проводили измерения интенсивности флуоресценции ТТ в присутствии агрегатов титина обоих типов после 3 и 24 часов агрегации. Различий в связывании ТТ с агрегатами титина, сформированными как в течение 3-х, так и 24 часов, выявлено не было. Поэтому ниже представлены графики только для экспериментов с 3-х часовой агрегацией/деагрегацией титина (Рис. 19).

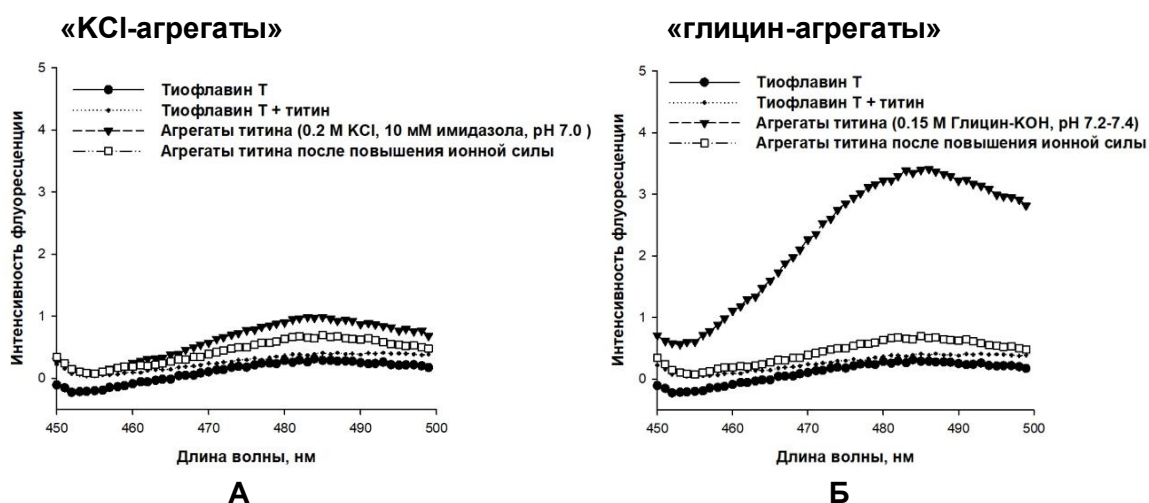


Рис. 19. (А) Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии «KCl-агрегатов» титина через 3 часа агрегации, а также через 3 часа дезагрегации после повышения ионной силы

раствора. (Б) Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии «глицин-агрегатов» титина через 3 часа агрегации, а также через 3 часа дезагрегации после повышения ионной силы раствора.

Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии «КСI-агрегатов» практически не увеличивалась по сравнению с ее интенсивностью в присутствии молекулярной формы титина (Рис. 19А). Значительное увеличение интенсивности флуоресценции ТТ наблюдалось в присутствии «глицин-агрегатов» титина (Рис. 19Б). Через три часа после помещения «глицин-агрегатов» титина в раствор с высокой ионной силой, уровень флуоресценции ТТ снижался до значений, характерных уровню флуоресценции ТТ в присутствии молекулярной формы белка (Рис. 19Б).

Т.о., были выявлены различия между «КСI-агрегатами» и «глицин-агрегатами» титина в способности связываться с флуоресцентным красителем ТТ.

### **3.10. Исследование связывания агрегатов гладкомышечного титина с красителем Конго красным**

Было изучено связывание агрегатов гладкомышечного титина с красителем Конго красным. При помощи спектрофотометрии нами не было обнаружено сдвига спектра поглощения в более длинноволновую область красителя КК в присутствии агрегатов титина обоих типов (Рис. 20), как это характерно при взаимодействии данного красителя с амилоидами (см. Табл. 3).

По данным поляризационной микроскопии наблюдалось желтое/зеленое двулучепреломление в поляризованном свете только в образцах с «глицин-агрегатами» титина как через 3 часа (Рис. 21Б), так и 24 часа (Рис. 21Е) агрегации. Эти данные, указывают на амилоидную природу этих агрегатов.

Подобное двулучепреломление не наблюдалось в образцах с «КСI-агрегатами» (Рис. 21Г,З), а также в препаратах агрегатов обоих типов титина после повышения ионной силы раствора (Рис. 21Г,З). Поскольку «глицин-агрегаты», проявляющие по данным поляризационной микроскопии амилоидные свойства в растворе, содержащем глицин, не проявляли этих свойств в растворе, содержащем КСI (после повышения ионной силы), было решено проверить двулучепреломление используемых буферных растворов.

Было обнаружено, что высушенный буферный раствор (0.15 М глицин-КОН, pH 7.2-7.4) без содержания белка в присутствии КК имел двулучепреломление от желтого до яблочно-зеленого при поляризованном свете (Рис. 22).

Т.о., результаты поляризационной микроскопии, указывающие на «амилоидную» природу «глицин-агрегатов» гладкомышечного титина, являются артефактом, полученным вследствие неспецифического связывания компонентов раствора с красителем.

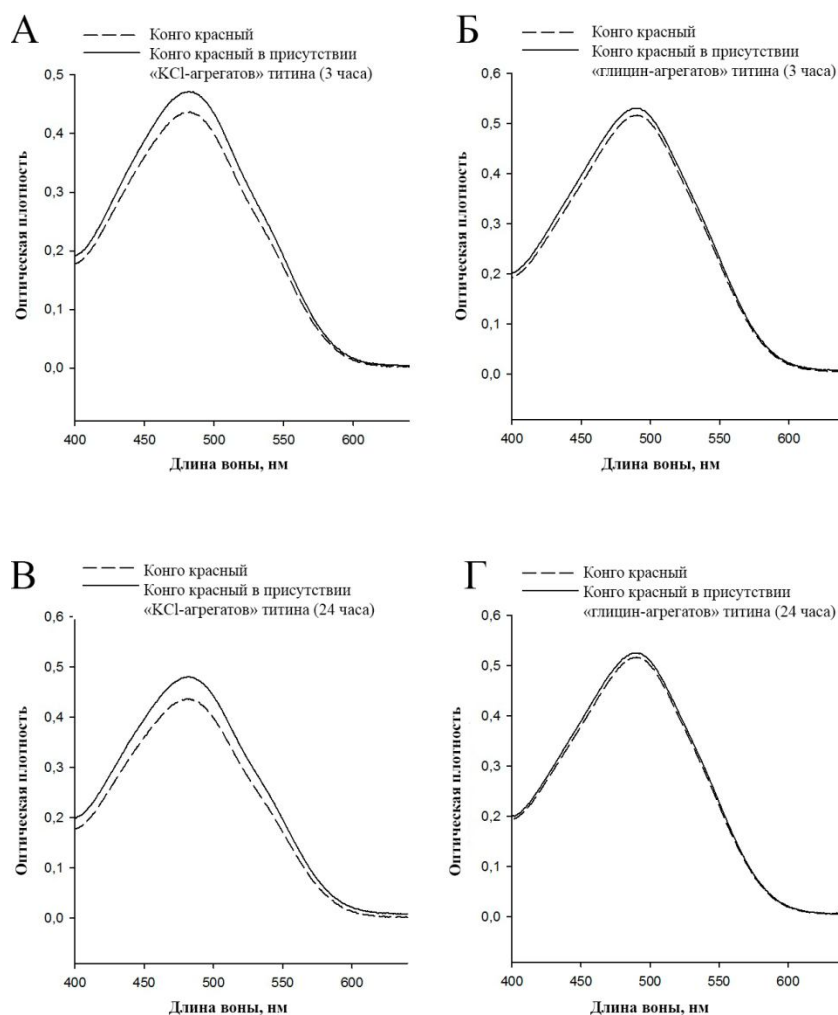


Рис. 20. Спектрофотометрическое исследование связывания агрегатов титина с красителем КК. (А) «КСI- агрегаты» титина, 3 часа агрегации; (Б) «Глицин-агрегаты» титина, 3 часа агрегации. (В) «КСI- агрегаты» титина, 24 часа агрегации; (Г) «Глицин-агрегаты» титина, 24 часа агрегации.

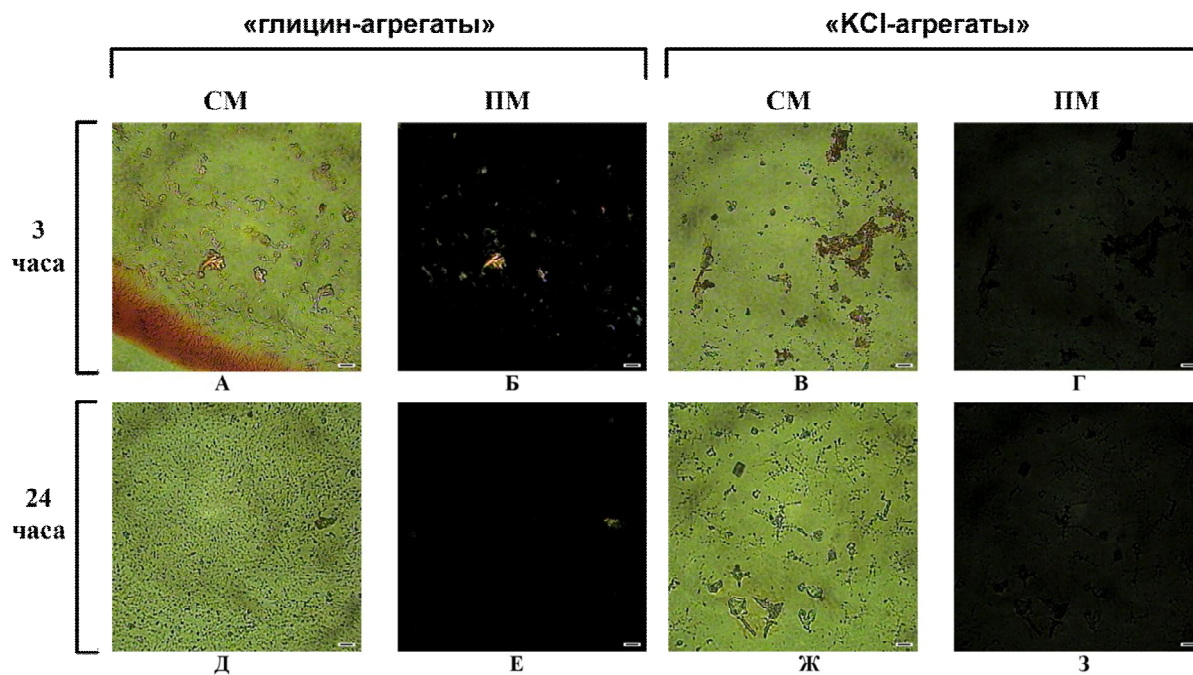


Рис. 21. Поляризационная микроскопия с красителем КК в присутствии «глицин-агрегатов» (А, Б, Д, Е) и «KCl-агрегатов» (В,Г,Ж,З) титина: (А-Г) 3 часа агрегации; (Д-З) 24 часа агрегации. СМ – световая микроскопия, ПМ – микроскопия в поляризованном свете. Шкала 1 мкм.

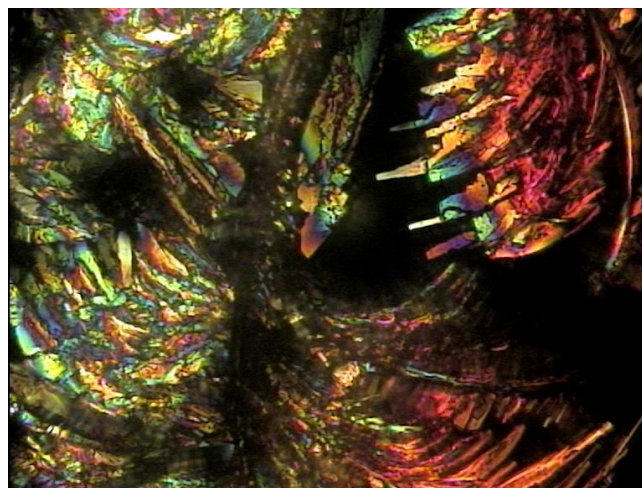


Рис. 22. Микроскопия в поляризованном свете. Высушенная капля буферного раствора, содержащего 0.15 М глицина-КОН, рН 7.2-7.4 и Конго красный. Увеличение 400х.

#### ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе наших экспериментов мы обнаружили способность титина гладких мышц агрегировать *in vitro* в двух условиях: с ионной силой, близкой к физиологическим значениям («KCl-агрегаты») и со сниженными значениями ионной силы («глицин-агрегаты»). При этом методами электронной и атомно-силовой микроскопии мы показали, что оба типа агрегатов имеют аморфную морфологию. Обнаружены были отличия в устойчивости данных агрегатов к растворению при повышении ионной силы (до ~0.6) раствора. В случае «KCl-агрегатов» титина наблюдалась такая способность дезагрегировать до мономеров, что показано методом ДРС (Рис. 10). Агрегация «глицин-агрегатов» титина была необратимой (Рис. 10). Скорость агрегации и в том, и другом случае была достаточно высокой: за 20 минут формировались достаточно крупные агрегаты белка с  $R_h=700$  нм, а после 3 часов эксперимента формировались более крупные агрегаты, размеры которых выходили за рамки чувствительности метода.

При помощи дифракции рентгеновских лучей в препаратах «KCl-агрегатов» и «глицин-агрегатов» обнаружены рефлексы (Рис. 18А,Б), соответствующие упорядоченным  $\beta$ -складчатым структурам, характерным для амилоидных агрегатов (Inouye et al., 1993; Sunde et al., 1997; Makin & Serpell, 2005; Morris & Serpell, 2012). По данным рентгеновской дифракции диффузный рефлекс у «KCl-агрегатов» титина имел бóльший разброс (8.19–12.69Å) (Рис. 18А) по сравнению с таковым у «глицин-агрегатов» (8.24–11.68Å) (Рис. 18Б). Известно, что эти значения соответствуют расстоянию между  $\beta$ -листами. Исходя из этого, можно предположить, что «глицин-агрегаты» имеют более упорядоченную структуру. Схематическое изображение предполагаемой структуры «глицин-агрегатов» титина, построенное на основании данных рентгеновской дифракции, представлено на рисунке 23.

За счет того, что рефлекс, характеризующий расстояние между  $\beta$ -листами является диффузным и кольцевым, мы предполагаем, что сами  $\beta$ -листы не являются строго ориентированными по одной из осей (Рис. 23). Таким образом, можно сделать вывод, что агрегированный титин имеет лишь близкую к кросс- $\beta$  четвертичную структуру. В связи с этим, его агрегаты следует называть амилоидо-подобными, а не амилоидными.

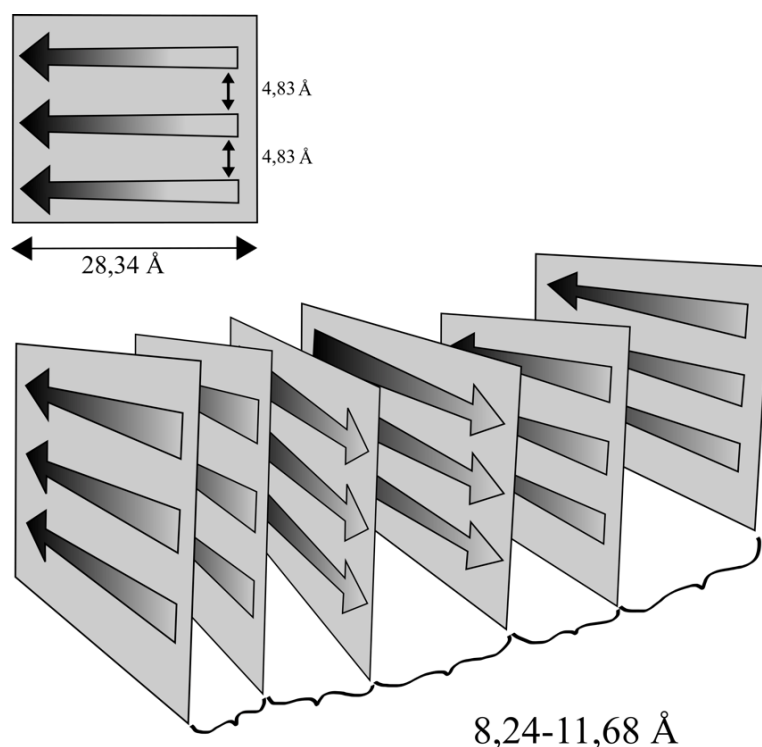


Рис. 23. Схематическое изображение амилоидо-подобной структуры «глицин-агрегатов» титина, построенное на основании данных рентгеновской дифракции (Yakupova et al., 2018). Расстояние между  $\beta$ -листами равняется 4.83Å, ширина  $\beta$ -листов составляет 28.34Å. Расстояние между  $\beta$ -листами варьирует от 8.24 до 11.68Å. Следует обратить внимание на относительно упорядоченное расположение  $\beta$ -стрендов, в которых они ориентированы в одной плоскости, следствием чего является рефлекс 4.83Å.

В результате исследований краситель-связывающих свойств исследуемых агрегатов белка мы обнаружили следующие результаты:

- В присутствии «глицин-агрегатов» титина было обнаружено значительное увеличение флуоресценции ТТ, которое не наблюдалось в препаратах с «КСI-агрегатами» (Рис. 19);
- Отсутствовало смещение спектра поглощения красителя КК от 490 до 512 нм в присутствии агрегатов титина обоих типов (Рис. 20), несмотря на то, что такое смещение считается характерным для взаимодействия красителя с амилоидными агрегатами (Meehan et al., 2004; Frid et al., 2007);
- Было обнаружено желтое/зеленое свечение КК при поляризационной микроскопии в присутствии «глицин-агрегатов», тогда как, в присутствии «КСI-агрегатов» оно отсутствовало (Рис. 21);
- Обнаружено неспецифическое связывание КК с компонентами буферного раствора, содержащего глицин (Рис. 22).



Т.о., результаты проведенных нами исследований показывают, что методы идентификации амилоидных структур *in vitro* на основе использования амилоидных красителей имеют более низкую специфичность в сравнении с рентгеновской дифракцией. На примере наших экспериментов мы показали, что состав буферной системы может приводить к неспецифическому связыванию амилоидных красителей.

Обсуждая характеристики агрегатов титина, полученных в данной работе, следует остановиться на экспериментах по их дезагрегации. По данным ЭМ, АСМ и ДРС наблюдалась дезагрегация «КСI-агрегатов» при помещении их в условия с более высокой ионной силы. Дезагрегация «глицин-агрегатов» в этих условиях не наблюдалась. Можно предположить, что более упорядоченная структура «глицин-агрегатов» лежит в основе их устойчивости к дезагрегации при высокой ионной силе. В этой связи также следует обратить внимание на такую особенность титина как способность образовывать олигомеры в условиях высокой ионной силы раствора.

Мы впервые обнаружили два типа олигомеров титина в колоночных фракциях после очистки белка на хроматографической колонке в растворе с ионной силой более 0.6 (Рис. 14, 15). При этом один тип олигомеров (Рис. 14) морфологически был подобен таковым для титина из поперечно-полосатых мышц, описаным до этого момента в литературе (Рис. 6) (Kellermayer et al., 2003). Келлермайер с соавторами предположили, что в центральной части олигомеров собираются концы молекул титина, содержащие глобулярную головку. Эта головка, предположительно, располагается в М-линии саркомера поперечно-полосатых мышц и, по-видимому, участвует в формировании и поддержании структуры этой зоны саркомеров (Kellermayer et al., 2003). Учитывая эти данные, а также «липкость» головок гладкомышечного титина, можно полагать, что эта часть его молекулы задействована в формировании сократительных структур гладкомышечных клеток.

В поддержку сделанного предположения можно привести и другие наши данные, описывающие второй тип олигомеров гладкомышечного титина. Подобный тип олигомеров не был показан для титина поперечнополосатых мышц и был впервые обнаружен для гладкомышечного титина (Рис. 15). Олигомеры имели вид нитей, связанных друг с другом периодически расположенными двойными глобулярными утолщениями. Нити достигали длины 2 мкм и более. Утолщения на нитях, которые, возможно, являются головками титина, периодически расположены на расстоянии ~105 нм друг от друга. При этом сами утолщения имели размер ~26 нм. Может ли это быть следствием периодически расположенных доменов титина с высокой степенью идентичности или нет, мы пока не можем сказать. Однако, столь поразительная

структурированная морфология филаментов может свидетельствовать в пользу того, что именно в такой форме белок может находиться внутри гладкомышечных клеток и участвовать в формировании сократительных структур.

Обсуждая возможный механизм формирования *in vitro* амилоидо-подобных агрегатов гладкомышечного титина, следует обратить внимание на следующие данные. В 2015 году методом молекулярного моделирования было показано, что при повторном сворачивании тандемов из нескольких доменов титина (иммуноглобулин-подобных доменов I27–I27 и I27–I28), независимо от идентичности последовательностей, более половины всех молекул временно образуют широкий диапазон неправильно свёрнутых конформаций (Borgia et al., 2015). Моделирование также показало, что большая часть таких сформированных структур напоминает внутримолекулярное амилоидо-подобное состояние, которому авторы дали название «внутримолекулярные амилоиды» (Borgia et al., 2015). Учитывая эти данные, можно предположить, что формирование четвертичной структуры, напоминающей кросс- $\beta$ , при агрегации титина может происходить за счет частичного разворота (анфолдинга) его доменов с последующим взаимодействием открытых  $\beta$ -стрендов между соседними доменами и/или доменами соседних молекул белка. Подобные изменения в титине не кажутся уж столь маловероятными, учитывая литературные данные, описывающие значения силы, необходимой для анфолдинга доменов титина. В частности, методом АСМ показано, что анфолдинг Ig/FnIII доменов титина скелетных мышц, происходит при относительно невысоких значениях силы (от  $\sim 30$  до  $\sim 150$  пН) (Bianco et al., 2015; Martonfalvi et al., 2017; Giganti et al., 2018). На

интактных миофибриллах, выделенных из скелетных мышц кролика показано, что частичный анфолдинг отдельных Ig-подобных доменов титина в I-зоне саркомера происходит при значении силы около 10 пН (Rivas-Pardo et al., 2016; Eckels et al., 2019). Таким образом, для анфолдинга доменов титина, как *in situ*, так и *in vitro* требуются относительно небольшие затраты энергии. Авторы вышеуказанных работ предположили, что анфолдинг доменов титина, вполне вероятно, может происходить в работающей мышце. По-видимому, анфолдинг доменов титина мы наблюдаем и в наших *in vitro* экспериментах при изучении агрегации этого белка, выделенного из гладких мышц. Можно предположить, что при агрегации титина, происходит взаимодействие отдельных

его молекул, в результате которого боковые полипептидные цепи отдельных частично развернутых доменов взаимодействуют друг с другом, формируя участки, имеющие амилоидо-подобную структуру. Возможно, что именно этот процесс мы наблюдали при исследовании олигомеров титина, наблюдаемых при выделении из гладких мышц. При этом, агрегация титина может быть обратимой, что показано нами для «КСI-агрегатов» этого белка.

Подобная обратимая агрегация *in vivo* может иметь функциональное значение в клетке, например, играть роль в формировании временных сократительных структур или в придании им большей прочности. В этой связи хорошим подтверждением в пользу сделанного предположения имеются данные о том, что при агрегации титина не происходит изменений во вторичной структуре его молекул, что будет позволять белку проявлять его нативные упруго-эластичные свойства. Полный же анфолдинг доменов титина *in vitro* и *in vivo* маловероятен из-за наличия S-S связей, что предотвращает формирование в клетках необратимых патологических агрегатов этого белка.

Стоит также обратить внимание, что для формирования амилоидных агрегатов большинство белков изменяет свою вторичную структуру и проходит этап разворачивания и обратного сворачивания аминокислотной цепи (см. Таблицу 2), образуя в конечном счете  $\beta$ -кросс структуру. При этом для запуска формирования белками амилоидов *in vitro* применяются достаточно экстремальные условия, такие как кислые или щелочные значения pH и нагревание (см. Таблицу 2). Для молекул титина инициация агрегации вызывается в буферных растворах с физиологическими значениями pH и ионной силой близкой к физиологическим значениям. При этом полученные при использовании методов КД и ИК-спектроскопии данные указывают на то, что при агрегации титина не происходит перестройки вторичной структуры. Более того, агрегация титина происходит за считанные минуты или десятки минут, тогда как другим белкам для агрегации требуются значительно более длительные периоды времени. Всё эти свойства свидетельствуют о том, что гладкомышечный титин имеет заложенную на структурном уровне высокую агрегационную способность, которая, по всей вероятности, может происходить *in vivo* и иметь функциональное значение.

Завершая обсуждение полученных результатов, необходимо обратить внимание на необратимость агрегации «глицин-агрегатов» титина. Эти результаты позволяют сделать допущение о возможности формирования в клетках патологических (необратимых) агрегатов с цитотоксическими свойствами. Амилоидозы мышц известны (Табл. 1) и формирование необратимых агрегатов титина могло бы внести свой вклад в развитие

заболевания. Однако это допущение пока остается не подтвержденным. К настоящему времени еще не существует подтверждений и обратимого, и необратимого типа агрегации титина *in vivo*, как и данных о том, как молекулы титина располагаются в гладкомышечных клетках. Как располагается в клетках гладких мышц актин и миозин тоже до конца не выяснено, а ведь именно эти три основных белка формируют сократительный аппарат мышц. Поэтому дальнейшие исследования в этом направлении позволят приоткрыть завесу тайны о роли агрегации титина в клетках.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя краткий итог полученным результатам, следует отметить следующее. Обнаружена способность титина гладких мышц формировать *in vitro* аморфные амилоидоподобные агрегаты. Показано, что агрегаты титина формируются за относительно короткие временные промежутки и способны к частичной дезагрегации при повышении ионной силы. Агрегация титина протекает без изменений во вторичной структуре белка и без значительного разворачивания полипептидной цепи. Обнаружена способность гладкомышечного титина формировать олигомеры в условиях высокой ионной силы (0.6 М KCl). Полученные результаты указывают на возможность внутриклеточной агрегации/деагрегации титина, что может иметь функциональное значение. Можно ли назвать гладкомышечный титин функциональным амилоидом? Пока сложно дать ответ на этот вопрос, но нельзя исключать функциональную роль агрегации титина в мышечных клетках.

## ВЫВОДЫ

1. Титин гладких мышц желудка курицы агрегирует *in vitro* в течение относительно коротких временных интервалов (20 минут – 3 часа) в двух растворах: с ионной силой, близкой к физиологическим значениям в растворе, содержащем 0.2 М КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0-7.4 и при низких значениях ионной силы в растворе, содержащем 0.15 М Глицин-КОН, рН 7.0-7.4.

2. Агрегаты гладкомышечного титина имеют аморфную морфологию.

3. При агрегации титина не изменяется вторичная структура белка.

4. В агрегатах титина показано наличие амилоидной кросс- $\beta$  структуры.

5. Агрегаты титина, сформированные в растворе, содержащем 0.2 М КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0-7.4, способны частично дезагрегировать при повышении ионной силы раствора.

6. В условиях высокой ионной силы (в растворе, содержащем 0.6 М КСl) гладкомышечный титин формирует олигомеры.

7. На основании полученных результатов сделано следующее предположение: в гладкомышечных клетках возможно формирование функциональных агрегатов, имеющих амилоидную или амилоидо-подобную структуру и способных дезагрегировать.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Бобылёв А.Г., Бобылёва Л.Г., Вихлянцев И.М., Уланова А.Д., Салмов Н.Н., Подлубная З.А. Сравнительное изучение амилоидных свойств мышечных белков и А $\beta$ -пептидов мозга и подходов к разрушению их амилоидов *in vitro* // Биофизика. – 2013. – Т. 58. – № 6. – С. 961–974.
2. Вихлянцев И.М. Полиморфизм тайтина поперечно-полосатых мышц в норме, при адаптации и патологии // Дисс. докт. биол. Наук. – 2011. – Пушино. – Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН.
3. Вихлянцев И.М., Подлубная З.А. Фосфорилирование саркомерных цитоскелетных белков – адаптационный фактор ингибирования сократительной активности мышц при зимней спячке // Биофизика. – 2003. – Т. 48. – №3. – С. 499–504.
4. Вихлянцев И.М., Подлубная З.А. (2012) Новые изоформы тайтина (коннектина) и их функциональная роль в поперечно-полосатых мышцах млекопитающих. Факты и предположения // Успехи биологической химии. – 2012. – Т. 52. – С. 239-280.
5. Вихлянцев И.М., Окунева А.Д., Шпагина М.Д., Шумилина Ю.В., Молочков Н.В., Салмов Н.Н., Подлубная З.А. Изменения изоформного состава, структуры и функциональных свойств тайтина. Об амилоидных свойствах тайтина 17 сердечной мышцы Монгольской песчанки (*Merionesunguiculatus*) после пребывания в условиях реальной невесомости // Биохимия. – 2011. – Т. 76. – С. 1629–1639.
6. Довидченко Н.В., Леонова Е.И., Галзитская О.В. Механизмы образования амилоидных фибрилл // Успехи биологических наук. – 2014. – Т 54. – С. 203–230.
7. Марсагишвили Л.Г., Шпагина М.Д., Емельяненко В.И., Подлубная З.А. Саркомерные белки семейства тайтина образуют амилоиды // Биофизика. – 2005. – Т. 507 – №5. – С. 803–809.
8. Нижников А.А., Антонец К.С., Инге-Вечтомов С.Г. Амилоиды: от патогенеза к функции // Биохимия. – 2015. – Т. 80. – №9. – С. 1356-1375.
9. Подлубная З.А., Марсагишвили Л.Г. Новые амилоидные белки семейства тайтина и их свойства: перспективы для диагностики амилоидозов // Технологии живых систем. – 2008. – Т. 5. – №5-6. – С. 11-21.

10. Селиванова О.М., Галзитская О.В. Структурный полиморфизм и возможные пути образования амилоидных фибрилл на примере белка инсулина // Биохимия. – 2012. – Т. 77. – С. 1478–1490.
11. Abe H., Nakanishi H. Novel observation of a circular dichroism band originating from amyloid fibril // *Anal Sci.* – 2003. – Т. 19. – №1. – С. 171-173.
12. Adamcik J., Mezzenga R. Study of amyloid fibrils via atomic force microscopy // *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* – 2012. – Т. 17. – №6. – С. 369-376.
13. Ali, F., Pare, P.D., Seow, C.Y. Models of contractile units and their assembly in smooth muscle // *Can. J. Physiol Pharmacol.* – 2005. – Т. 83. – С. 825-831.
14. Amini R., Yazdanparast R., Bahramikia S. Apigenin reduces human insulin fibrillation in vitro and protects SK-N-MC cells against insulin amyloids // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2013. – Т. 60. – С. 334-40.
15. Apanikolopoulou K., Mills-Henry I., Thol S.L., Wang Y., Gross A.A.R., Kirschner D.A., Decatur S.M., Kingcorresponding J. Formation of amyloid fibrils in vitro by human  $\gamma$ D-crystallin and its isolated domains // *Mol. Vis.* – 2008. – Т. 14. – С. 81–89.
16. Ayooob J.C., Turnacioglu K.K., Mittal B., Sanger J.M., Sanger J.W. Targeting of cardiac muscle titin fragments to the Z-bands and dense bodies of living muscle and non-muscle cells // *Cell. Motil. Cytoskeleton.* – 2000. – Т. 45. – С. 67– 82.
17. Bang M.L., Centner T., Fornoff F., Geach A.J., Gotthardt M., McNabb M., Witt C.C., Labeit D., Gregorio C.C., Granzier H., Labeit S. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system // *Circ. Res.* – 2001. – Т. 89. – С. 1065– 1072.
18. Bauer H.H., Aebi U., Haner M., Hermann R., Muller M, Merkle H.P. Architecture and polymorphism of fibrillar supramolecular assemblies produced by in vitro aggregation of human calcitonin // *J. Struct. Biol.* – 1995. – Т. 115. – С. 1–15.
19. Berne B.J., Pecora R. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics* // Courier Dover Publications. – 2000. – Mineola.
20. Buyandelger B., Ng K.E., Miodic S., Gunkel S., Piotrowska I., Ku C.H., Knöll R. Genetics of mechanosensation in the heart // *J. Cardiovasc. Transl. Res.* – 2011. – Т. 4. – С. 238–244.
21. Bianco P., Martonfalvi Zs., Naftz K., Koszegi D., Kellermayer M. Titin Domains Progressively Unfolded by Force Are Homogenously Distributed along the Molecule // *Biophysical Journal.* – 2015. – Т. 109. – №2. – С. 340–345.



22. Berthelot K., Lecomte S., Estevez Y., Couлары-Salin B., Bentaleb A., Cullin C., Deffieux A., Peruch F. Rubber elongation factor (REF), a major allergen component in *Hevea brasiliensis* latex has amyloid properties // *PLoS One*. – 2012. – T. 7. – №10. – e48065.
23. Bobylev A.G., Galzitskaya O.V., Fadeev R.S., Bobyleva L.G., Yurshenas D.A., Molochkov N.V., Dovidchenko N.V., Selivanova O.M., Penkov N.V., Podlubnaya Z.A., Vikhlyantsev I.M. Smooth muscle titin forms in vitro amyloid aggregates // *Biosci. Rep.* – 2016. – T. 36. – №3. – e00334.
24. Oberhauser A. F., Marszalek P. E., Carrion-Vazquez M., and Fernandez J. M. Single protein misfolding events captured by atomic force microscopy // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 1999. – T. 6. – C. 1025-1028.
25. Borgia A., Kemplen K.R., Borgia M.B., Soranno A., Shammas S., Wunderlich B., Nettels D., Best R.B., Clarke J., Schuler B. Transient misfolding dominates multidomain protein folding // *Nat. Commun.* – 2015. – T. 6. – C. 8861.
26. Bosch-Morató M., Iriondo C., Guivernau B., Valls-Comamala V., Vidal N., Olivé M., Querfurth H., Muñoz F.J. Increased amyloid  $\beta$ -peptide uptake in skeletal muscle is induced by hyposialylation and may account for apoptosis in GNE myopathy // *Oncotarget*. – 2016. – T. 7. – №12. – C. 13354-13371.
27. Bouchard M., Zurdo J., Nettleton E.J., Dobson C.M., Robinson C.V. Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy // *Protein Sci.* – 2000. – T. 9. – №10. – C. 1960–1967.
28. Branden C, Tooze J. Introduction to protein structure, 2nd ed. New York: Garland Publishing. – 1999.
29. Buxbaum J.N., Linke R.P. A molecular history of the amyloidosis // *J. Mol. Biol.* – 2000. – T. 421. C. 142–159.
30. Calero M., Gasset M. Fourier Transform Infrared and Circular Dichroism Spectroscopies for Amyloid Studies // *Methods in Molecular Biology*. – 2005. – T. 299. – C. 129-151.
31. Capaldi A.P., Kleanthous C., Radford S.E. Im7 folding mechanism: misfolding on a path to the native state // *Nature Struct. Biol.* – 2002. – T. 9. – C. 209-216.
32. Chauveau C., Rowell J., Ferreira A. A rising titan: TTN review and mutation update // *Hum. Mutat.* – 2014. – T. 35. – №9. – C. 1046-1059.
33. Chatani E., Inoue R., Imamura H., Sugiyama M., Kato M., Yamamoto M., Nishida K., Kanaya T. Early aggregation preceding the nucleation of insulin amyloid fibrils as monitored by small angle X-ray scattering. – *Sci. Rep.* – 2015. – T. 5. – C. 15485.

34. Chiti F., Dobson C.M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease // *Annu. Rev. Biochem.* – 2006. – T. 75. – C. 333-366.
35. Chiti F., Dobson C.M. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade // *Annu. Rev. Biochem.* – 2017. – T. 86. – C. 27-68.
36. Claessen D., Rink R., de Jong W., Siebring J., de Vreugd P., Boersma F.G., Dijkhuizen L., Wosten H.A. A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils // *Genes Dev.* – 2003. – T. 17. – C. 1714–1726.
37. Cohen S.I.A., Linse S., Luheshi L.M., Hellstrand E., White D.A., Rajah L., Otzen D.E., Vendruscolo M., Dobson C.M., Knowles T.P.J. Proliferation of amyloid- $\beta$ 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – T. 110. – C. 9758–9763.
38. Cola E.D., Waigh T.A., Trinick J., Tskhovrebova L., Houmeida A., Pyckhout-Hintzen W., Dewhurst C. Persistence Length of Titin from Rabbit Skeletal Muscles Measured with Scattering and Microrheology Techniques // *Biophys. J.* – 2005. – T. 88. – №6. – C. 4095–4106.
39. Conway K.A., Harper J.D., Lansbury P.T. Jr. Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid // *Biochemistry.* – 2000. – T. 39. – №10. – C. 2552-2563.
40. Crespo R., Villar-Alvarez E., Taboada P., Rocha F.A., Damas A.M., Martins P.M. What Can the Kinetics of Amyloid Fibril Formation Tell about Off-pathway Aggregation? // *J. Biol. Chem.* – 2016. – T. 291. – №4. – C. 2018-2032.
41. Crouch P.J., Tew D.J., Du T., Nguyen D.N., Caragounis A., Filiz G., Blake R.E., Trounce I.A., Soon C.P., Loughton K., Perez K.A., Li Q.X., Cherny R.A., Masters C.L., Barnham K.J., White A.R. Restored degradation of the Alzheimer's amyloid-beta peptide by targeting amyloid formation // *Journal of Neurochemistry.* – 2009. – T. 108. – C. 1198–1207.
42. Crowther R.A., Olesen O.F., Smith M.J., Jakes R., Goedert M. Assembly of Alzheimer-like filaments from full-length tau protein // *FEBS Lett.* – 1994. – T. 337. – C. 135-138.
43. Dahal E., Choi M., Alam N., Bhirde A.A., Beaucage S.L., Badano A. (2017) Structural evaluation of an amyloid fibril model using small-angle x-ray scattering // *Phys. Biol.* – 2017. – T. 14. – №4. – 046001.
44. Dobson C.M. (2003) Protein folding and Misfolding // *Nature.* – 2003. – T. 426. – №6968. – C. 884-890.

45. Dobson C.M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2004. – T. 5. – C. 3-16.
46. Dorta-Estremera S.M., Li J., Cao W. Rapid Generation of Amyloid from Native Proteins In vitro // *J. Vis. Exp.* – 2013. – T. 82. – C. 50869.
47. Dumoulin M., Dobson C.M. Probing the origins, diagnosis and treatment of amyloid diseases using antibodies // *Biochimie.* – 2004. – T. 86. – C. 589–600.
48. Eckels E.C., Haldar S., Tapia-Rojo R., Rivas-Pardo J.A., Fernandez J.M. The Mechanical Power of Titin Folding // *Cell Reports.* – 2019. – T. 27. – C. 1836–1847.
49. Elghetany M.T., Saleem A. Methods for staining amyloid in tissues: a review // *Stain Technology.* – 1988. – T. 63. – C. 201–212.
50. Ellis R.J. Protein Folding: Importance of the Anfinsen cage // *Curr. Biol.* – 2003. – T. 13. – R881-R883.
51. Erlich P., Dumestre-Pérard C., Ling W.L., Lemaire-Vieille C., Schoehn G., Arlaud G.J., Thielens N.M., Gagnon J., Cesbron J.Y. Complement protein C1q forms a complex with cytotoxic prion protein oligomers // *J. Biol. Chem.* – 2010. – T. 285. – №25. – C. 19267-19276.
52. Esparza T.J., Wildburger N.C., Jiang H., Gangolli M., Cairns N.J., Bateman R.J., Brody D.L. Soluble Amyloid-beta Aggregates from Human Alzheimer's Disease Brains // *Sci. Rep.* – 2016. – T. 6. – C. 38187.
53. Fändrich M., Fletcher M.A., Dobson C.M. Amyloid fibrils from muscle myoglobin // *Nature.* – 2001. – T. 410. – №6825. – C. 165-166.
54. Fikrlea M., Palecekab T., Kuchynka P., Nemecek E., Bauerovac L., Straub J., Ryšavá R. Cardiac amyloidosis: A comprehensive review // *Cor et vasa.* – 2013. – T. 55. – e60-e75.
55. Fitzpatrick A.W.P., Falcon B., He S., Murzin A.G., Murshudov G., Garringer H.J., Crowther R.A., Ghetti B., Goedert M., Scheres S.H.W. Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease // *Nature.* – 2017. – T. 547. – №7662. – C. 185-190.
56. Fonteyn N., *Responsionum et Curationum Medicinalium* // Amstelodami. – Amsterdam, 1639 (взято из Kyle, 2001).
57. Fowler D.M., Koulov A.V., Alory-Jost C., Marks M.S., Balch W.E., Kelly J.W. Functional Amyloid Formation Within Mammalian Tissue // *PLoS Biol.* – 2006. – T. 4. – №1. – e6.
58. Franchi N., Ballarin L., Peronato A., Cima F., Grimaldi A., Girardello R., de Eguileor M. Functional amyloidogenesis in immunocytes from the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*: Evolutionary perspective // *Dev. Comp. Immunol.* – 2019. – T. 90. – C. 108-120.

59. Frid P., Anisimov S.V., Popovic N. Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases // *Brain Research Reviews*. – 2007. – T. 53. – C. 135–160.
60. Friedreich N., Kekule A. Zur amyloidfrage // *Virch. Arch. path. Anat.* – 1859. – T. 16. – C. 50-65.
61. Freiburg A., Trombitas K., Hell W., Cazorla O., Fougerousse F., Centner T., Kolmerer B., Witt C., Beckmann J.S., Gregorio C.C., Granzier H., Labeit S. Series of exonskipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity // *Circ. Res.* – 2000. – T. 86. – C. 1114–1121.
62. Frydman J. Folding of Newly Translated Proteins in Vivo: The Role of Molecular Chaperones // *Annu. Rev. Biochem.* – 2001. – T. 70. – C. –603-647.
63. Galvin J.E. Detection of Aggregates and Protein Inclusions by Staining of Tissues // *Methods in Molecular Biology*. – 2003. – T. 232. – C. 149-164.
64. Gautel M. Cytoskeletal protein kinases: titin and its relations in mechanosensing // *Pflugers Arch.* – 2011. – T. 462. – C. 119–134.
65. Gautel, M. The sarcomeric cytoskeleton: who picks up the strain? // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2011. – T. 23. – C. 39–46.
66. Genst De E., Dobson C.M. Nanobodies as structural probes of protein misfolding and fibril formation // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – T. 911. – C. 533–558.
67. Genst De E., Messer A., Dobson C.M. Antibodies and protein misfolding: from structural research tools to therapeutic strategies // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – T. 1844. – C. 1907–1919.
68. Georgalis Y., Starikov E.B., Hollenbach B., Lurz R., Scherzinger E., Saenger W., Lehrach H., Wanker E.E. Huntingtin aggregation monitored by dynamic light scattering // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – T. 95. – C. 6118–6121.
69. Gething M.-J., Sambrook J. Protein folding in the cell // *Nature*. – 1992. – T. 355. – C. 33-45.
70. Giganti D., Yan K., Badilla C.L., Fernandez J.M., Alegre-Cebollada J. Disulfide isomerization reactions in titin immunoglobulin domains enable a mode of protein elasticity // *Nature Communications*. – 2018. – T. 9. – C. 185.
71. Goers J., Permyakov S.E., Permyakov E.A., Uversky V.N., Fink A.L. Conformational prerequisites for alpha-lactalbumin fibrillation // *Biochemistry*. – 2002. – T. 41. – №41. – C. 12546-51.

72. Goldschmidt L., Teng P.K., Riek R., Eisenberg D. Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – T. 107. – №8. – C. 3487–3492.
73. Goldsbury C.S., Cooper G.J., Goldie K.N., Muller S.A., Saafi E.L., Gruijters W.T. et al. Polymorphic fibrillar assembly of human amylin // *J. Struct. Biol.* – 1997. – T. 119. – C. 17–27.
74. Goldsbury C.S., Wirtz S., Müller S.A., Sunderji S., Wicki P., Aebi U., Frey P. Studies on the in vitro assembly of A $\beta$ (1-40): implications for the search for A $\beta$  fibril formation inhibitors // *J. of Struct. Biol.* – 2000. – T. 130. – C. 217–231.
75. Gosal W.S., Myers S.L., Radford S.E., Thomson N.H. Amyloid under the atomic force microscope // *Protein Pept. Lett.* – 2006. – T. 13. – №3. – C. 261-270.
76. Granzier H., Labeit S. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease // *Circ. Res.* – 2004. – T. 94. – C. 284–295.
77. Granzier H.L., Labeit S. The giant muscle protein titin is an adjustable molecular spring // *Exerc. Sport Sci. Rev.* – 2006. – T. 34. – C. 50–53.
78. Greenwald J., Riek R. *Biology of Amyloid: Structure, Function, and Regulation* // *Structure.* – 2010. – T. 18. – №10. – C. 1244-1260.
79. Gregorio C.C., Trombitás K., Centner T., Kolmerer B., Stier G., Kunke K., Suzuki K., Obermayr F., Herrmann B., Granzier H., Sorimachi H., Labeit S. The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity // *J. Cell Biol.* – 1998. – T. 143. – C. 1013–1027.
80. Gremer L., Schölzel D., Schenk C., Reinartz E., Labahn J., Ravelli R.B.G., Tusche M., LopezIglesias C., Hoyer W., Heise H., Willbold D., Schröder G.F. Fibril structure of amyloid- $\beta$ (1-42) by cryoelectron microscopy // *Science.* – 2017. – T. 358. – №6359. – C. 116-119.
81. Groenning M., Norrman M., Flink J.M., van de Weert M., Bukrinsky J.T., Schluckebier G., Frokjaer S. Binding mode of thioflavine T in insulin amyloid fibrils // *J. Struct. Biol.* – 2007. – T. 159. – C. 483–497.
82. Grudzielanek S., Smirnovas V., Winter R. Solvation-assisted pressure tuning of insulin fibrillation: from novel aggregation pathways to biotechnological applications // *J. Mol. Biol.* – 2006. – T. 356. – C. 497–509.
83. Guo W., Bharmal S.J., Esbona K., Greaser M.L. Titin diversity--alternative splicing gone wild // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2010. – T. 2010. – C. 753675.

84. Hackman P., Udd B., Bönnemann C.G., Ferreiro A. (2017) Titinopathies International database of titin mutations and phenotypes // Workshop report/Neuromuscular Disorders. – 2017. – T. 27. – C. 396–407.
85. Hamada D., Dobson C.M. A kinetic study of beta-lactoglobulin amyloid fibril formation promoted by urea // Protein Sci. – 2002. – T. 11. – №10. – C. 2417-26.
86. Hammon C., Helenius A. Quality control in the secretory pathway // Curr. Opin. Cell. Biol. – 1995. – T. 7. – C. 523.
87. Hardesty B., Kramer G. Folding of a nascent peptide on the ribosome Prog // Nucleic. Acid Res. Mol. Biol. – 2001. – T. 66. – C. 41-66.
88. Hartl F.U., Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein // Science. – 2002. – T. 295. – C. 1852-1858.
89. Hewetson A., Do H.Q., Myers C., Muthusubramanian A., Sutton R.B., Wylie B.J., Cornwall G.A. Functional Amyloids in Reproduction // Biomolecules. – 2017. – T. 7. – №3. – C. 46.
90. Higuchi H. Changes in contractile properties with selective digestion of connectin (titin) in skinned fibers of frog skeletal muscle // J. Biochem. – 1992. – T. 111. – C. 291–295.
91. Hill S.E., Robinson J., Matthews G., Muschol M. Amyloid Protofibrils of Lysozyme Nucleate and Grow Via Oligomer Fusion // Biophysical Journal. – 2009. – T. 96. – C. 3781–3790.
92. Hore P.J., Winder S.L., Roberts C.H., Dobson C.M. Stopped-flow photo-CIDNP observation of protein folding // J. Am. Chem. Soc. – 1997. – T. 119. – C. 5049-5050.
93. Horowitz R., Kempner E.S., Bisher M.E., Podolsky R.J. A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle // Nature. – 1986. – T. 323. – C. 160–164.
94. Houston F., Andréoletti O. Animal Prion Diseases: the Risks to Human Health // Brain Pathol. – 2019. – T. 29. – №2. – C. 248-262.
95. Howie A.J, Owen-Casey M.P. Discrepancies between descriptions and illustrations of colours in Congo red-stained amyloid, and explanation of discrepant colours // Amyloid. – 2010. – T. 17. – C. 109–117.
96. Hristozova N., Tompa P., Kovacs D. A Novel Method for Assessing the Chaperone Activity of Proteins // PLoS One. – 2016. – T. 11. – №8. – e0161970.
97. Iconomidou V.A., Chryssikos G.D., Gionis V., Galanis A.S., Cordopatis P., Hoenger A., Hamodrakas S.J. Amyloid fibril formation propensity is inherent into the hexapeptidetandemly repeating sequence of the central domain of silk moth chorion proteins of the A-family // J. Struct. Biol. – 2006. – T. 156. – C. 480–488.

98. Inouye H., Fraser P.E., Kirschner D.A. Structure of beta-crystallite assemblies formed by Alzheimer beta-amyloid protein analogues: analysis by x-ray diffraction // *Biophys. J.* – 1993. – T. 64. – №2. – 502-519.
99. Jacques D.A., Trewella J. (2010) Small-angle scattering for structural biology--expanding the frontier while avoiding the pitfalls // *Protein Sci.* – 2010. – T. 19. – №4. – C. 642-657.
100. Jaroniec C., MacPhee C.E., Bajaj V.S., McMahon M.T., Dobson C.M., Griffin R.G. High-resolution molecular structure of a peptide in an amyloid fibril determined by magic angle spinning NMR spectroscopy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – T. 101. – C. 711–716.
101. Jimenez J.L., Nettleton E.J., Bouchard M., Robinson C.V., Dobson C.M., Saibil H.R. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils // *PNAS.* – 2002. – T. 99. – C. 9196–9201.
102. Jiménez J.L., Tennent G., Pepys M., Saibil H.R. Structural diversity of ex vivo amyloid fibrils studied by cryo-electron microscopy // *J. Mol. Biol.* – 2001. – T. 311. – №2. – C. 241–247.
103. Jin, J.P. Titin-thin filament interaction and potential role in muscle function // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2000. – T. 481. – C. 319–333.
104. Karamanos T.K., Kalverda A.P., Thompson G.S., Radford S.E. Mechanisms of amyloid formation revealed by solution NMR // *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* – 2015. – T. 0. – C. 86–104.
105. Karsai A., Mártonfalvi Z., Nagy A., Grama L., Penke B., Kellermayer M.S. Mechanical manipulation of Alzheimer's amyloid beta1-42 fibrils // *J. Struct. Biol.* – 2006. – T. 155. – №2. – C. 316-26.
106. Kaye R., Glabe C.G. Conformation-dependent anti-amyloid oligomer antibodies // *Methods Enzymol.* – 2006. – T. 413. – C. 326-344.
107. Kaye R., Head E., Sarsoza F., Saing T., Cotman C.W., Necula M., Margol L., Wu J., Breydo L., Thompson J.L., Rasool S., Gurlo T., Butler P., Glabe C.G. Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers // *Mol. Neurodegener.* – 2007. – T. 2. – C. 18.
108. Kelényi G. On the histochemistry of azo group-free thiazole dyes // *J. Histochem. Cytochem.* – 1967. – T. 15. – №3. – C. 172–180.

109. Kellermayer M.S., Bustamante C., Granzier H.L. (Mechanics and structure of titin oligomers explored with atomic force microscopy // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2003. – T. 1604. – №2. – C. 105-114.
110. Kim K., Keller T.C. 3rd. Smitin, a novel smooth muscle titinlike protein, interacts with myosin filaments in vivo and in vitro // *J. Cell. Biol.* – 2002. – T. 156. – №1. – C. 101-111.
111. Kimura S., Maruyama K., Huang Y.P. Interactions of muscle beta-connectin with myosin, actin, and actomyosin at low ionic strengths // *Biochem. J.* – 1984. – T. 96. – C. 499–506.
112. Kodaka M. Requirements for generating sigmoidal time-course aggregation in nucleation-dependent polymerization model // *Biophys. Chem.* – 2004. – T. 107. – C. 243-253.
113. Konno T., Murata K., Nagayama K. Amyloid-like aggregates of a plant protein: a case of a sweet-tasting protein, monellin // *FEBS Lett.* – 1999. – T. 454. – №1-2. – C. 122-126.
114. Koretz J.F., Irving T.C., Wang K. Filamentous Aggregates of Native Titin and Binding of C-protein and AMP-deaminase // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* – 1993. – T. 304. – №2. – C. 305-309.
115. Kötter, S., Unger, A., Hamdani, N., Lang, P., Vorgerd, M., Nagel-Steger, L., Linke, W.A. Human myocytes are protected from titin aggregation-induced stiffening by small heat shock proteins // *J. Cell Biol.* – 2014. – T. 204. – №2. – C. 187–202.
116. Krüger M., Linke W.A. The Giant Protein Titin: A Regulatory Node That Integrates Myocyte Signaling Pathways // *J. Biol. Chem.* – 2011. – T. 286. – №12. – C. 9905–9912.
117. Kulke M., Fujita-Becker S., Rostkova E., Neagoe C., Labeit D., Manstein D.J., Gautel M., Linke W.A. Interaction between PEVK-titin and actin filaments: origin of a viscous force component in cardiac myofibrils // *Circ. Res.* – 2001. – T. 89. – C. 874–881.
118. Kumar S., Sharma P., Arora K., Raje M., Guptasarma P. Calcium binding to beta-2-microglobulin at physiological pH drives the occurrence of conformational changes which cause the protein to precipitate into amorphous forms that subsequently transform into amyloid aggregates // *PLoS ONE.* – 2014. – T. 9. – №4. – e95725.
119. Kushnirov V.V., Vishnevskaya A.B., Alexandrov I.M., Ter-Avanesyan M.D. Prion and Nonprion Amyloids // *Prion.* – 2007. – T. 1. – №3. – C. 179–184.
120. Kyle R.A. Amyloidosis: a convoluted story // *Br. J. Haematol.* – 2001. – T. 114. – №3. – C. 529-538.
121. Labeit S., Kolmerer B., Linke W.A. The giant protein titin. Emerging roles in physiology and pathophysiology // *Circ. Res.* – 1997. – T. 80. – №2. – C. 290-294.



122. Labeit S., Lahmers S., Burkart C., Fong C., McNabb M., Witt S., Witt C., Labeit D., Granzier H. (2006) Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins // *J. Mol. Biol.* – 2006. – T. 362. – №4. – C. 664-681.
123. Lai Z., Colón W., Kelly J.W. The acid-mediated denaturation pathway of transthyretin yields a conformational intermediate that can self-assemble into amyloid // *Biochemistry.* – 1996. – T. 35. – №20. – C. 6470-6482.
124. Lange S., Xiang F., Yakovenko A., Vihola A., Hackman P., Rostkova E., Kristensen J., Brandmeier B., Franzen G., Hedberg B., Gunnarsson L.G., Hughes S.M., Marchand S., Sejersen T., Richard I., Edström L., Ehler E., Udd B., Gautel M. The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover // *Science.* – 2005. – T. 308. – C. 1599–1603.
125. Lee E.J., Peng J., Radke M., Gotthardt M., Granzier H.L. Calcium sensitivity and the Frank-Starling mechanism of the heart are increased in titin N2B region-deficient mice // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2010. – T. 49. – C. 449–458.
126. Leung N., Nasr S.H., Sethi S. How I treat amyloidosis: the importance of accurate diagnosis and amyloid typing // *Blood.* – 2012. – T. 120. – C. 3206–3213.
127. LeVine H. III Thioflavin T interaction with amyloid  $\beta$ -sheet structures Amyloid // *Int. J. Exp. Clin. Invest.* – 1995. – T. 2. – C. 1–6.
128. LeWinter M.M., Granzier H. Cardiac titin: a multifunctional giant // *Circulation.* – 2010. – T. 121. – C. 2137–2145.
129. Li, H., Linke, W.A., Oberhauser, A.F., Carrion-Vazquez, M., Kerkvliet, J.G., Lu, H. et al. Reverse engineering of the giant muscle protein titin // *Nature.* – 2002. – T. 418. – C. 998–1002.
130. Li Y., Zhao C., Luo F., Liu Z., Gui X., Luo Z., Zhang X., Li D., Liu C., Li X. Amyloid fibril structure of  $\alpha$ -synuclein determined by cryo-electron microscopy // *Cell Res.* – 2018. – T. 28. – №9. – C. 897-903.
131. Liewluck T., Milone M. Characterization of isolated amyloid myopathy // *Eur. J. Neurol.* – 2017. – T. 24. – №12. – C. 1437-1445.
132. Lindberg D.J., Wenger A., Sundin E., Wesén E., Westerlund F., Esbjörner E.K. Binding of Thioflavin-T to Amyloid Fibrils Leads to Fluorescence Self-Quenching and Fibril Compaction // *Biochemistry.* – 2017. – T. 56. – №16. – C. 2170-2174.

133. Lindgren M., Sörgjerd K., Hammarström P. Detection and characterization of aggregates, prefibrillar amyloidogenic oligomers, and protofibrils using fluorescence spectroscopy // *Biophys. J.* – 2005. – T. 88. – №6. – C. 4200-4212.
134. Linke R.P. Congo Red Staining of Amyloid: Improvements and Practical Guide for a More Precise Diagnosis of Amyloid and the Different Amyloidoses. In: Uversky V.N., Fink A.L. (eds) *Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Diseases.* – 2006. – Protein Reviews, 4. Springer, Boston, MA.
135. Linke W. Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress sensing and mechanical dysfunction // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – T. 77. – C. 637–648.
136. Linke W.A., Krüger M. The giant protein titin as an integrator of myocyte signaling pathways // *Physiology (Bethesda).* – 2010. – T. 25. – C. 186–198.
137. Linton P.J., Gurney M., Sengstock D., Mentzer R.M. Jr., Gottlieb R.A. This old heart: cardiac aging and autophagy // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2015. – T. 8. – C. 44-54
138. Lomakin A., Teplow D.B., Kirschner D.A., Benedek G.B. Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid  $\beta$ -protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – T. 94. – C. 7942-7947.
139. Maezawa I., Hong H.S., Liu R., Wu C.Y., Cheng R.H., Kung M.P., Kung H.F., Lam K.S., Oddo S., Laferla F.M., Jin L.W. Congo red and thioflavin-T analogs detect A $\beta$  oligomers // *J. Neurochem.* – 2008. – T. 104. – №2. – C. 457-468.
140. Maher P., Cox G.F., Singer S.J. Zeugmatin: A new high molecular weight protein associated with Z-lines in adult and early embryonic striated muscle // *J. Cell Biol.* – 1985. – T. 101. – C. 1871-1883.
141. Makin O.S., Serpell L.C. X-ray diffraction studies of amyloid structure // *Methods Mol. Biol.* – 2005. – T. 299. – C. 67-80.
142. Markowitz G.S. Dysproteinemia and the kidney // *Adv. Anat. Pathol.* – 2004. – T. 11. – C. 49–63.
143. Marsagishvili L.G., Podlubnaya Z.A. Amyloidogenic properties of X-, C- and H-proteins of sarcomeric cytoskeleton // *J. Muscle Res. & Cell. Motil.* – 2005. – T. 26. – №1. – C. 78–79.
144. Martonfalvi Zs., Bianco P., Naftz K., Ferenczy G.G., Kellermayer M. Force generation by titin folding // *Protein science.* – 2017. – T. 26. – C. 1380—1390.
145. Matouschek A. Protein unfolding—an important process in vivo? // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2001. – T. 13. – C. 98-104.

146. McCubbin W.D., Kay C.M., Narindrasorasak S., Kisilevsky R. Circular-dichroism studies on two murine serum amyloid A proteins // *Biochemical Journal*. – 1988. – T. 256. – №3. – C. 775-783.
147. Meehan S., Berry Y., Luisi B., Dobson C.M., Carver J.A., MacPhee C.E. Amyloid fibril formation by lens crystallin proteins and its implications for cataract formation // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – T. 279. – C. 3413–3419.
148. Merlini G., Bellotti, V. (2003) Molecular mechanisms of amyloidosis // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – T. 349. – C. 583–596
149. Monsellier E., Chiti F. Prevention of amyloid-like aggregation as a driving force of protein evolution // *EMBO Rep.* – 2007. – T. 8. – C. 737–742.
150. Mok Y.F., Howlett G.J. Sedimentation velocity analysis of amyloid oligomers and fibrils // *Methods Enzymol.* – 2006. – T. 413. – C. 199-217.
151. Mok Y.F., Howlett G.J., Griffin M.D. Sedimentation Velocity Analysis of the Size Distribution of Amyloid Oligomers and Fibrils // *Methods in Enzymology*. – 2015. – T. 562. – C. 241-256.
152. Morris K.L., Serpell L.C. X-ray fibre diffraction studies of amyloid fibrils, *Methods Mol. Biol.* – 2012. – T. 849. – C. 121-135.
153. Murakami K., Tokuda M., Suzuki T., Irie Y., Hanaki M., Izuo N., Monobe Y., Akagi K., Ishii R., Tatebe H., Tokuda T., Maeda M., Kume T., Shimizu T., Irie K. Monoclonal antibody with conformational specificity for a toxic conformer of amyloid  $\beta$ 42 and its application toward the Alzheimer's disease diagnosis // *Sci. Rep.* – 2016. – T. 6. – C. 29038.
154. Naiki H., Higuchi K., Hosokawa M., Takeda T. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1 // *Anal. Biochem.* – 1989. – T. 177. – №2. – C. 244-9.
155. Necula M., Chirita C.N., Kuret J. Rapid anionic micelle-mediated alpha-synuclein fibrillization in vitro // *J. Biol. Chem.* – 2003. – T. 278. – №47. – C.46674-46680.
156. Oliveira C.L., Behrens M.A., Pedersen J.S., Erlacher K., Otzen D., Pedersen J.S. A SAXS study of glucagon fibrillation // *J. Mol. Biol.* – 2009. – T. 387. – №1. – C. 147-161.
157. Ottenheijm C.A., Granzier H. (2010) Role of titin in skeletal muscle function and disease // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2010. – T. 682. – C. 105–122.
158. Otzen D., Nielsen P.H. We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2008. – T. 65. – №6. – C. 910–927.

159. Peckham M., Young P., Gautel M. Constitutive and variable regions of Z-disk titin/connectin in myofibril formation: a dominant-negative screen // *Cell Struct. Funct.* – 1997. – T. 22. – C. 95–101.
160. Pérez M., Valpuesta J.M., Medina M., de Garcini E.M., Avila J. Polymerization of  $\tau$  into Filaments in the Presence of Heparin: The Minimal Sequence Required for  $\tau$   $\square$   $\tau$  Interaction // *Journal of neurochemistry.* – 1996. – T. 67. – C. 1183–1190.
161. Persichilli C., Hill S.E., Mast J., Muschol M. Does Thioflavin-T Detect Oligomers Formed During Amyloid Fibril Assembly // *Biophysical Journal.* – 2011. – T. 100. – №3. – 538a.
162. Pham C.L., Mok Y.F., Howlett G.J. Sedimentation velocity analysis of amyloid fibrils // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – T. 752. – C. 179-96.
163. Podlubnaya Z.A., Shpagina M.D., Vikhlyantsev I.M., Malyshev S.L., Udaltsov S.N., Ziegler C., Beinbrech G. Comparative electron microscopic study on projectin and titin binding to F-actin // *Insect Biochem. Mol. Biol.* – 2003. – T. 33. – №8. – C. 789-793.
164. Prado L. G., Makarenko I., Andresen C., Krüger M., Opitz C. A., Linke W. A. Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscles // *J. Gen. Physiol.* – 2005. – T. 126. – C. 461–480.
165. Prusiner S.B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie // *Science.* – 1982. – T. 216. – C. 136–144.
166. Puchner E.M., Alexandrovich A., Kho A.L., Hensen U., Schäfer L.V., Brandmeier B., Gräter F., Grubmüller H., Gaub H.E., Gautel M. Mechanoenzymatics of titin kinase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2008. – T. 105. – C. 13385–13390.
167. Pulze L., Bassani B., Gini E., D'Antona P., Grimaldi A., Luini A., Marino F., Noonan D.M., Tettamanti G., Valvassori R., de Eguileor M. NET amyloidogenic backbone in human activated neutrophils // *Clin. Exp. Immunol.* – 2016. – T. 183. – №3. – C. 469-479.
168. Radford S.E., Dobson C.M. From computer simulations to human disease: emerging themes in protein folding // *Cell.* – 1999. – T. 97. – C. 291-298.
169. Ranganathan S., Singh P.K., Singh U., Singru P.S., Padinhateeri R., Maji S.K. Molecular interpretation of ACTH- $\beta$ -endorphin coaggregation: relevance to secretory granule biogenesis // *PLOS One.* – 2012. – T. 7. – №3. – C. 1-12.
170. Rivas-Pardo J.A., Eckels E.C., Popa I., Kosuri P., Linke W.A., Fernandez J.M. Work Done by Titin Protein Folding Assists Muscle Contraction // *Cell Reports.* – 2016. – T. 14. – C. 1339–1347.

171. Romling U., Bian Z., Hammar M., Sierralta W.D., Normark S. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation // *J. Bacteriol.* – 1998. – T. 180. – C. 722–731.
172. Ross, M.H., Pawlina, W. *Histology: A text and atlas: with correlated cell and molecular biology* // Baltimore, MD. – 2006. – Lippincott Williams & Wilkins.
173. Sahoo B., Drombosky K.W., Wetzal R. *Fluorescence Correlation Spectroscopy: A Tool to Study Protein Oligomerization and Aggregation In Vitro and In Vivo*, *Methods Mol. Biol.* – 2016. – T. 1345. – C. 67-87.
174. Sarsoza F., Saing T., Kayed R., Dahlin R., Dick M., Broadwater-Hollifield C., Mobley S., Lott I., Doran E., Gillen D., Anderson-Bergman C., Cribbs D.H., Glabe C., Head E. A fibril-specific, conformation-dependent antibody recognizes a subset of A $\beta$  plaques in Alzheimer disease, Down syndrome and Tg2576 transgenic mouse brain // *Acta Neuropathol.* – 2009. – T. 118. – №4. – C. 505-517.
175. Scheidt H.A., Morgado I., Rothemund S., Huster D., Fändrich M. Solid-state NMR spectroscopic investigation of A $\beta$  protofibrils: implication of a  $\beta$ -sheet remodeling upon maturation into terminal amyloid fibrils // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2011. – T. 50. – C. 2837–2840.
176. Schmidt C. Ueber das sogenannte «thierische Amyloid» (Substanz der corpuscula Amylacea) // *Ann. Chem. Pharm.* – 1859. – T. 110. – C. 250-254.
177. Schmidt M., Sachse C., Richter W., Xu C., Fändrich M., Grigorieffa N. Comparison of Alzheimer A $\beta$ (1–40) and A $\beta$ (1–42) amyloid fibrils reveals similar protofilament structures // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2009. – T. 106. – №47. – C. 19813–19818.
178. Schuck P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling // *Biophys. J.* – 2000. – T. 78. – C. 1606–1619.
179. Scoffone VC1, Trespidi G2, Chiarelli LR3, Barbieri G4, Buroni S5. Quorum Sensing as Antivirulence Target in Cystic Fibrosis Pathogens // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – T. 20. – №8. – C. 1838.
180. Sethi S., Theis J.D., Leung N., Dispenzieri A., Nasr S.H., Fidler M.E., Cornell L.D., Gamez J.D., Vrana J.A., Dogan A. Mass spectrometry-based proteomic diagnosis of renal immunoglobulin heavy chain amyloidosis // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2010. – T. 5. – №12. – C. 2180-2187.
181. Si K., Lindquist S., Kandel E.R. A neuronal isoform of the *Aplysia* CPEB has prion-like properties // *Cell.* – 2003. – T. 115. – C. 879–891.

182. Sipe J.D., and Cohen A.S. Review: history of amyloid Fibril // *J. Struct. Biol.* – 2000. – T. 130. – C. 88–89.
183. Slotta U., Hess S., Spiess K., Stromer T., Serpell L., Scheibel T. Spider silk and amyloid fibrils: a structural comparison // *Macromol. Biosci.* – 2007. – T. 7. – C. 183–188.
184. Smith B.C., (ed.) *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. CRC Press, Boca Raton, Florida. – 1995.
185. Speed M.A., King J., Wang D.I.C. Polymerization mechanism of polypeptide chain aggregation // *Biotechnol. Bioeng.* – 1997. – T. 54. – C. 333-343.
186. Sreerama N., Woody R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set // *Anal. Biochem.* – 2000. – T. 287. – C. 252–260.
187. Stahl S.W., Puchner E.M., Alexandrovich A., Gautel M., Gaub H.E. A conditional gating mechanism assures the integrity of the molecular force-sensor titin kinase // *Biophys. J.* – 2011. – T. 101. – C. 1978–1986.
188. Stefani M., Dobson C.M. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution // *J Mol Med (Berl)*. – 2003. – T. 81. – C. 678-699.
189. Streets A.M., Sourigues Y., Kopito R.R., Melki R., Quake S.R. Simultaneous Measurement of Amyloid Fibril Formation by Dynamic Light Scattering and Fluorescence Reveals Complex Aggregation Kinetic // *PLoS One*. – 2013. – T. 8. – №1. – e54541.
190. Stine W.B. Jr., Dahlgren K.N., Krafft G.A., LaDu M.J. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* – 2003. – T. 278. – C. 11612–11622.
191. Strege R.J., Saeger W., Linke R. Diagnosis and immunohistochemical classification of systemic amyloidoses. Report of 43 cases in an unselected autopsy series // *Virchows Arch.* – 1998. – T. 433. – C. 19–27.
192. Stuart B. (ed.) *Biological applications of infrared spectroscopy*. David J. Ando Ed., ACOL series, John Wiley & Sons, New York. – 1997.
193. Sunde M., Serpell L., Bartlam M., Fraser P.E., Pepys M., Blake C.C. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction // *J. Mol. Biol.* – 1997. – T. 273. – C. 729–739.
194. Suzuki J., Kimura S., Maruyama K. Electron microscopic filament lengths of connection and its fragments // *J. Biochem.* – 1994. – T. 116. – C. 406–410.

195. Swaminathan R., Ravi V.K., Kumar S., Kumar M.V., Chandra N. Lysozyme: a model protein for amyloid research // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* – 2011. – T. 84. – C. 63-111.
196. Timchenko, A., Timchenko, M., Shinjo, M., Kihara, H. SAXS study of N177S mutant of BenceJones protein BIF // *Photon Factory Activity Report.* – 2015. – T. 32. – C. 366.
197. Tjernberg L.O., Pramanik A., Björling S., Thyberg P., Thyberg J., Nordstedt C., Berndt K.D., Terenius L., Rigler R. Amyloid beta-peptide polymerization studied using fluorescence correlation spectroscopy // *Chem. Biol.* – 1999. – T. 6. – №1. – C. 53-62.
198. Tomski S.J., Murphy R.M. Kinetics of aggregation of synthetic beta-amyloid peptide // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1992. – T. 294. – C. 630-638.
199. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Pros. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1979. – T. 76. – №9. – C. 4350-4354.
200. Toyama B.H., Weissman J.S. Amyloid Structure: Conformational Diversity and Consequences // *Annu. Rev. Biochem.* – 2011. – T. 80. – C. 557–585.
201. Tskhovrebova L., Trinick J. Direct visualization of extensibility in isolated titin molecules // *J. Mol. Biol.* – 1997. – T. 265. – C. 100–106.
202. Tskhovrebova L., Trinick J. Muscle disease: a giant feels the strain // *Nat. Med.* – 2005. – T. 11. – C. 478–479.
203. Tskhovrebova L., Trinick J. Roles of Titin in the Structure and Elasticity of the Sarcomere // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2010. – T. 2010. – C. 612482.
204. Tycko R. Solid-state NMR studies of amyloid fibril structure // *Annu. Rev. Phys. Chem.* – 2011. – T. 62. – C. 279-299.
205. Uversky V.N., Karnoup A.S., Khurana R., Segel D.J., Doniach S., Fink A.L. Association of partially folded intermediates of staphylococcal nuclease induces structure and stability // *Protein Sci.* – 1999. – T. 8. – C. 161-173.
206. Uversky V.N., Fink A.L. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – T. 1698. – №2. – C.131-153.
207. Uversky V.N. The triple power of D<sup>3</sup>: protein intrinsic disorder in degenerative diseases // *Front. Biosci.* – 2014. – T. 19. – C. 181-258.
208. Van der Ven P.F., Bartsch J.W., Gautel M., Jockusch H., Furst D.O. A functional knock-out of titin results in defective myofibril assembly // *J. Cell Sci.* – 2000. – T. 113. – C. 1405–1414.

209. Vassar P.S., C.F.A. Culling, Fluorescent stains with special reference to amyloid and connective tissues // *Arch. Pathol.* – 1959. – T. 68. – №1959. – C. 487–494.
210. Venyaminov S., Prendergast F.G. Water (H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O) molar absorptivity in the 1000-4000 cm<sup>-1</sup> range and quantitative infrared spectroscopy of aqueous solutions // *Anal. Biochem.* – 1997. – T. 248. – №2. – C. 234-245.
211. Vestergaard B., Groenning M., Roessle M., Kastrup J.S., van de Weert M., Flink J.M., Frokjaer S., Gajhede M., Svergun D.I. A Helical Structural Nucleus Is the Primary Elongating Unit of Insulin Amyloid Fibrils // *PLoS Biol.* – 2007. – T. 5. – №5. – e134.
212. Voelkel T., Linke W. Conformation-regulated mechanosensory control via titin domains in cardiac muscle // *Eur. J. Physiol.* – 2011. – T. 4. – C. 143–154.
213. Vogler T.O., Wheeler J.R., Nguyen E.D., Hughes M.P., Britson K.A., Lester E., Rao B., Betta N.D., Whitney O.N., Ewachiw T.E., Gomes E., Shorter J., Lloyd T.E., Eisenberg D.S., Taylor J.P., Johnson A.M., Olwin B.B., Parker R. TDP-43 and RNA form amyloid-like myo-granules in regenerating muscle // *Nature.* – 2018. – T. 563. – №7732. – C. 508-513.
214. Wang S.S., Liu K.N., Han T.C. Amyloid fibrillation and cytotoxicity of insulin are inhibited by the amphiphilic surfactants // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – T. 1802. – №6. – C. 519-530.
215. Westermark G.T., Johnson K.H., Westermark P. Staining methods for identification of amyloid in tissue // *Methods Enzymol.* – 1999. – T. 309. – C. 3-25.
216. Westermark G.T., Ihse E., Westermark P. Development of Mouse Monoclonal Antibodies Against Human Amyloid Fibril Proteins for Diagnostic and Research Purposes // *Methods Mol. Biol.* – 2018. – T. 1779. – C. 401-414.
217. Wickner R.B., Edskes H.K., Bateman D.A., Kelly A.C., Gorkovskiy A., Dayani Y., Zhou A. Amyloids and yeast prion biology // *Biochemistry.* – 2013. – T. 52. – C. 1514–1527.
218. Wösten H.A., de Vocht M.L. Hydrophobins, the fungal coat unraveled. *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – T. 1469. – C. 79–86.
219. Wright C. F., Teichmann S. A., Clarke J., Dobson C. M. The importance of sequence diversity in the aggregation and evolution of proteins // *Nature.* – 2005. – T. 438. – C. 878–881.
220. Yamada M., Tsukagoshi H., Hatakeyama S. Skeletal muscle amyloid deposition in AL- (primary or myeloma-associated), AA- (secondary), and prealbumin-type amyloidosis // *J. Neurol. Sci.* – 1988. – T. 85. – №2. – C. 223-232.



221. Yang H.Y., Yang S.N., Kong J.L., Dong A.C., Yu S.N. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy // *Nat. Protoc.* – 2015. – T. 10. – №3. – C. 382–396.
222. Yakupova E.I., Vikhlyantsev I.M., Lobanov M.Y., Galzitskaya O.V., Bobylev A.G. On amyloid properties of titin // *Biochemistry (Moscow)*. – 2017. – T. 82. – №13. – C. 1675-1685.
223. Yakupova E.I., Vikhlyantsev I.M., Bobyleva L.G., Penkov N.V., Timchenko A.A., Timchenko M.A., Enin G.A., Khutzian S.S., Selivanova O.M., Bobylev A.G. Different amyloid aggregation of smooth muscles titin in vitro // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2018. – T. 36. – №9. – C. 2237-2248.
224. Yakupova E.I., Bobyleva L.G., Vikhlyantsev I.M., Bobylev A.G. Congo red and amyloids: History and relationship // *Biosci. Rep.* – 2018. – T. 39. – №1. – BSR20181415.
225. Zhang, W., Gunst, S.J. Interactions of airway smooth muscle cells with their tissue matrix: implications for contraction // *Proc. Am. Thorac. Soc.* – 2008. – T. 5. – №1. – C. 32-39.
226. Zou Y., Li Y., Hao W., Hu X., Ma G. Parallel  $\beta$ -Sheet Fibril and Antiparallel  $\beta$ -Sheet Oligomer: New Insights into Amyloid Formation of Hen Egg White Lysozyme under Heat and Acidic Condition from FTIR Spectroscopy // *J. Phys. Chem. B.* – 2013. – T. 117. – №15. – C. 4003–4013.
227. Zwanzig R., Szabo A., Bagchi B. Levinthal's paradox // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – T. 89. – №1. – C. 20–22.