

*На правах рукописи*

**Якупова Эльмира Ильдаровна**

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

**03.01.02 – Биофизика**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**ПУЩИНО – 2020**

Работа выполнена в Лаборатории структуры и функций мышечных белков Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН), г. Пущино.

- Научный руководитель:** кандидат биологических наук  
**Бобылёв Александр Геннадьевич**
- Научный консультант:** доктор биологических наук  
**Вихлянцев Иван Милентьевич**
- Официальные оппоненты:** доктор физико-математических наук  
**Кубасова Наталия Алексеевна**  
(МГУ им. М.В. Ломоносова,  
Научно-исследовательский институт механики,  
в.н.с. лаборатории биомеханики),  
доктор биологических наук, доцент  
**Гришин Сергей Николаевич**  
(профессор кафедры мед. и биол. физики с  
информатикой и медицинской аппаратурой  
Казанского ГМУ Минздрава России)
- Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное  
учреждение **Институт иммунологии и  
физиологии Уральского отделения  
Российской академии наук**

Защита состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020 г. в \_\_\_\_ часов \_\_\_\_ минут на заседании совета Д 002.093.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке ПНЦ РАН по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область, и на сайте ИТЭБ РАН: <http://iteb.ru>.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат физ.-мат. наук

Н.Ф. Ланина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 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 M-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*.

### **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, рН 7.0-7.4, «глицин-агрегаты») и с ионной силой близкой к физиологической (0.2 М КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0-7.4, «КСl-агрегаты»);
- 2) Методом динамического рассеяния света (ДРС) изучить процесс агрегации титина;
- 3) Вышеуказанными методами изучить способность «глицин-агрегатов» и «КСl-агрегатов» титина дезагрегировать в растворе с высокой ионной силой (содержащем 0.6 М КСl);
- 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 работы**

Методами электронной, атомно-силовой микроскопии и методом динамического рассеяния света впервые показано, что гладкомышечный титин формирует *in vitro* два типа аморфных агрегатов: «КСl-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 КСl). Рентгендифракционные исследования двух типов агрегатов титина позволили зарегистрировать рефлексы, характерные для кросс- $\beta$  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 КСl). 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*.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1) Гладкомышечный титин формирует *in vitro* два типа аморфных агрегатов с четвертичной кросс- $\beta$  структурой: способных дезагрегировать при помещении в раствор с более высокой ионной силой (0.6 М KCl) 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 KCl).

#### **Апробация работы**

По результатам данной работы опубликованы 5 статей в журналах из списка ВАК РФ и 16 тезисов в сборниках трудов конференций.

Результаты исследований и основные положения работы были представлены и обсуждены на 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 Пушкинских 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.

## **1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

В обзоре литературы изложены основные современные сведения об образовании амилоидных агрегатов, свойствах амилоидов, истории открытия амилоидов и методах, которыми их изучают. Приведена информация о титине поперечно-полосатых и гладких мышц, его структуре, функциях и свойствах, включая агрегационные.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### ***Выделение титина из желудочков курицы***

Титин из гладких мышц желудков курицы выделяли по методу [Trinick et al., 1984] с модификациями [Yakupova et al., 2018]. Титин очищали методом гель-фильтрации на колонке с носителем Sepharose–CL2B, уравновешенным в буфере «К» (0.6 М КСl, 30 мМ КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, 0.5 мМ ДТТ, 0.1 М NaN<sub>3</sub>, рН 7.0) (ионная сила ~0.6).

### ***Определение концентрации белковых препаратов***

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

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

Чистоту выделенного титина проверяли методом ДСН-гель-электрофореза по методике [Fritz et al., 1989] с модификациями [Yakupova et al., 2018]. Отмытые гели сканировали, а затем проводили расчет молекулярной массы белка с помощью компьютерной программы Total Lab v1.11.

### ***Лиофилизация белка***

В образцы белка, растворенного в буферном растворе «К», добавляли 1% тригалозы, после чего образцы замораживали при температуре -70°C. Далее их подвергали лиофилизации в приборе FreeZone 1L (Labconco, USA) при температуре -56°C и давлении 0.013 мБ.

### ***Вестерн-блот анализ***

Перенос белков на PVDF мембрану проводили по методу [Towbin et al., 1979]. Вестерн-блоттинг проводили по стандартной методике с использованием первичных моноклональных антител 9D10-с (1:1000, DSHB, США).

### ***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). «КСl-агрегаты» титина были сформированы диализом против буферного раствора, содержащего 0.2 М КСl, 10 мМ имидазола, рН 7.0-7.4, в течение 3 и 24 часов при 4°C. «Глицин-агрегаты» титина были сформированы диализом против буферного раствора, содержащего 0.15 М глицина-КОН, рН 7.0-7.4, в течение 3 и 24 часов. Для выявления способности вышеуказанных агрегатов титина дезагрегировать проводили их диализ в течение 3 и 24 часов против буферного раствора «К» (ионная сила ~ 0.6).

### ***Динамическое светорассеяние***

Для исследования процесса агрегации титина методом ДРС препараты белка, растворённого в буфере «К», диализовали против соответствующих буферных растворов для получения «КСl-агрегатов» и «глицин-агрегатов». Через 20, 40, 60, 120 и 180 мин диализа отбирались образцы для проведения измерений. Последний образец оставляли в приборе для проведения непрерывных измерений в течение 21 часа. Расчеты проводились с учетом произведения динамической вязкости на плотность раствора титина, а также значения плотности раствора и динамической вязкости. Динамическое светорассеяние выполняли с помощью 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.

### ***Электронная микроскопия***

Каплю раствора или суспензии белка в концентрации 0.2-0.4 мг/мл наносили в течение 30-60 сек на медные сетки, покрытые коллодиевой пленкой (2% коллодий в амилацетате фирмы SPI-CHEM, США), укрепленной углеродом. После удаления избытка суспензии фильтровальной бумагой образцы окрашивали 2% водным раствором уранилацетата. Электронно-микроскопические исследования проводили на микроскопе JEM100B.

### ***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 атомно-силового микроскопа 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, растворённого в буфере «К», наносили на поверхность свежесколотой слюды и инкубировали в течение 1 мин. Затем 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 ~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 микроскопа. Автокорреляцию данных осевой высоты выполняли с использованием программного обеспечения IgorPro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR).

### ***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 190-250 нм. Вторичную структуру белка рассчитывали с помощью модуля CONTINLL программы CDPPro [Sreerama & Woody, 2000].

### ***Инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием***

Измерения проводились на ИК-Фурье спектрометре Nicolet 6700 производства компании Thermo Scientific, оснащённом приставкой Smart Proteus с Пельтье-контролируемым кюветодержателем в режиме пропускания в кювете из кристаллического фторида кальция с оптическим путем 4 мкм, используя МСТ (Mercury-Cadmium-Telluride) детектор (охлаждение жидким азотом). Сканирование проводили в диапазоне волновых чисел от  $650\text{ см}^{-1}$  до  $4000\text{ см}^{-1}$  с разрешением  $1\text{ см}^{-1}$ , с усреднением по 256 спектрам. Прибор был откалиброван в соответствии с инструкциями компании-производителя прибора.

ИК-спектры растворов препаратов титина в соответствующем буфере и спектры самого буфера измеряли при 20°C. Концентрация белка составила 36-42 мг/мл. ИК-спектр препарата белка измеряли два раза и два раза прописывали спектр буфера. Из каждого

спектра белка вычитали ИК-спектр буфера, учитывая различие величин оптического пути в измерениях. Каждый разностный спектр поправляли на спектральный вклад паров воды и CO<sub>2</sub> с последующим анализом в диапазоне волновых чисел 1725-1481 см<sup>-1</sup> на предмет содержания элементов вторичной структуры в белке, следуя принципам, описанным в работе [Yang et al., 2015].

#### ***Рентгеновская дифракция***

Для проведения рентгенодифракционных исследований препараты «KCl-агрегатов» подвергали диализу в течение 24 часов при 4°C против раствора, содержащего 0.15 М глицина-KOH, pH 7.2–7.4, для удаления KCl. Аналогичную процедуру проводили с препаратами двух типов агрегатов после их дезагрегации в растворе «К». Капли полученных препаратов белка помещали между концами покрытых воском стеклянных капилляров (диаметром около 1 мм), удалённых друг от друга на расстояние ~1.5 мм для дальнейшего высушивания на воздухе. Дифракционные изображения были получены с использованием Microstar X-ray генератора с оптикой HELIOX, система регистрации Platinun135 CCD detector (X8 Proteum system, Bruker AXS). Использовали Cu K $\alpha$  излучение с  $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$  (1  $\text{\AA} = 0.1 \text{ нм}$ ).

#### ***Флуоресцентный анализ с красителем тиофлавином T***

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

#### ***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-KOH, pH 7.2–7.4 с красителем Конго красным (100 мкл КК, 0.02 мг/мл). 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).

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

Использовали соотношения агрегатов титина к раствору Конго красного 1:125 (w/w). Образцы центрифугировали для концентрирования агрегатов, после чего удаляли супернатант и промывали образцы дистиллированной водой 2-3 раза с последующим центрифугированием. 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. Исследования проводились с использованием микроскопа, оборудованного двумя поляризаторами.

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

#### **ДСН-гель-электрофорез и Вестерн-блот анализ титина**

Идентификацию белковых фракций и определение их чистоты после выделения белка проводили с помощью ДСН-гель-электрофореза (Рис. 1 А, Б) и Вестерн-блот анализа (Рис. 1 В, Г). Используя логарифмическую зависимость между молекулярной массой и подвижностью белка в геле, было определено, что выделенный белок имеет м.м.



~500 кДа (Рис 1 А, Б). Вестерн-блот анализ подтвердил, что выделенный белок является титином (Рис. 1 Г).

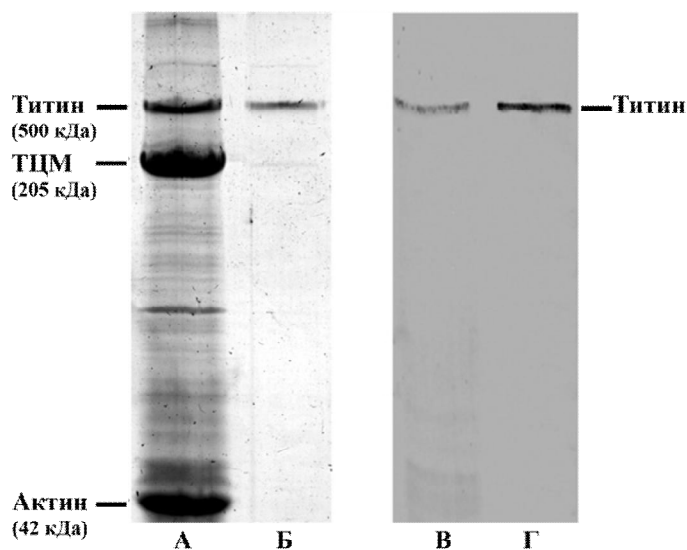


Рис. 1. Исследование чистоты белковых препаратов и идентификация титина. ДСН-гель-электрофорез экстракта желудка курицы (А) и препарата очищенного гладкомышечного титина (Б); Вестерн-блот анализ экстракта желудка курицы (В) и препарата очищенного гладкомышечного титина (Г) с применением антител 9D10.

### Исследование процесса агрегации титина методом динамического рассеяния света (ДРС)

Методом ДРС обнаружена способность титина гладких мышц агрегировать *in vitro* в двух растворах: с ионной силой, близкой к физиологическим значениям (~0.2, «КСI-агрегаты»), и при низких значениях ионной силы («глицин-агрегаты»). Не было выявлено существенных различий в размерах частиц и в их процентом соотношении у агрегатов обоих типов. Так, в препаратах гладкомышечного титина до начала формирования агрегатов наблюдалось две фракции частиц, средний гидродинамический радиус которых (Rh) 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. В образцах «КСI-агрегатов» были следующие значения гидродинамических радиусов (Rh): ~20 нм, ~200 нм, ~8000 нм (Рис. 2). В образцах «глицин-агрегатов» значения Rh составили: ~20 нм, ~700 нм, ~8000 нм (Рис. 2). В случае «КСI-агрегатов» титина наблюдалась способность дезагрегировать до мономеров при помещении агрегатов в раствор с ионной силой ~0.6 М (Рис. 2). Агрегация «глицин-агрегатов» титина была необратимой (Рис. 2).

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.

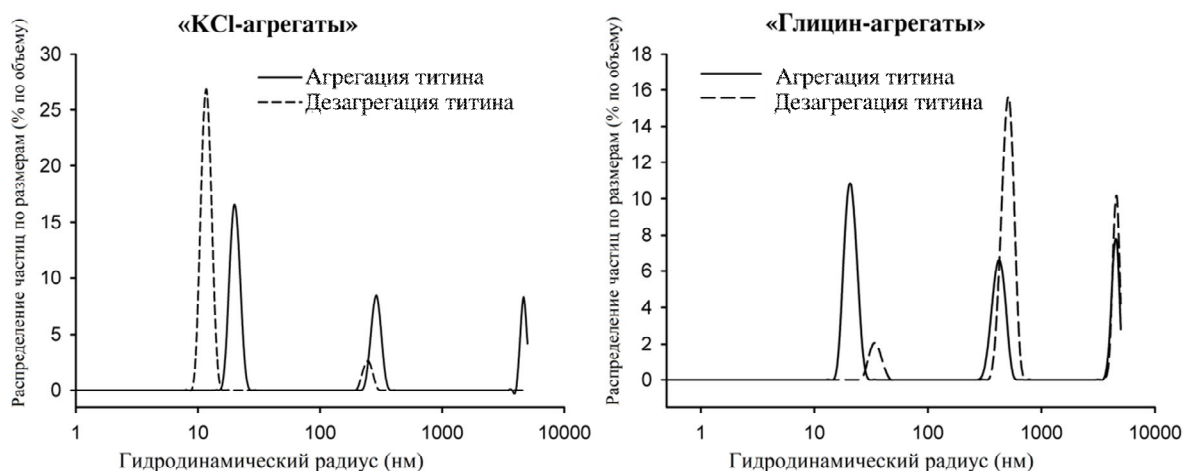


Рис. 2. Распределение размеров частиц титина, полученное методом ДРС. Образование крупных агрегатов и их рост в зависимости от времени. Слева представлены данные для «KCl-агрегатов» (сформированы путем диализа в течение 180 минут против буферного раствора, содержащего 0.2 М KCl, 10 мМ имидазола, pH 7.0-7.4), справа – «глицин-агрегатов» (диализ в течение 180 минут против буферного раствора, содержащего 0.15 М глицина-KOH, pH 7.0-7.4).

### Электронно-микроскопическое изучение агрегатов титина

С помощью электронной микроскопии не было выявлено различий в морфологии между двумя типами агрегатов титина как через 3 часа (Рис. 3 А, Б) так и 24 часа (Рис. 3 Д, Е) агрегации белка. Различия в морфологии агрегатов были обнаружены после их помещения в раствор «К» (ионная сила  $\sim 0.6$  М). «KCl-агрегаты» титина становились более рыхлыми (Рис. 3 В, Ж). Противоположная картина наблюдалась при помещении в раствор «К» «глицин-агрегатов» (Рис. 3 Г, З). Эти агрегаты приобретали более плотную структуру через 24 часа дезагрегации (Рис. 3 З). Результаты электронно-микроскопических наблюдений подтвердились данными, полученными методом ДРС: в образцах «глицин-агрегатов» при повышении ионной силы раствора не наблюдались моно/димерные формы белка, которые присутствовали в образцах «KCl-агрегатов» (Рис. 2). Присутствие подобных форм свидетельствует о частичной дезагрегации белка.

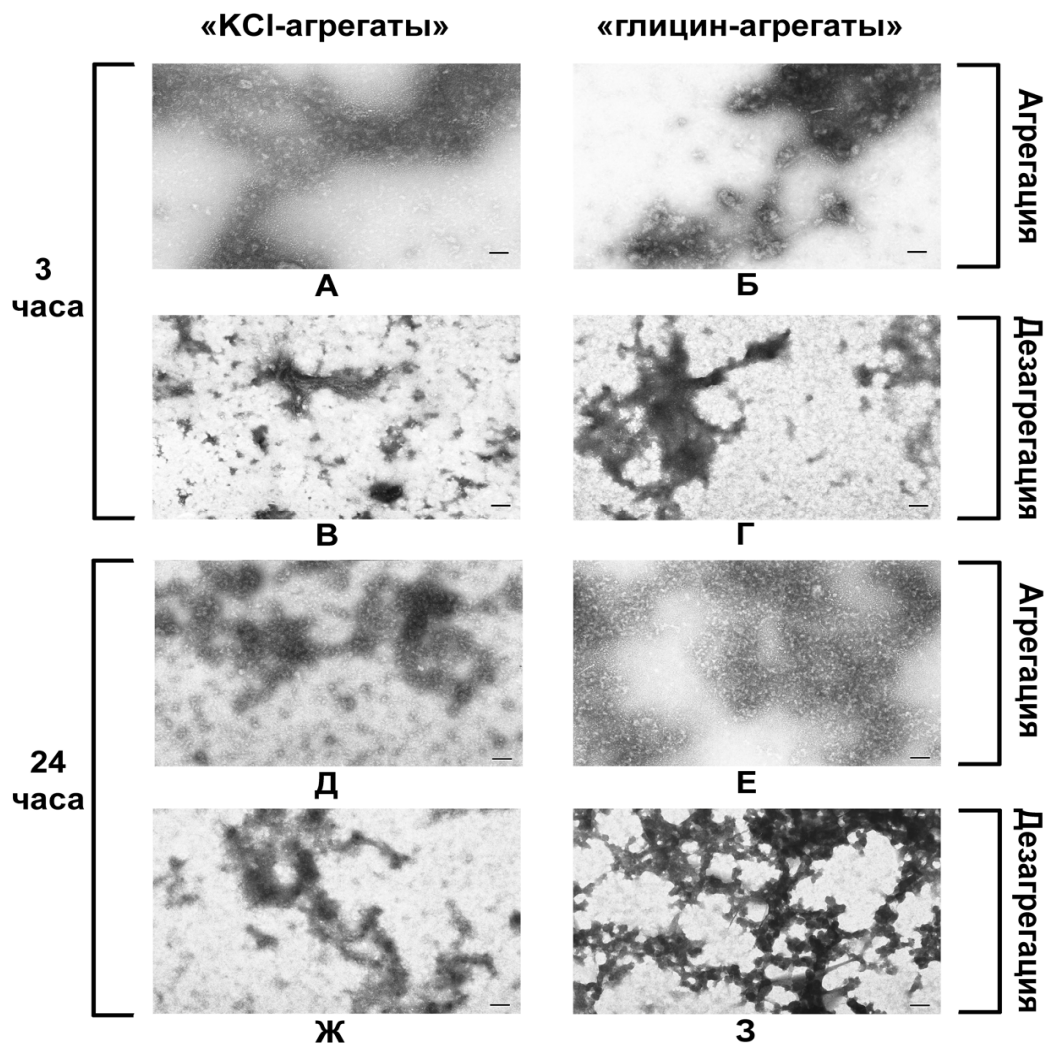


Рис. 3. Электронная микроскопия негативно окрашенных агрегатов гладкомышечного титина. Аморфные «KCl-агрегаты» титина после 3 часов (А) и 24 часов (Д) агрегации. Аморфные «глицин-агрегаты» титина после 3 часов (Б) и 24 часов (Е) агрегации. «KCl-агрегаты» титина после их помещения в раствор с ионной силой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

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

Аморфная морфология агрегатов титина была подтверждена и методом атомно-силовой микроскопии (Рис. 4).

По данным АСМ «KCl-агрегаты» титина после 3 часов агрегации имели размер от 30-50 нм до одного микрометра по ширине и до 25 нм по высоте (Рис. 4 А). Трехчасовая дезагрегация приводила к значительному уменьшению размера белковых агрегатов (Рис. 4 В), преобладали структуры высотой до 8-10 нм (Рис. 4 В). При этом в поле зрения наблюдались единичные сферической формы агрегаты диаметром не более 100 нм и высотой до 20 нм.

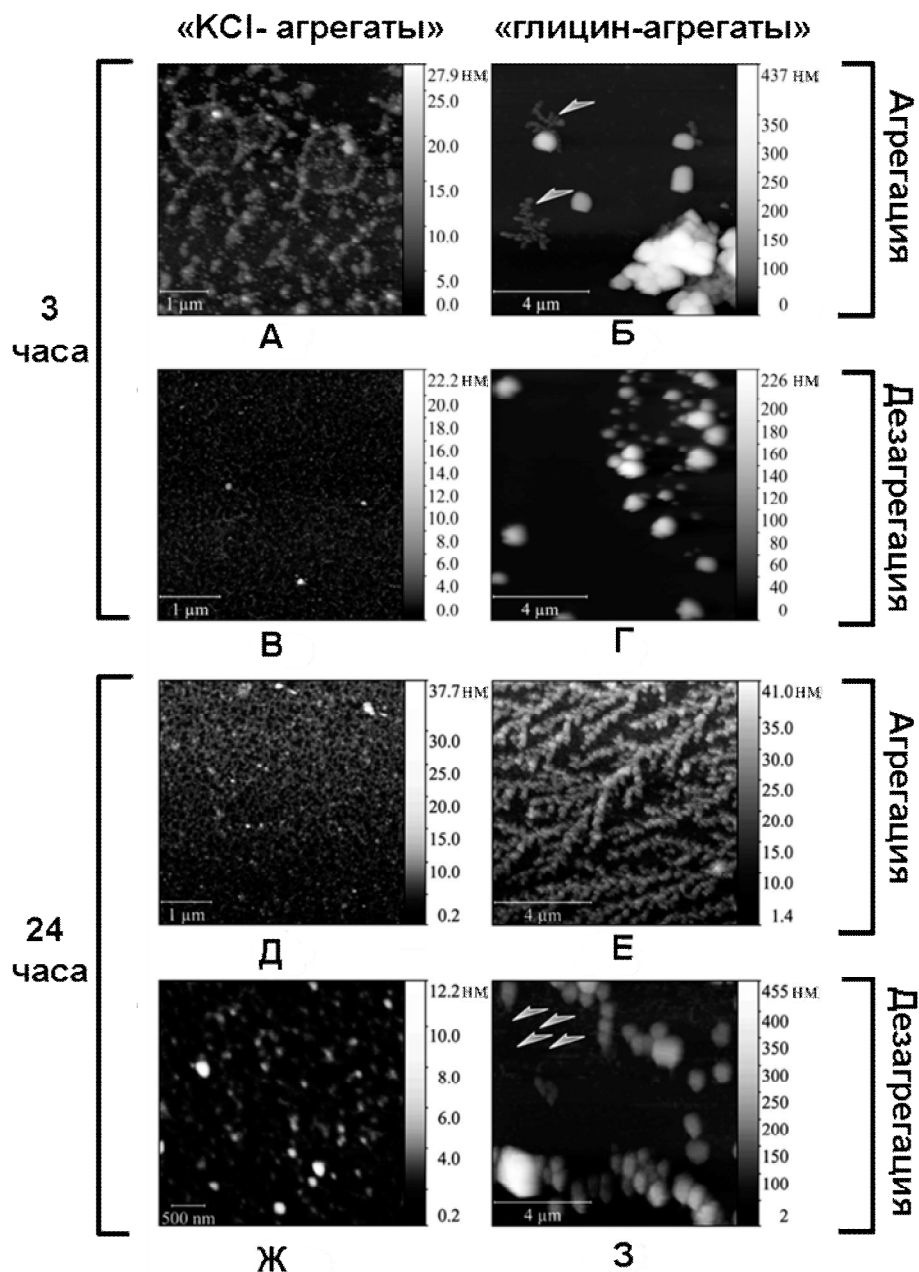


Рис. 4. Атомно-силовая микроскопия агрегатов титина. «KCl-агрегаты» после 3 часов (А) и 24 часов (Д) агрегации. «Глицин-агрегаты» после 3 часов (Б) и 24 часов (Е) агрегации. «KCl-агрегаты» титина после их помещения в раствор с ионной силой  $\sim 0.6$  М: после 3 часов (В) и 24 часов (Ж) дезагрегации. «Глицин-агрегаты» после 3 часов (Г) и 24 часов (З) дезагрегации.

После 24 часов агрегации в образцах «KCl-агрегатов» титина по данным АСМ наблюдались пористые структуры высотой 8-10 нм (Рис. 4 Д). После 24 часов дезагрегации подобные структуры не наблюдались, а были видны сфероидальные агрегаты высотой 10-12 нм (Рис. 4 Ж). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о дезагрегации «KCl-агрегатов» титина в растворе с высокой ионной силой, что согласуется с данными, полученными методом ДРС (Рис. 2).

«Глицин-агрегаты» титина после 3 часов агрегации по данным АСМ имели больше морфологических различий по размеру и высоте (Рис. 4 Б). Наблюдались их скопления сферической формы до 4 мкм в ширину и 400 нм в высоту. Диаметр отдельных

сферических агрегатов составлял  $\sim 1$  мкм (Рис. 4 Б). Наблюдались и более мелкие (ветвящиеся) агрегаты, высота которых составляла  $\sim 100$  нм (Рис. 4 Б, стрелка). По форме эти агрегаты были похожи на «КСI-агрегаты» (Рис. 3 А). После помещения «глицин-агрегатов» в раствор с высокой ионной силой ( $\sim 0.6$  М) через 3 часа можно было наблюдать только сфероидные агрегаты шириной до 1.5 мкм и высотой до 200 нм (Рис. 4 Г), что свидетельствует о некоем уменьшении размера белковых агрегатов титина, но не их дезагрегации.

«Глицин-агрегаты» титина после 24 часов агрегации по данным АСМ представляли собой разветвленные цепи, состоящие из сферических агрегатов диаметром около 300-500 нм и высотой до 35 нм (Рис. 4 Е). По-видимому, зарождение данных агрегатов происходило по истечении 3 часов агрегации (Рис. 4 Б, 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. 4 З). Однако при этом были видны крупные сферические агрегаты, диаметр которых составлял 2 мкм и более, а высота 200-400 нм (Рис. 4 З). Эти результаты согласуются с данными, полученными методом ДРС, указывающими на дальнейшее увеличение гидродинамического радиуса «глицин-агрегатов» после повышения ионной силы раствора (Рис. 2). Т.о., несмотря на то, что в поле зрения наблюдались и более мелкие агрегаты белка (Рис. 4 З, стрелочки), на основании полученных результатов можно утверждать, что агрегация «глицин-агрегатов» была необратимой.

#### **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 ( $\sim 0.6$  М), мы поставили цель изучить морфологию данных агрегатов. Эти исследования были проведены совместно с профессором Миклушем Келлермайером в его Лаборатории биофизики и радиационной биологии (Семмельвешский Университет, Будапешт, Венгрия) в период с 5 августа по 1 сентября 2019 г. и с 10 января по 21 марта 2020 г.

На рисунке 5 представлена фотография мономеров (одиночных молекул), а на рисунках 6 и 7 – фотографии олигомеров гладкомышечного титина, полученные с помощью АСМ.

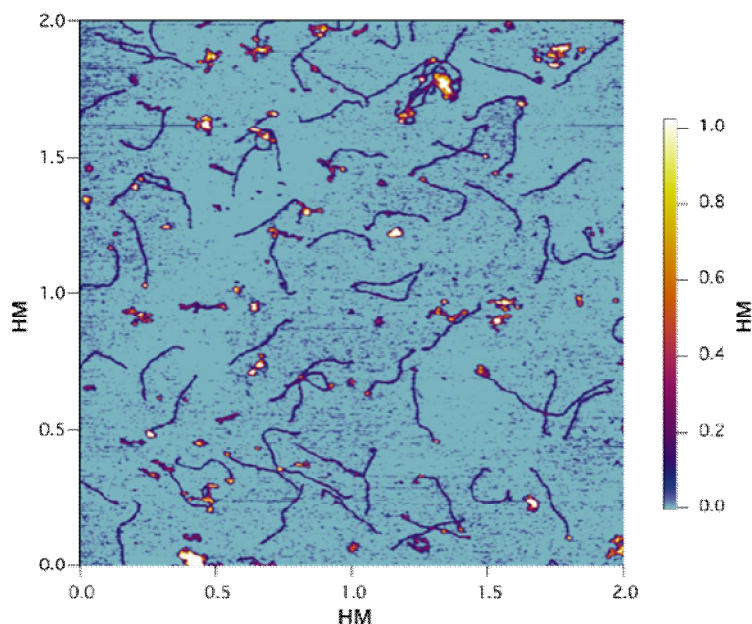


Рис. 5. Атомно-силовая микроскопия мономеров гладкомышечного титина. В поле зрения можно наблюдать нитевидные мономеры белка. В ряде случаев на одном из концов наблюдается глобулярное утолщение.

Как и молекула титина поперечно-полосатых 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. 5).

Кроме отдельных молекул титина были видны олигомеры этого белка. Одни олигомеры, связываясь головками друг с другом, имели уплотнение в центре с отходящими от него молекулами титина (Рис. 6). Такие структуры наблюдались ранее в препаратах титина, выделенного из скелетных мышц кролика [Kellermayer et al., 2003]. Предполагается, что в центральной части олигомеров собираются концы молекул белка с глобулярной головкой. Эта головка, вероятно, соответствует участку белка из М-линии саркомера [Kellermayer et al., 2003].

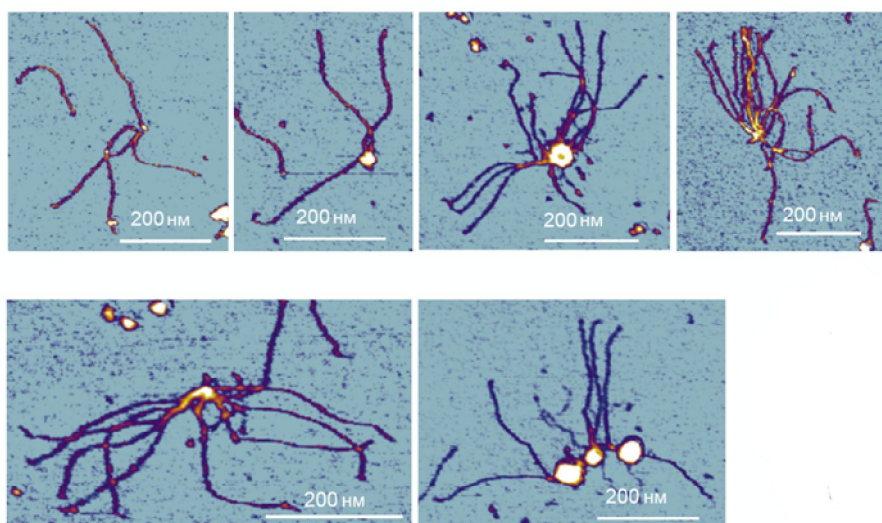


Рис. 6. Атомно-силовая микроскопия олигомеров гладкомышечного титина. В поле зрения можно наблюдать нитевидные мономеры белка, которые собираются в олигомеры, формирующие центральное утолщение.

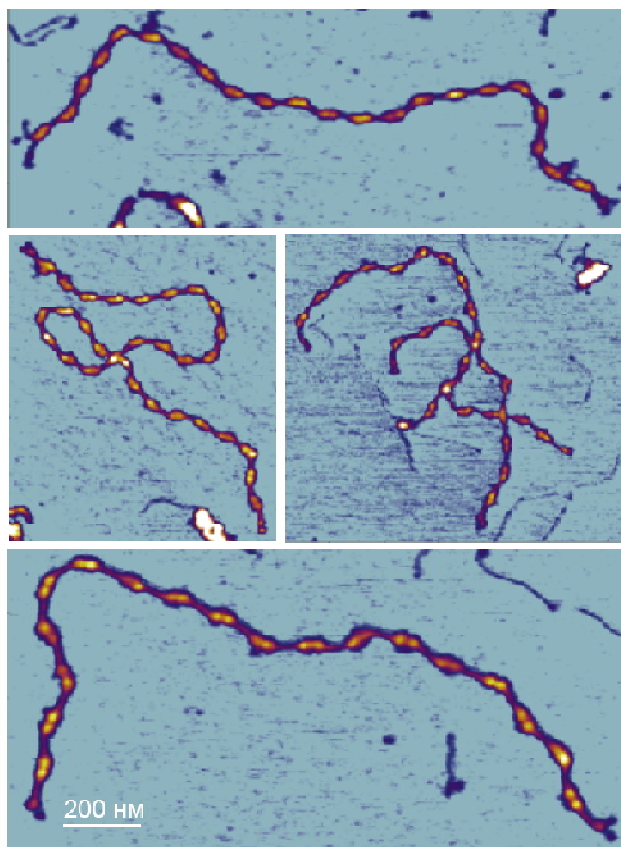


Рис. 7. Атомно-силовая микроскопия нитевидного олигомера гладкомышечного титина.

Другие олигомеры имели вид филаментов, длина которых достигала в отдельных случаях 2 мкм и более (Рис. 7). На всем протяжении таких олигомерных структур наблюдались периодически расположенные двойные глобулярные утолщения высотой 26 нм. Расстояние между утолщениями составляло 105 нм. Такие олигомеры описаны впервые и не наблюдались ранее в препаратах титина, выделенного из поперечно-полосатых мышц. Подобная морфология олигомеров гладкомышечного титина позволяет предположить, что именно в такой форме этот белок находится внутри гладкомышечных клеток.

#### **Исследование структуры агрегатов титина при помощи дифракции рентгеновских лучей**

При помощи дифракции рентгеновских лучей были выявлены следующие рефлексы для «КСI-агрегатов» титина: диффузный 8.19-12.69 Å, среднее значение которого составило 9.52 Å, и рефлекс 4.89 Å (Рис. 8 А); для «глицин-агрегатов» титина этим рефлексам соответствовали значения: 8.24-11.68 Å (ср. зн. =9.31 Å) и 4.83 Å (Рис. 8 Б).

После помещения агрегатов первого и второго типов в условия с повышенной ионной силой были обнаружены следующие рефлексы: диффузный 8.19-11.89 Å (ср. зн. =10.00 Å) и 4.82 Å для «КСI-агрегатов» (Рис. 8 В); диффузный 8.54-11.28 Å (ср. зн. =10.00 Å) и 4.85 Å для «глицин-агрегатов» (Рис. 8 Г).

Полученные рефлексы соответствуют четвертичной структуре, напоминающей кросс-β, характерной для амилоидных агрегатов [Inouye et al., 1993; Sunde et al., 1997; Makin & Serpell, 2005; Morris & Serpell, 2012]. На основе данных рентгеновской дифракции «КСI-агрегаты» титина имеют большой разброс диффузного рефлекса (8.19–

12.69 Å) (Рис. 8 А), чем «глицин-агрегаты» (8.24–11.68 Å) (Рис. 8 Б). Известно, что эти значения соответствуют расстоянию между β-листами. Исходя из этого, можно предположить, что «глицин-агрегаты» имеют более упорядоченную структуру. Схематическое изображение предполагаемой структуры «глицин-агрегатов» титина, построенное на основании данных рентгеноструктурного анализа, представлено на рисунке 9.

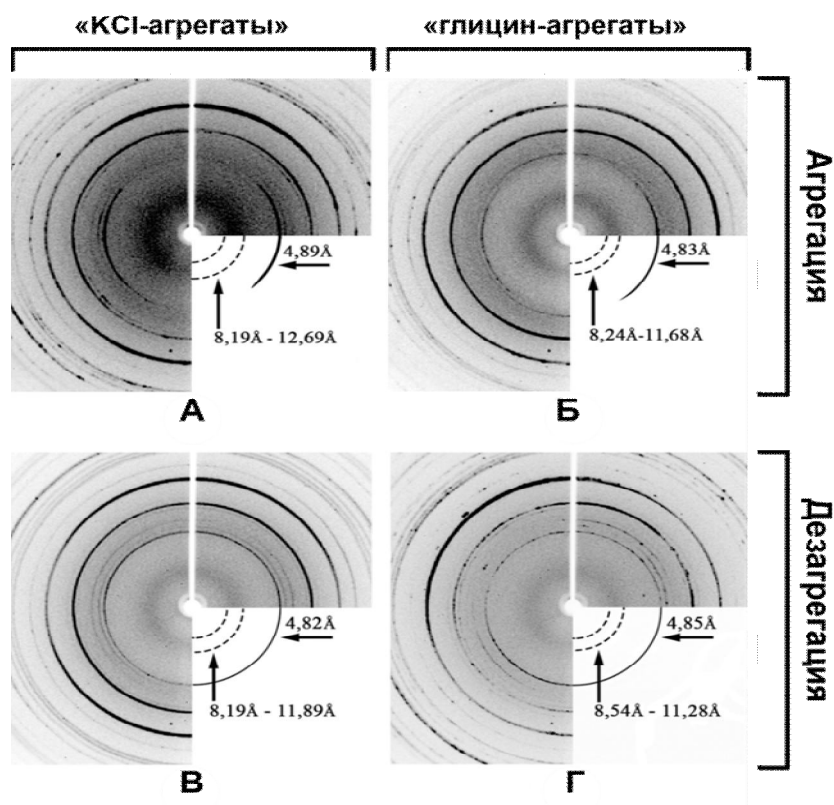


Рис. 8. Рентгеновская дифракция агрегатов титина гладких мышц после 24 часов агрегации. (А) Значения рефлексов для «КCl-агрегатов»; (Б) Значения рефлексов для «глицин-агрегатов»; (В) Значения рефлексов для «КCl-агрегатов» титина после дезагрегации; (Г) Значения рефлексов для «глицин-агрегатов» титина после дезагрегации.

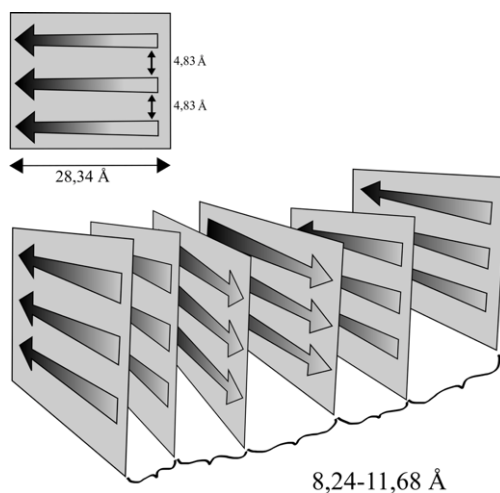


Рис. 9. Схематическое изображение «глицин-агрегатов» титина, построенное на основании данных рентгеновской дифракции (Yakupova et al., 2018). Расстояние между β-листами равняется 4.83 Å, ширина β-листов составляет 28.34 Å. Расстояние между β-листами варьирует от 8.24 до



11.68 Å. Следует обратить внимание на относительно упорядоченное расположение β-стрендов, они ориентированы в одной плоскости, следствием чего является рефлекс 4.83 Å.

За счет того, что рефлекс, характеризующий расстояние между β-листами, является диффузным и кольцевым, мы предполагаем, что сами β-листы не являются строго ориентированными по одной из осей (Рис. 8, 9). Таким образом, можно сделать вывод, что агрегированный титин имеет близкую к кросс-β четвертичную структуру. В связи с этим, его агрегаты следует называть амилоидо-подобными, а не амилоидными.

### Флуоресцентный анализ связывания агрегатов титина с красителем тиофлавином Т (ТТ)

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 их 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. 10).

Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии «КСI-агрегатов» практически не увеличивалась по сравнению с ее интенсивностью в присутствии молекулярной формы титина (Рис. 10 А, Б). Значительное увеличение интенсивности флуоресценции ТТ наблюдалось в присутствии «глицин-агрегатов» титина (Рис. 10 Б). 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. 10 Б).

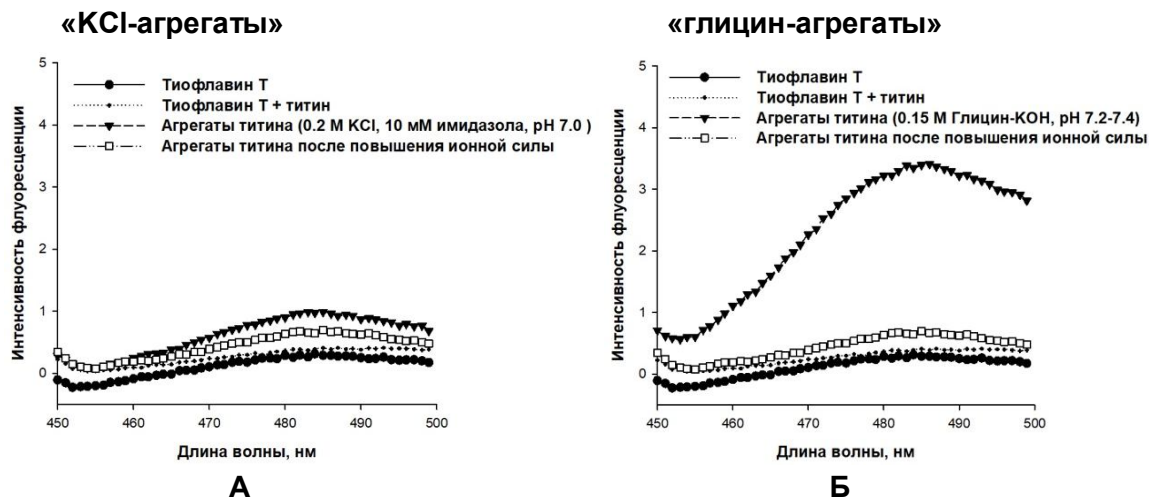


Рис. 10. (А) Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии «КСI-агрегатов» титина через 3 часа агрегации, а также через 3 часа деагрегации после повышения ионной силы раствора. (Б) Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии «глицин-агрегатов» титина через 3 часа агрегации, а также через 3 часа деагрегации после повышения ионной силы раствора.

## Исследование связывания агрегатов гладкомышечного титина с красителем Конго красным

В присутствии агрегатов титина обоих типов отсутствовало смещение спектра поглощения красителя КК от 490 до 512 нм, несмотря на то, что такое смещение считается характерным для взаимодействия красителя с амилоидными агрегатами [Meehan et al., 2004; Frid et al., 2007]. Что интересно, при этом было обнаружено желтое/зеленое свечение КК при поляризационной микроскопии в присутствии «глицин-агрегатов» (Рис 11 Б), тогда как, в присутствии «КСI-агрегатов» (Рис. 11 Г), а также агрегатов обоих типов после их дезагрегации (Рис. 11 Е, З) подобное свечение отсутствовало. Считается, что желто-зеленое свечение КК при поляризационной микроскопии является подтверждением амилоидной природы исследуемых агрегатов белков. Однако известно, что различие в двулучепреломлении КК может быть артефактом, вызванным связыванием КК с веществами буферного раствора. По нашим данным связывание КК с глицином приводило к характерному «амилоидному» желто-зеленому свечению в препаратах «глицин-агрегатов» (Рис. 12). Т.о., идентификация *in vitro* амилоидной природы агрегатов на основе использования красителя Конго красного может привести к ошибочным результатам. Поэтому для подтверждения амилоидной природы агрегатов наиболее точным методом является деракция рентгеновских лучей.

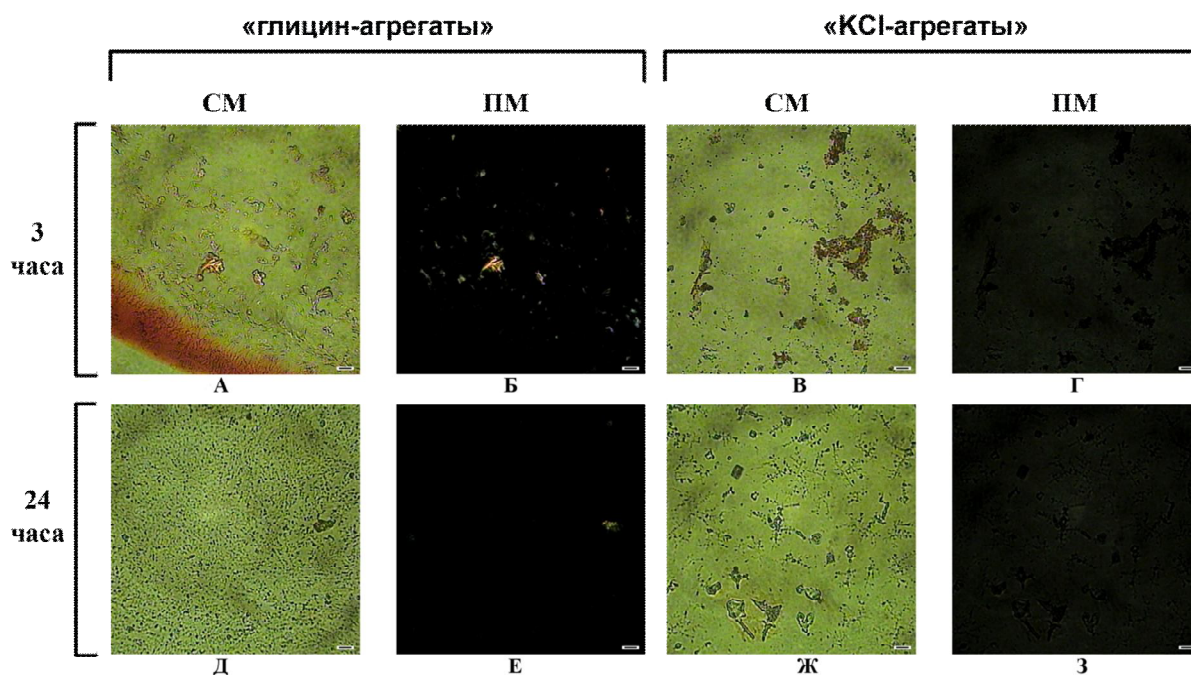


Рис. 11. Поляризационная микроскопия с красителем КК в присутствии «глицин-агрегатов» (А, Б, Д, Е) и «КСI-агрегатов» (В, Г, Ж, З) титина: (А-Г) 3 часа агрегации; (Д-З) 24 часа агрегации. СМ – световая микроскопия, ПМ – микроскопия в поляризованном свете. Шкала 1 мкм.

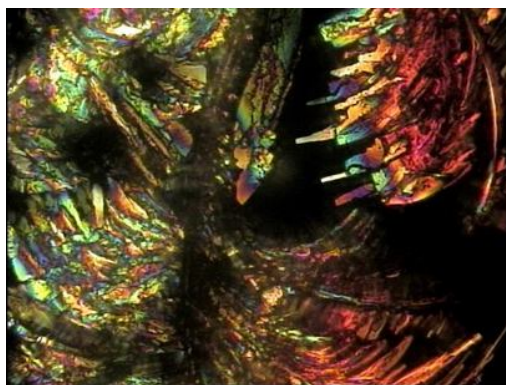


Рис. 12. Микроскопия в поляризованном свете. Высушенная капля буферного раствора, содержащего 0.15 М глицина-КОН, pH 7.2-7.4 и Конго красный. Видно желто-зеленое свечение, характерное для амилоидных агрегатов. Увеличение 400х.

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

На рисунке 13 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. Полученные результаты свидетельствуют о высоком содержании неупорядоченной вторичной структуры и  $\beta$ -складчатых структур в молекуле гладкомышечного титина.

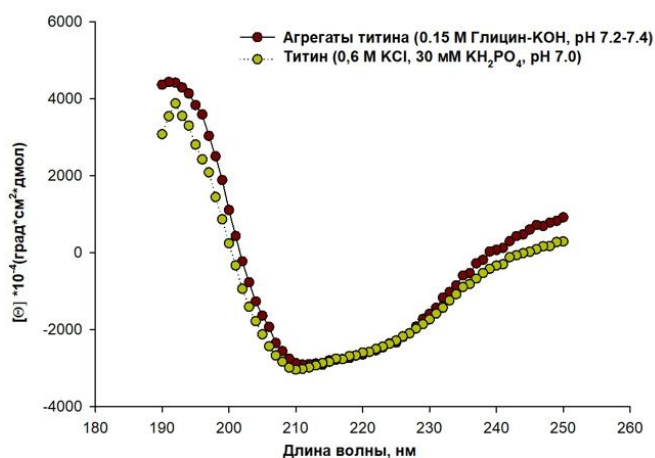


Рис. 13. Спектры кругового дихроизма для неагрегированного белка и «глицин-агрегатов» титина.

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».

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

Полученные оценки содержания элементов вторичной структуры в образцах титина и двух типов его агрегатов представлены в Таблице 1. Из полученных данных видно, что в образцах белка до агрегации содержится большое количество  $\beta$ -складок ( $31.47 \pm 0.47\%$ ) и неупорядоченных структур ( $31.7 \pm 1.21\%$ ), 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 1. 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.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Обсуждая полученные результаты и возможный механизм формирования 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 ~30 до ~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. Возможно, именно такое явление мы наблюдаем 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, выделенных непосредственно из гладких мышц. При этом агрегация титина может быть обратимой, что показано нами для «KCl-агрегатов» этого белка.

Подобная обратимая агрегация *in vivo* может быть функционально значима, например, для создания большей прочности между миофиламентами. При этом большая часть структуры молекулы титина находится в нативном состоянии, что позволяет белку проявлять упруго-эластичные свойства. Полный же анфолдинг доменов титина *in vitro* и *in vivo* маловероятен из-за наличия S-S связей, и поэтому маловероятно формирование в клетках необратимых патологических агрегатов этого белка.

Следует также обратить внимание, что большинство белков для формирования амилоидных агрегатов претерпевают изменения во вторичной структуре, проходят этап разворачивания и обратного сворачивания аминокислотной цепи, 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. В случае с титином активация агрегации инициируется в буферных растворах с физиологическими значениями pH и ионной силой, близкой к физиологической. Примечательно также, что агрегация титина происходит сравнительно быстро: начинается в течение нескольких минут, и после трёх часов размеры агрегатов превышают порог чувствительности метода ДРС, тогда как другим белкам для формирования больших агрегатов требуются недели и даже месяцы инкубации. Полученные нами данные указывают на заложенную природой высокую агрегационную способность титина, которая, теоретически, может протекать *in vivo* и иметь функциональное значение.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя краткий итог полученным результатам, следует отметить следующее. Обнаружена способность титина гладких мышц формировать *in vitro* аморфные амилоидо-подобные 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 KCl, 10 mM имидазола, pH 7.0-7.4, и при низких значениях ионной силы в растворе, содержащем 0.15 М Глицин-KOH, pH 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 KCl, 10 mM имидазола, pH 7.0-7.4, способны частично дезагрегировать при повышении ионной силы раствора.

6. В условиях высокой ионной силы (в растворе, содержащем 0.6 М KCl) 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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Статьи:*

1. Якупова Э.И., Вихлянцев И.М., Лобанов М.Ю., Галзитская О.В., Бобылёв А.Г. Об амилоидных свойствах титина. // Успехи биологической химии. 2017. – Т. 57. – С. 245–266. (Английская версия: Yakupova E.I., Vikhlyantsev I.M., Lobanov M.Y., Galzitskaya O.V., Bobylev A.G. Amyloid properties of titin. // Biochemistry (Moscow). 2017. – Vol. 82. – № 13, P. 1675-1685.
2. 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 muscle titin in vitro // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2018. – Vol. 36. – №9. – P. 2237-2248.
3. Yakupova E.I., Bobyleva L.G., Vikhlyantsev I.M., Bobylev A.G. Congo red and amyloids: History and relationship // Bioscience Reports. 2018. – BSR20181415.
4. Бобылёва Л.Г., Якупова Э.И., Уланова А.Д., Удальцов С.Н., Шумейко С.А., Салмов Н.Н., Бобылёв А.Г., Выхлянцев И.М. К вопросу об особенностях агрегации мультидоменных мышечных белков // Биофизика. 2019. –Т. 65. – №5. – P. 667–670.
5. Бобылёв А.Г., Якупова Э.И., Бобылёва Л.Г., Галзитская О.В., Никулин А.Д., Шумейко С.А., Юршенас Д.А., Вихлянцев И.М. Изменение структуры титина при его агрегации // Молекулярная биология. 2020. – Т. 54. – №4. –С. 643-654.

### *Тезисы докладов:*

1. Yakupova E.I., Bobylev A.G., Vikhlyantsev I.M., Podlubnaya Z.A. «Smooth muscle titin forms aggregates with amyloid-like dye-binding properties» // EXPERIMENTAL AND COMPUTATIONAL BIOMEDICINE: Russian Conference with International Participation in memory of Professor Vladimir S. Markhasin, Ekaterinburg, 2016, p. 53.
2. Yakupova E.I., Bobylev A.G., Bobyleva L.G., Vikhlyantsev I.M., Penkov N.V., Podlubnaya Z.A. Smooth muscle titin (1500 KDa) forms in vitro amyloids // International Symposium «Biological motility», Pushchino, 2016, p. 257-260.
3. Якупова Э.И., Бобылёва Л.Г., Юршенас Д.А., Шумейко С.А., Вихлянцев И.В., Бобылёв А.Г. Изучение амилоидной агрегации тайтина in vitro // Теоретическая и экспериментальная биофизика: Материалы конференции, посвященной 65-летию ИТЭБ РАН, Пущино, 2017, С. 51.
4. Шоно Я.А., Якупова Э.И., Вихлянцев И.М., Бобылёв А.Г. Агрегационные свойства гладкомышечного белка тайтина в различных условиях in vitro // Форум "Наука будущего - наука молодых", Сочи, 2017, С. 294-295.
5. Якупова Э.И., Бобылёв А.Г., Вихлянцев И.М. Сравнительный анализ амилоидных свойств гладкомышечных изоформ тайтина in vitro // 20-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино, 2016, С. 300.
6. Якупова Э.И., Вихлянцев И.М., Бобылёв А.Г. Амилоидная и неамилоидная агрегация гладкомышечного тайтина // XVI Всероссийская конференция молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика», Пущино, 2016, С. 27.
7. Якупова Э.И., Шоно Я.А., Вихлянцев И.М., Бобылёв А.Г. Исследование динамики формирования амилоидных агрегатов гладкомышечного титина in vitro // 21-я

Международная Пушинская школа конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушино, 2017, С. 337.

8. Якупова Э.И., Вихлянцев И.М., Бобылёв А.Г. К вопросу о возможной функциональной роли агрегации титина *in vivo* // XVII Всероссийская конференция молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика», Пушино, 2017, С. 14.

9. Якупова Э.И., Вихлянцев И.М., Бобылёв А.Г. Разные типы амилоидной агрегации титина *in vitro* // XXX зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2018, С. 48.

10. Якупова Э.И., Вихлянцев И.М., Бобылёв А.Г. Окраска Конго красным как метод исследования амилоидов. Биология - наука XXI века: 22-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых, Пушино, 2018, С. 379-380.

11. Якупова Э.И., Шумейко С.А., Бобылёва Л.Г., Вихлянцев И.М., Бобылёв А.Г. Гладкомышечный титин формирует *in vitro* различные типы амилоидных агрегатов. Отчетная годовая конференция ИТЭБ РАН, Пушино, 2018, С. 23.

12. Yakupova E., Shumeyko S., Bobyleva L., Vikhlyantsev I., Bobylev A. Possible functional role of titin amyloid aggregation // 47th European muscle conference, Hungary, Budapest, 2018, p. 65–115.

13. Yakupova E., Bobyleva L., Vikhlyantsev I., Bobylev A. Differences in structural organizations of smooth muscle titin amyloid aggregates // EMBO Workshop. Protein quality control: from mechanisms to disease. Spain, Costa de la Calma (Mallorca), 2019, №139.

14. Якупова Э.И., Шоно Я.А., Вихлянцев И.М., Бобылёв А.Г. Два типа амилоидной агрегации титина *in vitro* // Биология - наука XXI века: 23-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых, Пушино, 2019, С. 433.

15. Бобылёв А.Г., Якупова Э.И., Шоно Я.А., Бобылёва Л.Г., Вихлянцев И.М. Возможная физиологическая роль обратимой амилоидной агрегации титина. XII Всероссийский симпозиум с международным участием «Биологическая подвижность», Пушино, 2019, С. 47-51.

16. Yakupova E.I., Vikhlyantsev I.M., Bobylev A.G., Mártonfalvi Zs., Kellermayer M.S. Topological structure of smooth muscle titin molecules and oligomers // 64th Annual Meeting of the Biophysical Society, San Diego, California, 2020.

17. Якупова Э.И., Бобылёва Л.Г., Мартонфалви Ж., Келлермайер М. Вихлянцев И.М., Бобылёв А.Г. Структура олигомеров гладкомышечного титина // Биология - наука XXI века: 24-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых, Пушино, 2019, С. 433.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

**ДРС** – динамическое рассеяние света

**Фурье-ИКС** – Инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием

**КД** – Круговой дихроизм

**КК** – Конго красный

**м.м.** – молекулярная масса

**ср.зн.** – среднее значение

**ТТ** – Тиофлавин Т

**Rh** – гидродинамический радиус частиц